



MARIA RAQUEL MARQUES FURTADO DE MENDONÇA LOUZEIRO

**MARCADORES DO SISTEMA HEMOSTÁTICO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM MULHERES
COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

***MARKERS OF THE HEMOSTATIC SYSTEM AND THEIR ASSOCIATION
WITH CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS IN WOMEN WITH
POLYCYSTIC OVARY SYNDROME***

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARIA RAQUEL MARQUES FURTADO DE MENDONÇA LOUZEIRO

**MARCADORES DO SISTEMA HEMOSTÁTICO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM MULHERES
COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. CRISTINA LAGUNA BENETTI PINTO**
Coorientadora: **Prof^a. Dr^a. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI**

**MARKERS OF THE HEMOSTATIC SYSTEM AND THEIR ASSOCIATION
WITH CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS IN WOMEN WITH
POLYCYSTIC OVARY SYNDROME**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP
para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, na área
de concentração em Fisiopatologia Ginecológica.

*Dissertation submitted to the Obstetrics and Gynecology Program,
School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP)
for the purpose of obtaining the title of Master in Health Sciences,
concentration in Gynecologic Pathology.*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA RAQUEL MARQUES FURTADO DE MENDONÇA LOUZEIRO
E ORIENTADA PELA Prof^a. Dr^a. CRISTINA LAGUNA BENETTI PINTO**

Assinatura da Orientadora

Campinas, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M523m	Mendonça-Louzeiro, Maria Raquel Marques Furtado de, 1976- Marcadores do sistema hemostático e sua associação com parâmetros clínicos e laboratoriais em mulheres com síndrome dos ovários policísticos / Maria Raquel Marques Furtado de Mendonça Louzeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2012. Orientador: Cristina Laguna Benetti Pinto. Coorientador: Joyce Maria Annichino-Bizzacchi. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Síndrome do ovário policístico. 2. Marcadores hemostáticos. 3. Coagulação. 4. Fibrinólise. 5. Trombose venosa. I. Pinto, Cristina Laguna Benetti, 1959-. II. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Markers of the hemostatic system and their association with clinical and laboratory parameters in women with polycystic ovary syndrome.

Palavras-chave em inglês:

Polycystic ovary syndrome
Hemostatic markers
Coagulation
Fibrinolysis
Venous thrombosis

Área de concentração: Fisiopatologia ginecológica

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Cristina Laguna Benetti Pinto [Orientador]
Rosana Maria dos Reis
Cássia Raquel Teatin Juliato

Data da defesa: 03/10/2012

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: MARIA RAQUEL MARQUES FURTADO DE MENDONÇA LOUZEIRO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. CRISTINA LAGUNA BENETTI PINTO

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 03/10/2012

201230738

Dedico este trabalho...

*À minha querida mãe, Sonia,
que sempre me incentivou na conquista de meus
objetivos pessoais e profissionais, não medindo
esforços para que meus sonhos se concretizassem.*

*Ao meu saudoso pai, Eduardo,
fonte de inspiração, estímulo altruísta,
forte motivação para meu desenvolvimento profissional,
que se ausentou no plano físico,
mas que permanece vivo dentro de mim.*

*Aos meus amados irmãos, Maria Beatriz e Paulo Eduardo,
grandes exemplos de perseverança e conquista.*

*Ao meu maior tesouro, minha filha Maria Luiza,
que chegou para iluminar a minha vida,
e me fez refletir sobre a verdadeira felicidade...
fonte de constante alegria ao meu coração.*

*Ao meu grande amor, Gerson,
ajuda constante, apoio incessante,
companheiro fiel,
sempre presente para a realização deste trabalho.*

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, e por me conceder a oportunidade de realizar meus sonhos, fortalecendo-me nos momentos em que mais precisei.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Laguna Benetti Pinto, pela sua compreensão e paciência nos períodos de minha gestação e puerpério, e por sua dedicação, sempre me orientando de forma carinhosa e encorajadora para a concretização deste trabalho.

À Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, por sua valiosa colaboração como coorientadora.

Aos professores da Pós-Graduação, Profa. Dra. Lucia Helena Simões da Costa Paiva, Prof. Dr. José Guilherme Cecatti, Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, Prof. Dr. Paulo César Giraldo, Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes, pelos seus ensinamentos e contribuição para o conhecimento científico.

Aos membros da banca de Qualificação, Profa. Dra. Adriana Orcesi Pedro, Prof. Dr. Luís Otávio Zanatta Sarian e Profa. Dra. Daniela Angerame Yela Gomes, que muito contribuíram para a elaboração final desta dissertação.

À Susan Kelly Picoli Quaino, funcionária e amiga do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, pelo auxílio técnico no processamento das amostras sanguíneas.

Às secretárias do Departamento de Ginecologia e da Comissão de Pós Graduação, Márcia e Denise, pelo constante auxílio e apoio incondicionais.

À minha amiga Mariana Mayumi, que embarcou neste sonho comigo, por todo incentivo e apoio em Campinas.

À minha estimada mãe, destaco sua imensa e carinhosa ajuda nos cuidados com minha filha Maria Luíza, permitindo que me dedicasse à realização deste trabalho.

Ao meu esposo querido, por sua infinita compreensão e paciência pelo longo tempo de ausência, espera e companheirismo.

A todas as mulheres que participaram deste estudo.

Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
de São Paulo (FAPESP) - processo número
11707-0/2010.

“De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Façamos da interrupção, um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro.”

Fernando Sabino

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xii
Summary	xv
1. Introdução	18
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. Publicação.....	33
4. Conclusões.....	62
5. Referências Bibliográficas.....	64
6. Anexos	72
6.1. Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	72
6.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	74
6.3. Anexo 3 – Ficha de Coleta de Dados.....	76

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AUC** – Área sob a curva (*Area under curve*)
- CAISM** – Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
- CC** – Circunferência de cintura
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- cm** – Centímetro(s)
- Cmáx** – Concentração máxima de trombina / pico de trombina gerada
- CNS** – Conselho Nacional de Saúde
- COC** – Contraceptivo oral combinado
- CONEP** – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- CQ** – Circunferência de quadril
- DCV** – Doença cardiovascular
- DIU** – Dispositivo intra-uterino
- DM2** – *Diabetes mellitus* tipo 2
- E2** – Estradiol
- et al.** – e colaboradores
- ETP** – Potencial de trombina endógena (*Endogenous thrombin potential*)

FCM	– Faculdade de Ciências Médicas
GE	– Ginecologia Endócrina
HAS	– Hipertensão arterial sistêmica
HDL	– HDL colesterol
HOMA-IR	– Índice de HOMA (<i>Homeostatic model assessment of insulin resistance</i>)
IFG	– Índice de Ferriman-Gallwey
IMC	– Índice de massa corpórea
Kg	– Quilograma(s)
Kg/m²	– Quilograma(s) por metro quadrado
LDL	– LDL colesterol
m	– Metro(s)
μUI/ml	– Microunidades internacionais por mililitro
mA	– Miliabsorbância
mA/min	– Miliabsorbância por minuto
mg/dL	– Miligrama(s) por decilitro
mg/L	– Miligrama(s) por litro
ml	– Mililitro(s)
mm	– Milímetro(s)
ng/mL	– Nanograma(s) por mililitro(s)
p	– Nível de significância
PAI-1	– Inibidor do ativador do plasminogênio-1 (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
%	– Porcentagem
PCR	– Proteína C reativa
PDF	– Produto de degradação da fibrina

- pg/mL** – Picograma(s) por mililitro
- Relação C/Q** – Relação cintura-quadril
- RI** – Resistência insulínica
- s** – Segundo(s)
- SAAF** – Síndrome do anticorpo antifosfolípide
- SM** – Síndrome metabólica
- SOP** – Síndrome dos ovários policísticos
- T lag** – Tempo para o início da geração de trombina
- TAFI** – Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (*Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*)
- TCLE** – Termo de consentimento livre e esclarecido
- TEV** – Tromboembolismo venoso
- TGT** – Teste de geração de trombina
- TL** – Testosterona livre
- Tmáx** – Tempo para o pico de geração de trombina
- t-PA** – Ativador do plasminogênio do tipo tecidual (*Tissue-type plasminogen activator*)
- TT** – Testosterona total
- TVP** – Trombose venosa profunda
- U/ml** – Unidade(s) por mililitro
- UNICAMP** – Universidade Estadual de Campinas
- u-PA** – Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (*Urokinase-type plasminogen activator*)
- α_2 -AP** – Alfa 2- antiplasmina

Resumo

Introdução: Os distúrbios hemostáticos são pouco estudados na Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Mulheres com SOP manifestam frequentemente fatores de risco tromboembólico como obesidade, hiperandrogenismo e resistência insulínica, representando evidências indiretas que sugerem maior probabilidade de alterações na coagulação. **Objetivo:** Avaliar alguns marcadores do sistema hemostático e sua associação com parâmetros clínicos e laboratoriais em mulheres com SOP. **Sujeitos e Método:** Estudo transversal para avaliação de 45 mulheres com SOP atendidas no Ambulatório de Ginecologia Endócrina do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, e de 45 mulheres com função gonadal normal, pareadas por idade em anos completos (± 2 anos) e IMC ($\pm 2\text{kg/m}^2$). Foram avaliados parâmetros clínicos [circunferência da cintura (CC), circunferência do quadril (CQ), relação cintura-quadril (C/Q), índice Ferriman-Gallwey (IFG)] e laboratoriais [glicemia de jejum, insulina de jejum, testosterona total (TT) e livre (TL)], e dosados os marcadores de hemostasia: inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1), inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), D-dímero e teste de geração de trombina (TGT). Os dados foram comparados entre os grupos através dos

testes *t* Student pareado ou Mann-Whitney. A correlação entre os marcadores de hemostasia e alguns parâmetros clínicos e laboratoriais de mulheres com SOP foi avaliada pelo índice de Pearson. O nível de significância foi de 5%.

Resultados: As mulheres do grupo SOP e controles eram jovens ($26,13 \pm 4,31$ e $26,22 \pm 4,28$ anos, respectivamente) e com sobrepeso ($29,32 \pm 6,37$ e $29,25 \pm 6,32 \text{ kg/m}^2$), tendo sido pareadas para estas variáveis (idade e IMC). Mulheres com SOP apresentaram maior relação C/Q ($0,79 \pm 0,08$ e $0,76 \pm 0,05$, $p=0,03$), IFG ($9,42 \pm 5,32$ e $0,62 \pm 0,83$, $p<0,01$), TT ($0,53 \pm 0,30$ e $0,30 \pm 0,29 \text{ ng/ml}$, $p<0,01$) e TL ($1,42 \pm 1,00$; $0,88 \pm 0,32 \text{ pg/ml}$, $p=0,02$) quando comparadas ao grupo-controle. Os grupos não diferiram quanto às dosagens de glicemia, insulina e HOMA-IR. Dentre os marcadores hemostáticos, observou-se que o tempo para o início da geração de trombina (T lag) do TGT apresentou diferença significativa entre os grupos SOP e controle ($25,65 \pm 2,61$ e $26,76 \pm 2,11$ s, $p=0,03$, respectivamente) significando que, nas mulheres com SOP, a geração de trombina ocorre mais rapidamente, sugerindo maior risco de hipercoagulabilidade. Nas mulheres com SOP, os níveis séricos dos marcadores fibrinolíticos PAI-1 e D-dímero correlacionaram-se positivamente com os parâmetros clínicos idade, IMC, CC, CQ e relação C/Q, enquanto que o TAFI correlacionou-se positivamente com IMC, CC e relação C/Q, ressaltando o papel da obesidade como fator de risco tromboembólico. Dentre os parâmetros laboratoriais, observou-se correlação direta do PAI-1 com insulina e HOMA-IR, e do TAFI, com glicemia. Nas mulheres com SOP, a idade correlacionou-se diretamente com PAI-1 e D-dímero e inversamente ao T lag e ao tempo para o pico de geração de trombina (T_{máx}) do TGT, sugerindo que, com o avançar da idade, ocorra elevação dos níveis de PAI-1 e

D-dímero (aumentando o risco de hipofibrinólise), e redução tanto do tempo até a primeira explosão de trombina ocorrer, quanto do tempo para o pico de geração de trombina, levando a um estado de hipercoagulabilidade. Os parâmetros IMC, CC e TL apresentaram correlação positiva direta com a concentração máxima de trombina (C_{máx}) e com a área sob a curva (AUC) ou potencial de trombina endógena (ETP) do mesmo teste. **Conclusão:** Mulheres jovens com SOP geram trombina mais rapidamente que mulheres jovens de mesmo IMC sem a presença de SOP. A distribuição de gordura androide, o avanço da idade, a resistência insulínica e a testosterona livre podem influenciar diretamente alguns marcadores de hemostasia, elevando o risco tromboembólico.

Summary

Introduction: Few studies have been conducted on hemostatic disorders in polycystic ovary syndrome (PCOS). In women with PCOS, thromboembolic risk factors such as obesity, hyperandrogenism and insulin resistance are often present, indirectly suggesting a greater probability of coagulation disorders. **Objective:** To evaluate some markers of the hemostatic system and their association with the clinical and laboratory parameters of women with PCOS. **Subjects and Methods:** A cross-sectional study was conducted to evaluate 45 women with PCOS receiving care at the Gynecological Endocrinology Outpatient Clinic of the Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP) and 45 women with normal ovarian function, paired for age (± 2 years) and body mass index (BMI) ($\pm 2\text{kg/m}^2$). The following clinical parameters were evaluated: waist circumference (WC), hip circumference (HC), waist/hip ratio (W/H ratio) and the Ferriman-Gallwey index (FGI), as well as the following laboratory parameters: fasting glucose, fasting insulin, total testosterone (TT) and free testosterone (FT). In addition, the hemostatic markers plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and D-dimer were measured and the thrombin generation test (TGT) was

performed. The groups were compared using Student's paired t-test or the Mann-Whitney test. The correlation between the hemostatic markers and some clinical and laboratory parameters of women with PCOS was evaluated using Pearson's correlation coefficient. Significance level was defined at 5%. **Results:** Since the women in the PCOS group were paired with those in the control group according to age and BMI, the women in both groups were young (26.13 ± 4.31 and 26.22 ± 4.28 years, respectively) and overweight (29.32 ± 6.37 and $29.25 \pm 6.32 \text{ kg/m}^2$, respectively). However, the women with PCOS had a higher W/H ratio (0.79 ± 0.08 and 0.76 ± 0.05 ; $p = 0.03$), FGI (9.42 ± 5.32 and 0.62 ± 0.83 ; $p < 0.01$), TT (0.53 ± 0.30 and $0.30 \pm 0.29 \text{ ng/ml}$; $p < 0.01$) and FT levels (1.42 ± 1.00 and $0.88 \pm 0.32 \text{ pg/ml}$; $p = 0.02$) compared to those in the control group. There were no statistically significant differences between the two groups with respect to glucose or insulin levels or the homeostasis model of assessment - insulin resistance (HOMA-IR). With respect to the hemostatic markers, the only statistically significant difference between the PCOS and the control group was in the thrombin generation lag-time (25.65 ± 2.61 and 26.76 ± 2.11 s, respectively, $p = 0.03$), meaning that thrombin generation was faster in the women with PCOS, suggesting a higher risk of hypercoagulability. In the women with PCOS, serum levels of the fibrinolytic markers PAI-1 and D-dimer correlated positively with the following clinical parameters: age, BMI, WC, HC and W/H ratio, whereas TAFI correlated positively with BMI, WC and with the W/H ratio, emphasizing the role of obesity as a risk factor for thromboembolism. Of the laboratory parameters, a direct correlation was found between PAI-1 and insulin and HOMA-IR and between TAFI and glucose. In the women with PCOS, age correlated positively with PAI-

1 and D-dimer and inversely with the lag time and the time to peak thrombin generation (Tmax) of the TGT, suggesting an increase in PAI-1 and D-dimer levels with increasing age (elevating the risk of hypofibrinolysis), as well as a reduction both in the time until the initial thrombin burst and in the time to peak thrombin generation, leading to a state of hypercoagulability. In addition, BMI, WC and FT correlated positively with the maximum concentration of thrombin (Cmax) and with the area under the thrombin generation curve (AUC) or the endogenous thrombin potential (ETP) in the same test. **Conclusion:** Thrombin generation is faster in young women with PCOS compared to young women with the same BMI but without PCOS. Android fat distribution, increasing age, insulin resistance and free testosterone may directly affect some hemostatic markers, increasing the risk of thromboembolism.

1. Introdução

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a principal endocrinopatia ginecológica e afeta entre 5% a 10% das mulheres na menacme (1,2). Em 2003, o Consenso Internacional de Rotterdam determinou que, para o seu diagnóstico, as pacientes devem apresentar pelo menos duas das três seguintes características: oligomenorreia e/ou anovulação, sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo e ovários policísticos ao ultrassom (presença de 12 ou mais folículos em cada ovário, medindo de 2mm a 9mm e/ou aumento ovariano >10ml). Para este diagnóstico é necessária a exclusão de outras causas de hiperandrogenismo que apresentam quadro clínico similar: hiperplasia adrenal congênita, síndrome de Cushing e tumores secretores de andrógenos (3), além de outras endocrinopatias, como hiperprolactinemia e hipotireoidismo. Este conceito tem sido discutido, pois alguns autores consideram necessária a presença do hiperandrogenismo (clínico e/ou laboratorial) associado a uma das duas outras características mencionadas (oligoanovulação e/ou imagem ecográfica de ovários policísticos) para o diagnóstico de SOP, com exclusão de outras desordens relacionadas ao hiperandrogenismo (4). Em 2012, um novo Consenso estabelecido

em Amsterdã, reforçou os critérios diagnósticos para SOP (Rotterdam, 2003) e acrescentou conhecimentos sobre aspectos da saúde de mulheres com SOP, como: adolescência, hirsutismo e acne, contracepção, anormalidades do ciclo menstrual, qualidade de vida, etnicidade, complicações gestacionais, saúde cardiovascular e metabólica a longo prazo e risco de câncer (5).

As mulheres com SOP procuram os serviços médicos, na maioria das vezes, devido à irregularidade menstrual, hirsutismo ou infertilidade (6, 7). Distúrbios metabólicos são frequentemente encontrados em mulheres com SOP, como a obesidade, hiperinsulinemia, resistência insulínica (RI), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) de início precoce, dislipidemia e síndrome metabólica (SM), trazendo várias repercussões clínicas desfavoráveis a essas pacientes (8-12).

Sabe-se que pessoas portadoras da SM têm maior possibilidade de desenvolver doença cardiovascular (DCV) por apresentarem fatores de risco como obesidade abdominal, HDL colesterol diminuído, hipertensão arterial, alteração do metabolismo da glicose, e estado pró-inflamatório alterado, mostrando aumento sérico de proteína C reativa (PCR) e de fatores pró-trombóticos (como fibrinogênio e hiperagregabilidade plaquetária). Estima-se que haja duas vezes mais risco de DCV e cinco vezes mais risco de desenvolvimento de DM2 neste grupo de mulheres (13).

Nas mulheres com SOP, apesar da maior prevalência de fatores de risco cardiovascular, os estudos têm falhado em demonstrar o aumento da mortalidade cardio e cerebrovascular em comparação com a população saudável. A

prevalência da SM em mulheres com SOP, nos Estados Unidos, é ao redor de 43% a 46%. Sabe-se que ela varia no mundo provavelmente devido a fatores genéticos, estilo de vida e hábitos alimentares. Um estudo realizado na Universidade do Rio Grande do Norte com 102 mulheres brasileiras com SOP mostrou a prevalência de 28,4% de SM (14).

Em muitos casos, a SOP está associada à obesidade e à resistência insulínica (6). A obesidade nessas pacientes possui papel fundamental no desenvolvimento da RI e do estado pró-inflamatório que fazem parte da SM. Pacientes com SOP, independentemente de seu índice de massa corporal (IMC), apresentam aumento da razão cintura/quadril, o que se traduz no aumento da circunferência abdominal e, conseqüentemente, reflete o aumento da adiposidade visceral (15). O tecido adiposo visceral possui citocinas pró-inflamatórias e promotoras da resistência à insulina, fator de necrose tumoral alfa e interleucina-6 (16).

Mulheres com SOP apresentam aumento da resistência à insulina, similar às pacientes com DM2. O mecanismo envolvido relaciona-se ao prejuízo da ação do hormônio na periferia, levando a uma conseqüente hiperinsulinemia. Como conseqüência do insulinismo, alguns tecidos têm sua função estimulada, como as células da teca ovariana, que passam a produzir andrógenos em demasia. Estima-se que 53% a 76% das mulheres com SOP tenham resistência insulínica (17).

A disfunção das células β e a RI são anormalidades metabólicas inter-relacionadas na etiologia do DM2. Durante as últimas décadas, foram propostos métodos para a avaliação da RI e da capacidade funcional das células β

pancreáticas. O Modelo de Avaliação da Homeostase, mais conhecido como índice HOMA (*homeostatic model assessment*), representa uma avaliação indireta da RI e das células β pancreáticas, através da mensuração da insulina endógena e glicemia, em condições de homeostase e jejum. Esse método vem sendo amplamente utilizado, principalmente em estudos envolvendo grande número de participantes, por ser método de fácil aplicação, rápido e de menor custo que as técnicas de mensuração direta. Na literatura científica, há controvérsias nos valores de corte referenciais para classificar os pacientes conforme os resultados obtidos, havendo variações de valores propostos por diferentes autores (18). Em estudo realizado para a população brasileira, Geloneze et al (2006) interpretaram como resistência insulínica valores de HOMA-IR $\geq 2,71$ (19, 20).

A dislipidemia na SOP apresenta pelo menos dois fatores desencadeantes e agravantes: a RI e o hiperandrogenismo. A RI, dificultando que a insulina exerça seu papel antilipolítico e o aumento da testosterona, diminuindo a atividade da lipase, geram um componente aterogênico representado pelo aumento dos triglicerídeos, LDL colesterol e pela diminuição do HDL colesterol (21).

A hipertensão arterial, frequente na SOP, pode ser atribuída à hiperinsulinemia a partir de múltiplos mecanismos fisiopatológicos: aumento da volemia, redução da excreção renal de sódio e água, menor vasodilatação resultante da depleção de óxido nítrico e disfunções relacionadas à alteração do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Desta forma, mulheres com SOP apresentam mais predisposição à DCV, com risco relativo estimado em 7,4 para doença coronariana (21).

Devido ao maior risco de cardiopatias nas mulheres com SOP, torna-se importante a avaliação clínica destinada a prevenir consequências a longo prazo, como DM2 e DCV (22).

É provável que na SOP a falta de comprovação do aumento da mortalidade cardiovascular deva-se ao uso de dados retrospectivos, viés de seleção e a mulheres relativamente jovens nos estudos prospectivos de seguimento por curto prazo (21).

Em mulheres, sabe-se que o estradiol (E2), por diversos mecanismos, inibe o desenvolvimento de lesões iniciais arteriais. No entanto, uma vez que o ateroma esteja formado, as metaloproteinases têm sua produção aumentada pelo estímulo do E2, promovendo a ruptura da placa fibrosa e, conseqüentemente, da placa ateromatosa. Portanto, embora o E2 dificulte o desenvolvimento inicial da aterosclerose, aumenta os danos do processo quando este já está instalado (22).

Anormalidades na coagulação e deficiência da capacidade fibrinolítica também são fatores que contribuem para o desenvolvimento de DCV na SOP (23, 24).

A formação do coágulo de fibrina no sítio de lesão endotelial representa processo crítico para a manutenção da integridade vascular. Os mecanismos envolvidos nesse processo, constituintes do sistema hemostático, devem ser regulados para simultaneamente, contrapor-se à perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina (25).

Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação do sangue, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico. O equilíbrio funcional dos diferentes sistemas que compõem a hemostasia é garantido por uma variedade de mecanismos, envolvendo interações entre proteínas, respostas celulares complexas, e regulação de fluxo sanguíneo (25).

A formação do coágulo de fibrina envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores que culminam na gênese da enzima trombina, que, por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. Progressos significativos ocorreram nas últimas décadas, concernentes à compreensão da fisiologia desse sistema e dos mecanismos que o regulam (26, 27). Tais conhecimentos tiveram fundamental importância para a melhor compreensão da fisiologia da hemostasia e do papel das reações hemostáticas em doenças hemorrágicas e trombóticas (25).

Fibrinólise pode ser definida como a degradação da fibrina, mediada pela plasmina. O principal papel do sistema fibrinolítico é remover a fibrina dos vasos sanguíneos, tecidos, ductos e líquidos orgânicos. Quando ocorre a conversão do fibrinogênio em fibrina, paralelamente há a ativação da fibrinólise, com a conversão do plasminogênio em plasmina, para rápida remoção da fibrina, de modo a prevenir complicações trombóticas. Assim sendo, a fibrinólise pode ser considerada um mecanismo essencial de defesa do organismo contra a oclusão vascular pelo coágulo de fibrina formado (28, 29).

O sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina é composto por diversas proteínas (proteases séricas e inibidores), que regulam a geração de plasmina, uma enzima ativa, produzida a partir de uma proenzima inativa (plasminogênio), que tem por função degradar a fibrina e ativar metaloproteinases de matriz extracelular (29).

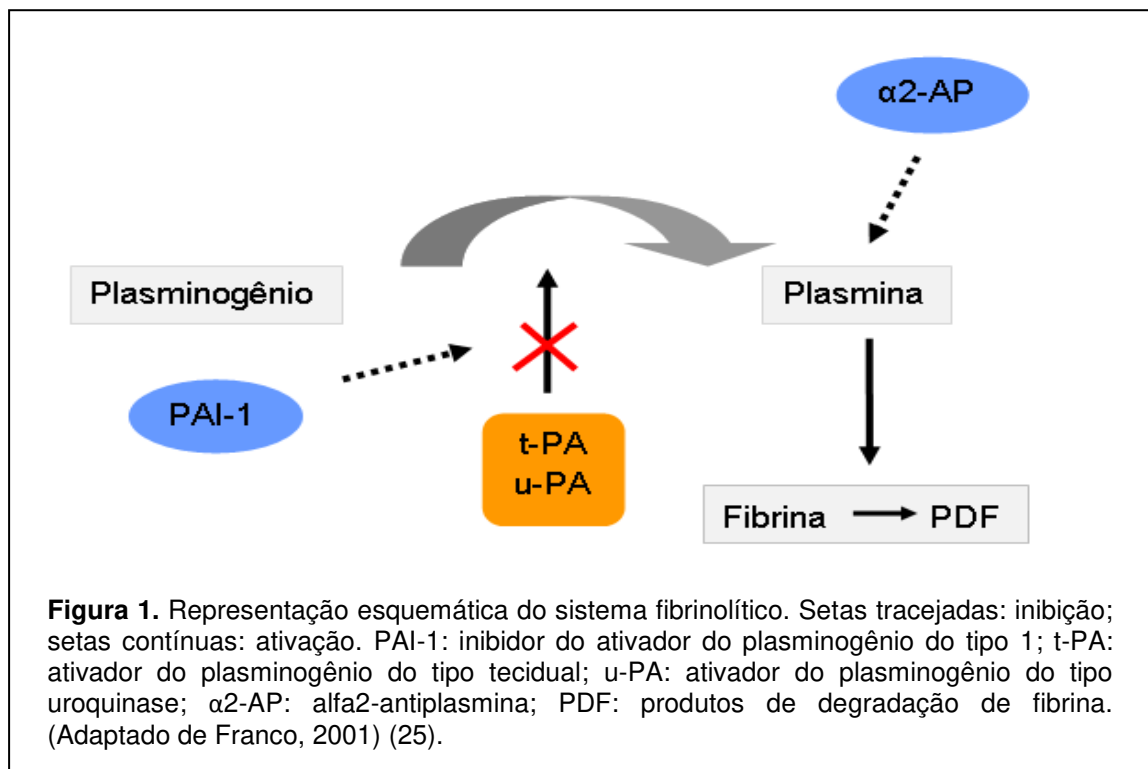
As enzimas do sistema fibrinolítico são todas serinoproteases, ao passo que os inibidores da fibrinólise são membros da superfamília de proteínas designadas serpinas (inibidores de proteases séricas). São conhecidos dois ativadores fisiológicos do plasminogênio: o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA, *tissue-type plasminogen activator*) e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA, *urokinase-type plasminogen activator*). Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação com seu substrato (plasminogênio) e promovem hidrólise de uma única ponte peptídica, que resulta na formação da plasmina (25).

Embora a plasmina degrade não somente a fibrina, mas também o fibrinogênio, fator V e fator VIII, em condições fisiológicas, a fibrinólise ocorre como processo que é altamente específico para a fibrina, portanto de ativação localizada e restrita, e não sistêmica, cumprindo, assim, sua função de remover o excesso de fibrina do intravascular de modo equilibrado. Esta especificidade dependente de fibrina é resultado de interações moleculares específicas entre os ativadores do plasminogênio, o plasminogênio, a fibrina e os inibidores da fibrinólise (25).

A inibição do sistema fibrinolítico ocorre em nível dos ativadores do plasminogênio mediante a ação de inibidores específicos (*plasminogen activator*

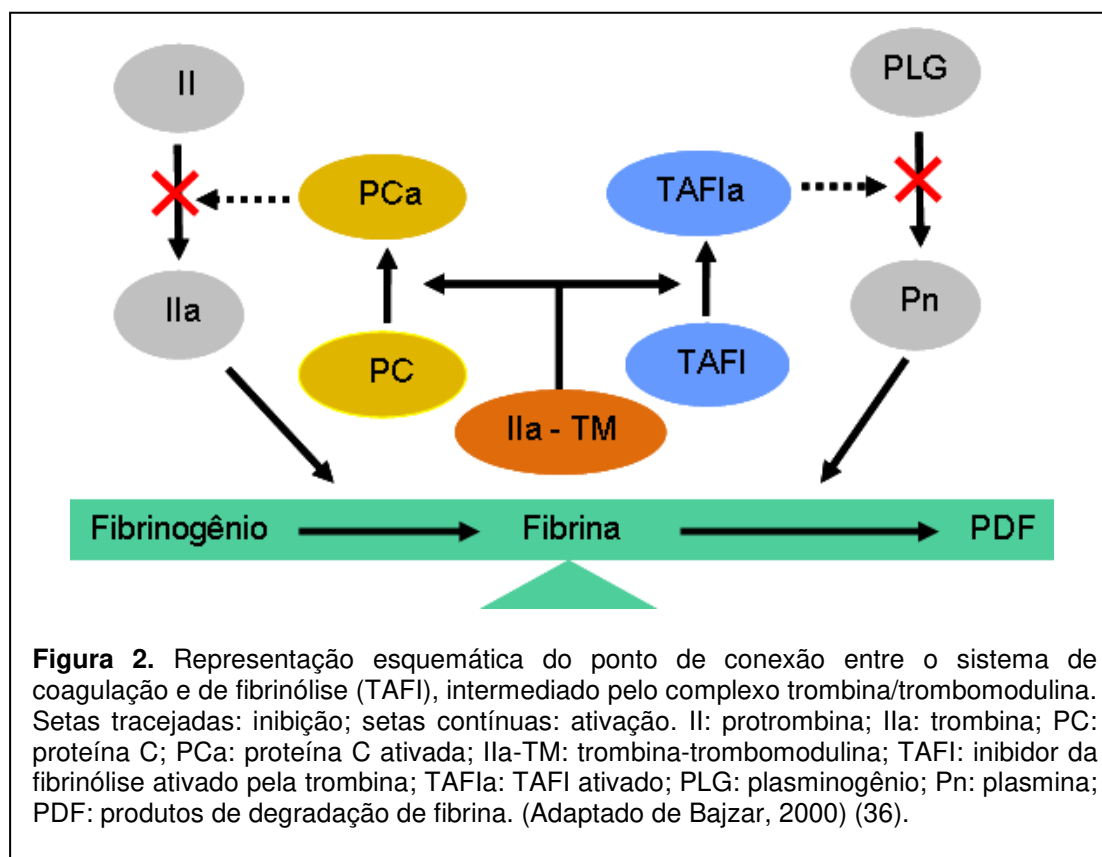
inhibitors - PAIs), cujo principal representante é o PAI-1, e diretamente sobre a plasmina, função inibitória exercida pela $\alpha 2$ – antiplasmina (25) (Figura1).

O PAI-1 é considerado o inibidor mais importante do t-PA, apesar de apresentar uma concentração plasmática muito baixa. Esse inibidor é uma glicoproteína produzida pelas células endoteliais. Além disso, está presente nas plaquetas, sendo liberado em grandes quantidades quando essas são ativadas. A deficiência de PAI-1 foi descrita como associada a um quadro clínico hemorrágico, e os níveis elevados, com o risco de trombose (30-33).



Há poucos anos, um novo componente do sistema fibrinolítico foi identificado e designado TAFI (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*, inibidor da fibrinólise ativado pela trombina). O TAFI é um zimogênio plasmático sintetizado pelo fígado,

uma enzima tipo carboxipeptidase β , que ocupa o importante papel na hemostasia funcionando como um potente inibidor da fibrinólise. O TAFI é ativado pela trombina, tripsina e plasmina, e regula a fibrinólise pela remoção dos sítios de lisina carboxi-terminal da fibrina. Esses sítios são essenciais para a ligação do plasminogênio e do t-PA à fibrina; portanto, sua remoção acarreta inibição da lise da fibrina (34, 35). Curiosamente, a principal via de ativação do TAFI é dependente da ligação do fator IIa (trombina) à trombomodulina (complexo que exerce também a função de ativar a via anticoagulante da proteína C). Dessa forma, a molécula do TAFI representa um ponto de conexão entre os sistemas de coagulação e fibrinólise (36, 37). Recentemente, níveis elevados de antígenos de TAFI foram associados a um risco aumentado de trombose venosa profunda (TVP) (38, 39) (Figura 2).



Há algumas evidências de que mulheres com SOP podem apresentar distúrbios da fibrinólise devido ao desequilíbrio entre o ativador do plasminogênio e o PAI-1, principal regulador deste sistema (36, 37).

Os ativadores do plasminogênio foram encontrados no fluido folicular (40) e nas células da granulosa de ovários humanos (41), porém já foi demonstrado que o aumento sistêmico dos níveis de PAI-1 não necessariamente implica o aumento dos seus níveis ovarianos locais, não havendo correlação entre os níveis de PAI-1 plasmáticos e o fluido folicular (36).

Já foi demonstrado que a hiperinsulinemia contribui para um estado protrombótico, reduzindo a fibrinólise e elevando os níveis de PAI-1 (42).

O D-dímero é um produto de degradação da fibrina e considerado um marcador de hipercoagulabilidade. Níveis elevados de D-dímero foram observados em mulheres com SOP, o que pode predispor a fenômenos tromboembólicos (43).

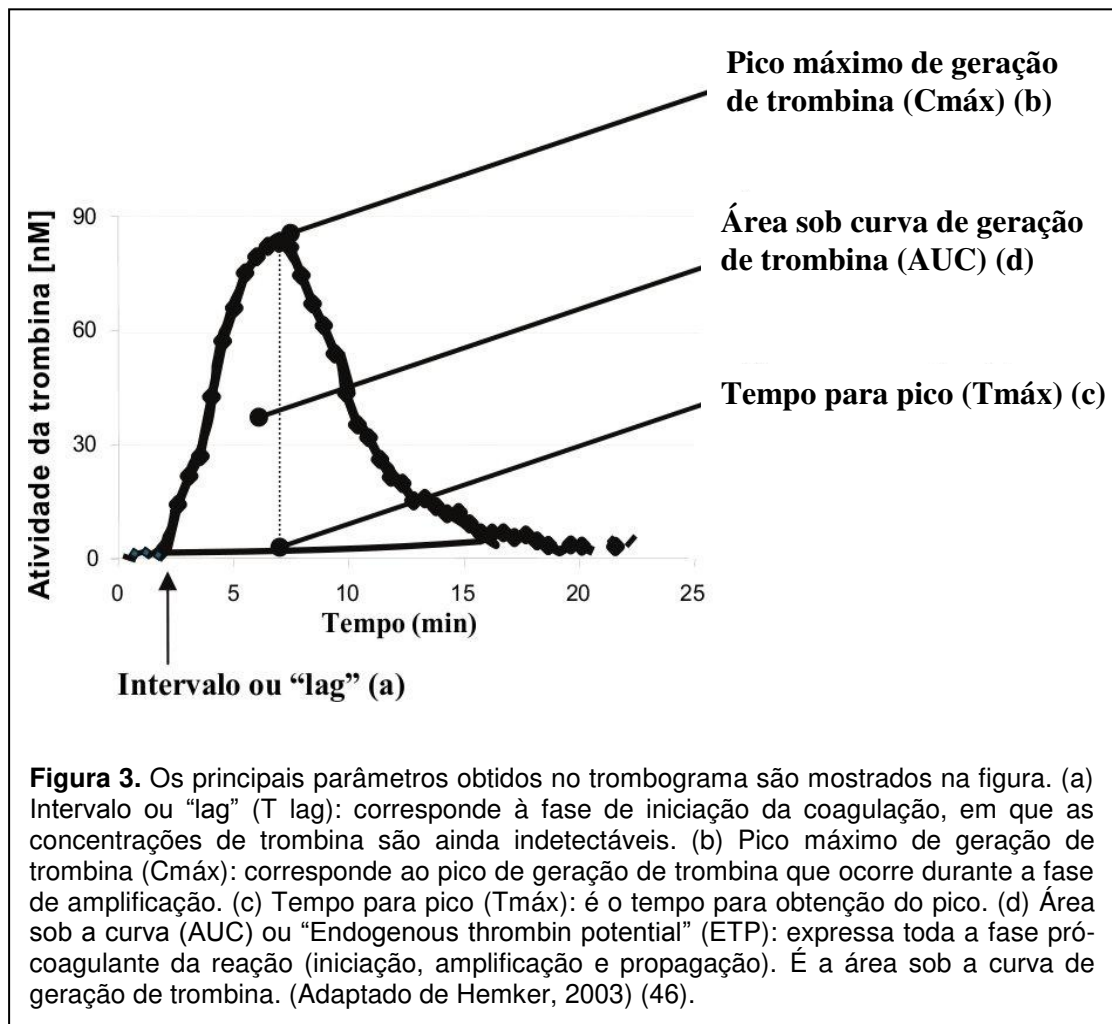
Em 2005, Wannamethee e colaboradores concluíram que RI, SM e D-dímero correlacionam-se positivamente com marcadores de hemostasia e inflamação, o que pode ser relevante para suas associações com DCV e TEV (44).

Estados de hiper ou hipocoagulabilidade podem ocorrer em decorrência de um grande número de doenças. Na literatura, existem diversos testes laboratoriais que tentam identificar a causa básica, contudo ainda não se conhece um único parâmetro de laboratório que esteja aumentado em todas as formas de hipercoagulabilidade e, do mesmo modo, esteja diminuído em todas as formas de hipocoagulabilidade. Tal ensaio seria extremamente útil para a detecção da

tendência tromboembólica e para a descoberta de hipocoagulabilidade induzida por drogas (44). Neste sentido, o *endogenous thrombin potential* (ETP), ou teste de geração de trombina, é considerado um bom indicador de coagulabilidade. Ele está reduzido entre 15% e 35% em pacientes que fazem uso de anticoagulantes orais ou de heparina, e aumentado em pacientes com deficiência congênita de antitrombina, em pacientes com mutação da protrombina de Leiden ou no fator V, e em mulheres que fazem uso de contraceptivos hormonais orais. Em pacientes portadores de doença tromboembólica foi verificado aumento dos níveis de ETP entre 29,4% e 53,0% (44).

Em 1986, Hemker e colaboradores introduziram o uso de um substrato cromogênico da trombina para avaliação da geração de trombina em amostras defibrinadas (45). No entanto, o método permaneceu dependente de subamostragem manual, o que limitava seu uso a laboratório de pesquisa. Em 1993, o mesmo grupo de pesquisadores introduziu novas modificações importantes no ensaio, que permitiram a mensuração contínua da geração de trombina com substratos cromogênicos, que, no entanto, apresentavam baixa reatividade e maior especificidade para a trombina. Estes autores introduziram o termo *Endogenous Thrombin Potential* ou ETP, que representaria a capacidade total do plasma em formar trombina depois da indução da coagulação. A quantidade de trombina gerada era calculada ao longo do tempo para a construção de uma curva de geração de trombina, conhecida como trombograma. Os autores também desenvolveram um programa de computador que permitiu calcular os parâmetros que caracterizam esta curva (46).

Na Figura 3 podem-se ver os principais parâmetros obtidos no teste de geração de trombina.



Ainda não há consenso quanto aos distúrbios da hemostasia na SOP devido ao pequeno número de estudos na literatura (47). Yildiz e colaboradores (47) relataram que a capacidade fibrinolítica estava diminuída em mulheres com SOP, enquanto Sloprien e associados (48) não encontraram diferença na capacidade fibrinolítica entre mulheres obesas com SOP e mulheres não obesas. Por outro

lado, Kelly e colaboradores (49) verificaram que a concentração do ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) foi significativamente mais elevada em mulheres com SOP, em comparação ao grupo-controle. Para outros fatores, como o de von Willebrand, atividade do fator VII, proteína C, proteína S, antitrombina III, resistência à proteína C, plasminogênio e $\alpha 2$ antiplasmina, os níveis parecem manter-se em valores normais em mulheres com SOP (24, 50).

Alguns autores relataram que o aumento do total de leucócitos no plasma sanguíneo de mulheres com SOP seria um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença cardíaca coronária, porém eles não determinaram a relação com outros fatores de risco, como alterações no perfil lipídico ou características antropométricas (51).

Por décadas, os contraceptivos orais combinados (COC) têm sido a terapêutica mais empregada no tratamento da SOP. Entretanto os componentes dos COC possuem efeitos adversos no metabolismo dos lípides, como aumento no nível sérico de triglicerídeos e dos carboidratos, reduzindo a sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose, e interferindo na hemostasia (21). Embora não haja evidência direta do aumento do risco de doença tromboembólica especificamente em mulheres com SOP, evidências indiretas sugerem esta possibilidade, uma vez que mulheres com sinais clínicos de hiperandrogenismo apresentam angiogramas coronários anormais (52).

Os distúrbios da hemostasia na SOP são ainda pouco estudados e com relatos conflitantes na literatura (53). O desconhecimento do comportamento dos

marcadores do sistema hemostático em mulheres com SOP impede que se atue na prevenção de fenômenos tromboembólicos, o que poderia reduzir a incidência de doença coronariana e da morbidade relacionada a eventos da coagulação neste grupo de mulheres.

Assim, acredita-se que desordens do sistema hemostático e alterações da coagulação possam contribuir para o aumento do risco de eventos cardiovasculares em mulheres com SOP, embora as evidências sejam conflitantes e baseadas em um pequeno número de estudos na literatura (23, 24, 37, 50, 53).

Embora muitos avanços tenham ocorrido com relação ao diagnóstico, tratamento, e prevenção de tromboembolismo venoso (TEV), algumas perguntas permanecem sem resposta, especialmente aquelas relacionadas à patogênese e a fatores de risco (54). A identificação de fatores predisponentes ao TEV é aconselhável porque poderia reduzir os altos custos destinados ao seu tratamento, gerando uma economia valiosa dos recursos financeiros que poderiam ser melhor distribuídos (9, 54-56).

A avaliação de componentes do sistema hemostático, incluindo componentes da fibrinólise e o teste de geração de trombina em pacientes com SOP e sua correlação com parâmetros clínicos, hormonais e metabólicos, poderá contribuir para identificar alterações predisponentes para DCV e TEV, bem como redirecionar a escolha do tratamento hormonal adequado, dose e via de administração. Desta forma, contribuir-se-ia para minimizar os riscos de desenvolvimento de DCV e de alterações da coagulação e do sistema fibrinolítico neste grupo de mulheres.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os marcadores do sistema hemostático e sua associação com alguns parâmetros clínicos e laboratoriais em mulheres com SOP.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar os marcadores de fibrinólise (TAFI, D-dímero e PAI-1) entre mulheres com SOP e mulheres com função gonadal normal.
- Comparar o teste de geração de trombina (TGT) entre mulheres com SOP e mulheres com função gonadal normal.
- Correlacionar os marcadores de fibrinólise com parâmetros clínicos e laboratoriais de mulheres com SOP.
- Correlacionar o teste de geração de trombina com parâmetros clínicos e laboratoriais de mulheres com SOP.

3. Publicação

----- Forwarded message -----

From: **Fertil Steril** <Fertstert@asrm.org>

Date: 2012/9/18

Subject: Fertility and Sterility - Submission Confirmation

To: laguna.unicamp@gmail.com

Dear Dr Benetti-Pinto,

Your submission entitled "Faster thrombin generation in women with polycystic ovary syndrome compared to healthy controls matched for age and body mass index" has been received by Fertility and Sterility.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System of Fertility and Sterility as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fns/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Fertility and Sterility Editorial Office

Faster thrombin generation in women with polycystic ovary syndrome compared to healthy controls matched for age and body mass index

Maria Raquel Marques Furtado de Mendonça Louzeiro*, MD; Joyce Maria Annichino-Bizzacchi ‡, MD, PhD; Luís Alberto Magna§, MD, PhD; Susan Kelly Picoli Quaino‡‡, MD; Cristina Laguna Benetti-Pinto*, MD, PhD.

* Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medical Sciences, University of Campinas, (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

‡ Department of Clinical Medicine, Hemostasis Laboratory, Blood Center, University of Campinas, (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

§ Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, University of Campinas, (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

‡‡ Hemostasis Laboratory, Campinas Blood Center, University of Campinas, (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

Financial Support: The São Paulo State Foundation for the Support of Research (FAPESP), Project # 2010/11707-0

Conflicts of interest: None declared.

Correspondence:

Cristina Laguna Benetti-Pinto

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Av. Alexander Fleming, 101, Cidade Universitária

13083-881 Campinas, SP, Brazil

Telephone: +55 (19) 35219306

Email: laguna.unicamp@gmail.com

Capsule: Young women with PCOS generated thrombin faster than paired controls. Android fat distribution, older age, insulin resistance and free testosterone levels may affect some hemostatic markers, increasing the thromboembolic risk.

Abstract

Objective: To evaluate hemostatic markers and their association with clinical and laboratory variables in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Design:** Cross-sectional study. **Setting:** Tertiary teaching hospital. **Patients:** Forty-five women with PCOS and 45 controls paired for age (± 2 years) and body mass index (BMI) (± 2 kg/m²). **Interventions:** Clinical evaluation and venipuncture. **Main outcome measures:** Age, BMI, waist circumference (WC), hip circumference (HC), waist/hip ratio, Ferriman-Gallwey index, fasting glucose, fasting insulin, total testosterone, free testosterone (FT), TAFI, D-dimer, PAI-1 and the thrombin generation test. **Results:** Thrombin generation lag-time (T lag) was significantly shorter in women with PCOS compared to controls, indicating a greater risk of hypercoagulability. The other hemostatic parameters were similar in both groups. In the PCOS group, age correlated positively with D-dimer and PAI-1, and negatively with T lag and Tmax. BMI and WC correlated positively with TAFI, D-dimer, PAI-1, Cmax and AUC; HC with D-dimer and PAI-1; waist/hip ratio with TAFI, D-dimer and PAI-1; glucose with TAFI; insulin and HOMA-IR with PAI-1 and FT with Cmax and AUC. **Conclusion:** Thrombin generation is faster in young women with PCOS. Android fat distribution, older age, insulin resistance and free testosterone may directly affect some hemostatic markers, increasing thromboembolic risk.

Key words: polycystic ovary syndrome; hemostatic markers; coagulation; fibrinolysis; venous thrombosis.

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a highly prevalent condition, affecting 5-10% of women of reproductive age (1-3). Women with PCOS often have metabolic abnormalities including insulin resistance, dyslipidemia, glucose intolerance, type 2 diabetes, metabolic syndrome and an increase in the risk factors for cardiovascular disease (4-7). These alterations are more common when hyperandrogenism and oligomenorrhea are both present, and are intensified in the presence of obesity (8).

Studies also suggest a proinflammatory and prothrombotic state, particularly in the presence of the metabolic syndrome (9). A strong association is believed to exist between the hemostatic system and the endothelium and the vascular wall. In PCOS, although it is assumed that the disorders of the hemostatic system and coagulation may contribute towards increasing the risk of cardiovascular events, evidence in the literature is conflicting and based on only a few studies (10-14), with some questions remaining to be answered, particularly regarding pathogenesis and risk factors (15). Therefore, the mechanism of the hemostatic disorders and their correlation with the characteristics of PCOS remain controversial and unclear.

Hence, the objective of the present study was to evaluate some of the components of the hemostatic system, including a global coagulation test, and to assess the association between these components and clinical and laboratory variables in women with PCOS.

Subjects and Methods

Subject selection

A cross-sectional study was conducted with 45 women with PCOS (Rotterdam Consensus, 2003) (16) and 45 women with normal ovarian function (control group).

Women with PCOS were paired with controls for age (± 2 years) and body mass index (BMI) ($\pm 2 \text{ kg/m}^2$). The study participants were 18-35 years of age, had not been in use of any hormonal methods of contraception for three months or more prior to enrollment and were receiving care at the Gynecological Endocrinology (cases) and Family Planning (controls) outpatient clinics at the Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Brazil.

Normal ovarian function was defined as the presence of regular menstrual cycles of 24-35 days without the use of any hormonal methods of contraception or any other hormonal medication that could alter the menstrual cycle.

The following clinical variables were evaluated in the two groups: age, BMI, waist and hip measurements, waist/hip ratio and the Ferriman-Gallwey index. Laboratory variables included: fasting glucose, fasting insulin, insulin resistance according to the homeostasis model of assessment - insulin resistance (HOMA-IR) (17), total testosterone and free testosterone, as well as the hemostatic markers thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), D-dimer, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and the thrombin generation test (TGT).

Exclusion criteria consisted of pregnancy, chronic diseases such as hypothyroidism, kidney failure, liver failure, $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ (morbid obesity), a history of cancer or thromboembolic disease and the use of any medication that could interfere with coagulation or fibrinolysis such as aspirin, heparin, anticoagulants, antiplatelet drugs or hormones.

The study was approved by the institution's internal review board under reference number 800/2010 and all the participants signed an informed consent form.

Laboratory tests

Blood sampling

All samples were collected between 7:30 and 10:00 am (to avoid the effect of the daily variation in the hemostatic system), after at least 12 hours fasting, from the antecubital vein in the left arm, with minimal or no venous occlusion (protracted venous occlusion may stimulate PAI-1 production by the endothelial cells and alter the results of other markers of hemostasis). Blood sampling was performed between the 3rd and the 9th days of the menstrual cycle, or more than 60 days after the last menstrual period for the women with PCOS.

To measure the markers of hemostasis (TAFI, D-dimer, PAI-1 and TGT), 14 ml of peripheral blood were collected in 3.8% sodium citrate in a proportion of 9:1 and immediately centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes, following which the plasma was divided into aliquots of 400µL and stored in a freezer at -80°C until analysis.

For the biochemical and hormonal measurements (glucose, insulin, total testosterone and free testosterone), 14 ml of peripheral blood were collected, 4 ml in a tube containing sodium citrate and sodium fluoride to measure fasting glucose and 10 ml in a dry tube without EDTA to measure insulin, total testosterone and free testosterone.

Analyses

Fasting glucose was evaluated using a colorimetric enzymatic method (Roche/Hitachi 904/911 Modular ACN 249, Indianapolis, USA), the results being expressed as mg/dl. To evaluate insulin levels (µIU/ml), a solid-phase two-site sequential chemiluminescent immunometric assay (Immulin/Immulin 1000, Siemens,

Los Angeles, USA) was used. Insulin resistance was indirectly estimated according to the homeostasis model of assessment - insulin resistance (HOMA-IR).

An electrochemiluminescence assay (Cobas E-411, Roche, Mannheim, Germany) was used to evaluate total testosterone, expressed as ng/ml, while free testosterone was measured using solid-phase radioimmunoassay (Beckman Coulter DSL 4900, Prague, Czech Republic) with results expressed as pg/ml.

Markers of hemostasis

TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) was measured in an STA compact coagulometer (Diagnostica STAGO, Asnières sur Seine, France) using a chromogenic assay with a Stachrom® TAFI kit (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France). TAFI activity in the plasma of normal individuals is 55-155%.

Serum *D-dimer*, a product of fibrin degradation, was analyzed in a BCS-XP automated coagulometer (Siemens, Marburg, Germany) using a polystyrene particle-enhanced immunoturbidimetric assay in which polystyrene particles were covalently coated with specific monoclonal antibody (Innovance® D-dimer kit, Siemens, Marburg, Germany). The reference value for this test is < 0.5 mg/L.

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) was measured in a BCS-XP automated coagulometer using a chromogenic method (Berichrom PAI® kit, Siemens, Marburg, Germany). The reference value for this test is 2.0–7.0 U/ml.

The *thrombin generation test* (TGT), used to determine *endogenous thrombin potential* (ETP), was performed in a BCS-XP automated coagulometer and measured by a chromogenic method (Innovance® ETP kit, Siemens, Marburg, Germany), with results expressed in accordance with the thrombogram obtained, which included the following

parameters: the lag time (T lag), time to peak thrombin generation (Tmax), the peak concentration (Cmax) and the area under the thrombin generation curve (AUC).

To determine the *endogenous thrombin potential*, an analysis software program was used to generate the following parameters:

- T lag: This represents the time until the initial thrombin burst. Value expressed in seconds.
- Tmax: This represents the time to peak thrombin generation, expressed in seconds.
- Cmax: This represents peak thrombin generation, expressed in mA/min.
- AUC or ETP: This represents the area under the thrombin generation curve, expressed in mA of thrombin (18). The technique was performed and measured over a 20-minute period using the BCS® system.

Statistical analysis

Calculation of sample size was based on the difference between the measurements of TAFI, D-dimer and PAI-1 between women with PCOS and women with normal ovarian function according to the study conducted by Oral et al. in 2009 (19).

Based on these differences, for a significance level of 5% and power of the test of 80%, the sample size necessary to find statistically significant differences between the groups using Student's t-test for paired samples would be 45 subjects in each group.

The Kolmogorov-Smirnov test was used to confirm the normality of the quantitative variables of the samples. An analysis was conducted to compare the two groups (PCOS and controls). Student's t-test for independent samples was used to compare quantitative

variables with normal or parametric distribution. When the distribution of variables was not close to normal, the Mann-Whitney test was used to compare the two groups.

The correlation between the markers of hemostasis and the clinical and laboratory variables was evaluated in the two groups using Pearson's correlation coefficient.

The data are presented as means and standard deviations. Significance level was defined as 5% ($p < 0.05$). The SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS, Inc., Chicago, Ill, USA), version 15.0 for Windows, was used for data processing and analysis.

Results

Since the PCOS and the control groups were paired one by one for age and BMI, the study participants were all young (26.13 ± 4.31 and 26.22 ± 4.28 years, respectively) and overweight (29.32 ± 6.37 and 29.25 ± 6.32 kg/m², respectively) (Table 1). However, although BMI was similar in the two groups, fat distribution was different, with a greater concentration of fat around the waist region in the women with PCOS (0.79 ± 0.08 and 0.76 ± 0.05 , $p = 0.03$). There was a greater incidence of clinical hyperandrogenism in the women with PCOS compared to the control group (Ferriman-Gallwey index = 9.42 ± 5.32 ; 0.62 ± 0.83 ; $p < 0.01$, respectively) and the same was true for total testosterone (0.53 ± 0.30 ; 0.30 ± 0.29 ng/ml; $p < 0.01$) and free testosterone (1.42 ± 1.00 ; 0.88 ± 0.32 pg/ml; $p = 0.02$). There were no statistically significant differences between the groups with respect to glucose or insulin measurements or in HOMA-IR (Table 1).

Regarding hemostatic markers, the only statistically significant difference found between the two groups was in T lag ($p = 0.03$), meaning that thrombin generation was faster in the group of women with PCOS compared to controls. There were no

differences between the groups with respect to the other markers (TAFI, D-dimer and PAI-1) or in the other TGT parameters (Tmax, Cmax and AUC) (Table 2).

The clinical and laboratory variables correlated differently with the markers of hemostasis in the two groups. With respect to the clinical variables, in the women with PCOS, age correlated positively with D-dimer and PAI-1 ($r=0.30$; $p=0.04$; $r=0.36$; $p=0.01$) and negatively (or inversely) with T lag and Tmax ($r=-0.37$, $p=0.01$; $r=-0.29$, $p=0.04$, respectively). In these women, there was also a strongly positive correlation of BMI and waist circumference with TAFI ($r=0.49$, $p<0.01$; $r=0.46$, $p<0.01$), D-dimer ($r=0.40$, $p<0.01$; $r=0.48$, $p<0.01$), PAI-1 ($r=0.53$, $p<0.01$; $r=0.44$, $p<0.01$), Cmax ($r=0.37$, $p=0.01$; $r=0.32$, $p=0.03$) and AUC ($r=0.41$, $p<0.01$; $r=0.34$, $p=0.02$). Hip circumference correlated positively with D-dimer and PAI-1 ($r=0.39$, $p<0.01$; $r=0.28$, $p=0.05$, respectively) and waist/hip ratio with TAFI ($r=0.49$, $p<0.01$), D-dimer ($r=0.38$, $p=0.01$) and PAI-1 ($r=0.48$, $p<0.01$). With respect to the laboratory variables in women with PCOS, a positive correlation was found between glucose and TAFI ($r=0.42$, $p<0.01$), while insulin and HOMA-IR correlated positively with PAI-1 ($r=0.38$, $p=0.01$; $r=0.36$, $p=0.01$), respectively. Free testosterone correlated positively with Cmax ($r=0.31$, $p=0.03$) and AUC ($r=0.39$, $p<0.01$) (Table 3).

Discussion

This study compared young, overweight women with a diagnosis of PCOS and women of the same age and BMI who did not have PCOS. The results show that of the hemostatic markers evaluated the only statistically significant difference between the groups was in thrombin generation lag-time. Therefore, in the women with PCOS the time until the initial thrombin burst was shorter compared to the control group, showing

that in this population thrombin generation is faster. This finding suggests a greater risk of hypercoagulability. There were no differences between the groups with respect to the parameters comprising the thrombin generation test (TGT), which evaluates the time to peak thrombin generation (Tmax), the peak concentration of thrombin (Cmax) and the area under the thrombin generation curve (AUC) corresponding to the total amount of thrombin generated, when each factor was evaluated individually. In addition, there were no statistically significant differences between the groups with respect to any of the other markers (TAFI, D-dimer and PAI-1).

To the best of our knowledge, there are no studies in the literature comparing these four markers of hemostasis (TAFI, D-dimer, PAI-1 and TGT) in women with PCOS and women with normal ovarian function, paired by age and BMI. As far as we know, this is also the first study to evaluate endogenous thrombin potential by TGT in women with PCOS.

States of hyper- or hypocoagulability may be the consequence of a large number of diseases. In the literature, various laboratory tests have been developed to identify alterations in the functioning of the coagulation system; however, a single laboratory parameter that would be increased in all forms of hypercoagulability and, likewise, would be lower in all forms of hypocoagulability, is yet to be determined. Such a test would be extremely useful for detecting a tendency towards thromboembolism and for discovering drug-induced hypocoagulability (20). In this respect, endogenous thrombin potential, measured by the thrombin generation test, has been suggested as a good indicator of coagulability (20-22).

TGT is a recently developed test that measures the interaction capacity between all the plasmatic components that result in the formation of the fibrin clot. For this reason, it is

considered a good indicator of coagulation. Therefore, the pioneering evaluation of TGT, and hence ETP, in women with PCOS is extremely interesting, since it permits the behavior of the hemostatic system of this group to be evaluated as a whole (20-22).

Some studies conducted over recent years have investigated hemostatic markers in PCOS because risk factors such as obesity, insulin resistance and hyperandrogenism are more common in this population of women (23).

The role of TAFI as a possible risk factor for thrombotic disease has yet to be completely clarified (24-27). While some studies report that high levels of TAFI represent a risk factor for deep vein thrombosis and ischemic stroke, other studies have failed to confirm these findings or have reported a protective effect (28,29).

The present study failed to find any difference in TAFI in the two groups evaluated, in agreement with the findings of Erdogan et al. (30). Nevertheless, other authors have reported conflicting results (19,31). The differences in these results could possibly be explained by the methods used to analyze TAFI, since the majority of the studies used quantitative and not qualitative methods. Depending on the method used to analyze TAFI (enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA] or a chromogenic method), conflicting results may be found, which may be explained in part because the antibody used in the ELISA system, in addition to recognizing the TAFI antigen, also recognizes fragments of it, yielding overestimated results (32,33).

Therefore, the chromogenic technique is the most appropriate for analyzing TAFI and was the method of choice in this study. Guimarães et al. reported that chromogenic analysis is based on the complete activation of TAFI and on similar activity of all the TAFI isoforms against the synthetic substrate, thus avoiding errors in interpreting results (32).

It is also important to emphasize that the methods used to evaluate TAFI activity in plasma (i.e. qualitative methods such as the chromogenic technique used here) correlate better with the *in vivo* state. Therefore, the TAFI measured in the present study represents TAFIa, generated by the activation of TAFI by the thrombin-thrombomodulin complex or by plasmin. Since the majority of the studies in the international literature used ELISA, it is impossible to compare their findings with the results of the present study (19).

D-dimer is a product of fibrin degradation and acts as a marker of fibrinolysis and hypercoagulability. Elevated D-dimer levels are indicative of fibrinogen and fibrin turnover. An increase in the levels of this marker is suggestive of an increase in thrombogenesis (34).

No difference in D-dimer values was found in the present study between the two groups. In 2011, Mannerås-Holm et al. reported similar results in a study in which the PCOS and control groups were paired for BMI, age and insulin (35). Karakurt et al. and Yildiz et al. also obtained similar results (31,36). However, other authors have reported an increase in D-dimer levels in the plasma of women with PCOS (19,34).

Comparison of the present findings concerning PAI-1 with those of other studies in the literature shows conflicting results. Some authors found high PAI-1 levels in women with PCOS (12,19,35,37,38), while others, in agreement with the findings of the present study, found no statistically significant differences compared to controls (11,13,39).

PAI-1 is produced by the adipocytes, endothelial cells and hepatocytes in response to hormonal, metabolic and inflammatory stimuli (35). It is considered the principal inhibitor of fibrinolysis and is the most extensively studied marker of hemostasis in the metabolic syndrome and in women with PCOS (40-42). The increase in PAI-1 activity is associated with hypofibrinolysis and may contribute to the development of deep vein thrombosis (43,44). Increased PAI-1 activity appears to be more common in

women with PCOS who have insulin resistance (35,45-47), which may explain the fact that in the present study no difference was found between the two groups of evaluation, since glucose and insulin levels and HOMA-IR were similar. Furthermore, women with morbid obesity or a diagnosis of type 2 diabetes were not included in this study.

The discrepancies with respect to the various fibrinolytic parameters reflect the complexity of fibrinolysis as a dynamic process in which a great variety of stimulating and inhibiting molecules is involved (28,48,49). Added to this is the fact that PCOS is a heterogeneous disorder that may aggravate metabolic disorders as the woman ages.

Nevertheless, the correlation between the coagulation markers and the clinical and laboratory variables of women with PCOS revealed compelling results.

In the PCOS group, age correlated positively with D-dimer and PAI-1 and negatively (or inversely) with T lag and Tmax. Therefore, these results suggest that, as a woman ages, an increase occurs in D-dimer and PAI-1 levels, augmenting the risk of hypofibrinolysis. In addition, a reduction occurs both in the time until the initial thrombin burst and in the time to peak thrombin generation, suggesting a state of hypercoagulability.

The variables BMI, waist circumference, hip circumference and waist/hip ratio correlated positively and often strongly with various hemostatic markers in the women with PCOS, emphasizing the role of obesity as a risk factor of thromboembolism. It has been well-established that both overweight and android obesity with increased weight circumference constitute risk factors for CVD (50-54). These correlations were not found in the controls without PCOS despite the fact that these women had the same BMI as the women in the study group. These differences may suggest that, in women with polycystic ovary syndrome, fat distribution with a greater concentration of fat around the waist may exert a different effect on hemostatic markers. Therefore, in agreement with the

literature, these results suggest that women with PCOS are at a greater risk of hemostatic disorders, which would be intensified by the presence of obesity (15,19,55,56).

With respect to the laboratory variables in the PCOS group, a positive correlation was found between glucose and TAFI, while insulin and HOMA-IR were positively associated with PAI-1. In 2005, Wannamethee et al. concluded that insulin resistance and the metabolic syndrome correlated positively with hemostatic markers and inflammation, which may be relevant for its associations with CVD and VTE (45).

To conduct a more thorough evaluation of the effect of insulin or insulin resistance on the markers of the hemostatic system, groups of women with PCOS with and without insulin resistance would have to be compared. In this study, these analyses were limited because of the few women with PCOS and insulin resistance.

In the women with PCOS, free testosterone correlated positively with Cmax measurements and the area under the thrombin generation curve, suggesting an increased prothrombotic risk. Likewise, Yidiz et al. (36) found a negative correlation between global fibrinolytic capacity and free testosterone, indicating a direct association between hypofibrinolysis and hyperandrogenemia. Winkler et al. (57) reported a positive correlation between PAI-1 and free testosterone. However, those investigators used a different method of evaluation. Since we were unable to find studies in the literature evaluating the thrombin generation test (TGT) in PCOS, it proved impossible to compare the results of the present study with other previously conducted studies.

Many points remain to be completely clarified regarding the association between PCOS and coagulation. One of the strong points of this study was the fact that the two groups evaluated were paired for age and BMI, thus reducing the confounding effect of these variables. Moreover, this was the first study to use the thrombin generation test (TGT) to

evaluate coagulation in women with PCOS. The principal limitation of the study may be the few women with insulin resistance, indicating a need to carry out further studies involving comparative analyses of women with PCOS with and without insulin resistance.

Evaluating the behavior of some markers of the hemostatic system and their correlation with clinical, hormonal and metabolic variables in patients with PCOS, in addition to conducting prospective studies with women of different age groups, may contribute towards identifying those women at a greater risk of CVD and VTE. This will enable risk factors to be managed and will direct therapeutic strategies for this syndrome.

In conclusion, thrombin generation is faster in young women with PCOS compared to young women with the same BMI but who do not have PCOS, indicating a greater risk of hypercoagulability. Android fat distribution, older age, insulin resistance and free testosterone levels may directly affect some markers of hemostasis, increasing thromboembolic risk.

References

1. Azziz R, Woods K, Reyna R, Key TJ, Stephens KC, Knochenhauer ES. The prevalence of polycystic ovary syndrome among unselected consecutive premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2745-9.
2. Adams J, Polson DW, Frank S. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;293:355-9.
3. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4237-45.
4. Teede HJ, Misso ML, Deeks AA. Assessment and management of polycystic ovary syndrome: summary of an evidence-based guideline. *Med J Aust* 2011;195:s65-s112.
5. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2038-49.
6. Mather KJ, Kwan F, Corenblum B. Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity. *Fertil Steril* 2000;73:150-6.
7. Soares EMM, Azevedo GD, Gadelha RGN, Lemos TMAM, Maranhão TMAO. Prevalence of the metabolic syndrome and its components in Brazilian women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008;89:649-55.

8. Fauser B, Tarlatziz B, Rebar R, Legro R, Balen A, Lobo R et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM – Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril* 2012;97:28-38.
9. Alexander CJ, Tangchitnoib EP, Lepor NE. Polycystic ovary syndrome: a major unrecognized cardiovascular risk factor in women. *Rev Cardio Med* 2009;10:83-90.
10. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.
11. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Lindstedt G, Tengborn L. Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1994;61:455-60.
12. Atiomo WU, Bates SA, Condon JE, Shaw S, West JH, Prentice AG. The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1998;69:236-41.
13. Atiomo WU, Fox R, Condon JE, Shaw S, Friend J, Prentice AG, Wilkin TJ. Raised plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is not an independent risk factor in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol* 2000;52:487-92.
14. Mak W, Dokras A. Polycystic ovarian syndrome and the risk of cardiovascular disease and thrombosis. *Semin Thromb Haemost* 2009;35:613-20.
15. Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ. Coagulopathies and thrombosis: usual and unusual causes and associations, Part II. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:591-6.

16. Rotterdam ESHRE/ASRM – Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81:19-25.
17. De Ugarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril* 2005;83:1454-60.
18. Devreese K, Wijns W, Combes I, Van kerckhoven S, Hoylaerts MF. Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost* 2007;98:600-13.
19. Oral B, Mermi B, Dilek M, Alanoğlu G, Sütçü R. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and other hemostatic parameters in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:110-6.
20. Hemker HC, Béguin S. Endogenous thrombin potential. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F (ed.). *Laboratory techniques in thrombosis - a manual*. 2nd ed., The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1999. p.63-77.
21. Hemker HC, Willems GM. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost* 1986;56:9-17.
22. Hemker HC, Giesen P. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.
23. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W et al. The androgen excess and PCOS society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009;91:456-88.

24. Guimarães ACH, Bertina RM, Rijken DC. A new functional assay of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* 2005;3:1284-92.
25. Mutch J, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and alpha2-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombin and plasma clots. *J Thromb Haemost* 2007;5:812-7.
26. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2511-8.
27. Van Tilburg NH, Rosendal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000;95:2855-9.
28. Franco RF. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. *Medicina, Ribeirão Preto* 2001;34:229-37.
29. Willemse JL, Matus V, Heylen E, Mezzano D, Hendriks DF. Influence of the Thr325Ile polymorphism on procarboxypeptidase U (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) activity-based assays. *J Thromb Haemost* 2007;5:872-5.
30. Erdogan M, Karadeniz M, Alper GE. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and cardiovascular risk factors in polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;16:143-7.
31. Karakurt F, Gumus I, Bavbek N. Increased Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels as a clue for prothrombotic state in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:491-7.
32. Guimarães AHC, Van Tilburg NH, Vos HL, Bertina RM, Rijken DC. Association between thrombin activatable fibrinolysis inhibitor genotype and levels in plasma: comparison of different assays. *Br J Haematol* 2004;124:659-65.

33. Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P et al. TAFI gene haplotypes, TAFI plasma levels and future risk of coronary heart disease: the PRIME study. *J Thromb Haemost* 2005;3:1503-10.
34. Kebapcilar L, Taner CE, Kebapcilar AG, Sari I. High mean platelet volume, low-grade systemic coagulation and fibrinolytic activation are associated with androgen and insulin levels in polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2009;280:187-93.
35. Mannerås-Holm L, Baghaei F, Holm G, Janson PO, Ohlson C, Lönn M et al. Coagulation and fibrinolytic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(4):1068-76.
36. Yildiz BO, Haznedaroglu IC, Kirazli S, Bayraktar M. Global fibrinolytic system is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3871-5.
37. Carmassi F, De Negri F, Fioriti R. Insulin resistance causes impaired vasodilatation and hypofibrinolysis in young women with polycystic ovary syndrome. *Thromb Res* 2005;116:207-14.
38. Burchall G, Linden MD, Teede H, Piva TJ. Hemostatic abnormalities and relationships to metabolic and hormonal status in polycystic ovarian syndrome. *Trends Cardiovasc Med* 2011;21:6-14.
39. Slopian R, Lewandowski K, Kolacz E, Zawilska K, Warenik-Szymankiewicz A. Comparison of fibrinolytic and metabolic system parameters in obese patients with polycystic ovary syndrome and woman with simple obesity. *Ginecol Endocrinol* 2006;22:651-4.

40. Morimoto Y, Yoshioka A, Imai Y, Takahashi Y, Minowa H, Kirita T. Haemostatic management of intraoral bleeding in patients with congenital deficiency of alpha2-plasmin inhibitor or plasminogen activator inhibitor-1. *Haemophilia* 2004;10:669-74.
41. Agren A, Wiman B, Stiller V, Lindmarker, P, Sten-Linder M, Carlsson A et al. Evaluation of low PAI-1 activity as a risk factor for hemorrhagic diathesis. *J Thromb Haemost* 2005;4:201-8.
42. Cesarman-Maus G, Hajjar A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology* 2005;129:307-21.
43. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thomson SG. Fibrinolytic factors and the risk of miocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT study group. European concerted action on thrombosis and disabilities. *Circulation* 1996;94:2057-63.
44. Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:1879-83.
45. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. The metabolic syndrome and insulin resistance: relationship to haemostatic and inflammatory markers in older non-diabetic men. *Atherosclerosis* 2005;181:101-8.
46. Kelly CJ, Lyall H, Petrie JR, Gould GH, Connel JM, Rumkley A, et al. A specific elevation in tissue plasminogen activator antigen in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3287-90.
47. Kitagawa N, Yano Y, Gabazza EC, Bruno NE, Araki R, Matsumoto K et al. Different metabolic correlations of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen

- activator inhibitor-1 in non-obese type-2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:150-7.
48. Jenny NS, Mann KG. Coagulation cascade: an overview. In: Loscalzo J, Schafer AI. *Thrombosis and Hemorrhage*. 2nd ed. Baltimore:Williams & Wilkins, 1998:3-27.
49. Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, Marder VJ. Overview of hemostasis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. *Hemostasis and Thrombosis. Basic principles and clinical practice*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:3-16.
50. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Di Biase S, Manguso F, Tauchmanova L et al. The increase of leukocytes as a new putative marker of low-grade chronic inflammation and early cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005; 90:2-5.
51. Wild RA, Van Nort JJ, Grubb B, Bachman W, Hartz A, Barthomoleu M. Clinical signs of androgen excess and risk factors for coronary heart disease. *Fertil Steril* 1990;42:945-9.
52. Carmina E, Chu MC, Longo RA, Rini GB, Lobo, RA. Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2545-9.
53. Fernandes JBF, Soares GM, Martins WP, Sá MFS, Ferriani RA, Reis RM et al. [Obesity and arterial structure alteration in young women with polycystic ovary syndrome]. *Rev Bras Ginecol Obst* 2009;31:342-7.

54. Cascela T, Palomba S, De Sio I. Visceral fat is associated with cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2008;23:153-9.
55. Vague P, Juhan-Vague I, Aillaud MF, Badier C, Viard R, Alessi MC et al. Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level and relative body weight in normal and obese subjects. *Metabolism* 1986;35:250-3.
56. Tarkun I, Cantürk Z, Arslan BC, Türemen E, Tarkun P. The plasminogen activator system in young and lean women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J* 2004;51:467-72.
57. Winkler UH. Effects of androgens and haemostasis. *Maturitas* 1996;24:147-55.

Table 1: Clinical and laboratory variables of women with PCOS (n = 45) and controls with normal ovarian function (n = 45) paired for age and body mass index

Clinical and laboratory variables	PCOS Group	Control Group	p-value
Age (years)	26.13 ± 4.31	26.22 ± 4.28	0.92
BMI (kg/m ²)	29.32 ± 6.37	29.25 ± 6.32	0.95
Waist circumference (cm)	87.78 ± 15.65	85.68 ± 11.54	0.47
Hip circumference (cm)	109.35 ± 11.95	111.75 ± 10.89	0.32
Waist/hip ratio	0.79 ± 0.08	0.76 ± 0.05	0.03
Ferriman-Gallwey index *	9.42 ± 5.32	0.62 ± 0.83	<0.01
Glucose (mg/dl)	83.71 ± 7.12	83.73 ± 6.31	0.99
Insulin (μIU/ml)*	6.96 ± 10.77	5.74 ± 5.93	0.25
HOMA-IR*	1.61 ± 2.25	1.21 ± 1.32	0.44
Total testosterone (ng/ml)*	0.53 ± 0.30	0.30 ± 0.29	<0.01
Free testosterone (pg/ml)*	1.42 ± 1.00	0.88 ± 0.32	0.02

HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance.

* Mann-Whitney test; the other variables were evaluated using Student's t-test for paired samples.

Variables expressed as means ± standard deviation.

Table 2: Hemostatic markers in the groups of women with PCOS (n = 45) and controls with normal ovarian function (n = 45), paired for age and body mass index

Hemostatic markers	PCOS Group	Control Group	p-value*
TAFI (%)	103.54 ± 19.07	109.57 ± 15.98	0.14
D-dimer (mg/L)	0.33 ± 0.28	0.37 ± 0.19	0.35
PAI-1 (U/ml)	3.20 ± 1.72	2.89 ± 1.51	0.38
TGT T lag (s)	25.65 ± 2.61	26.76 ± 2.11	0.03
Tmax (s)	60.42 ± 7.22	62.78 ± 6.72	0.12
Cmax (mA/min)	130.24 ± 14.64	129.71 ± 10.06	0.84
AUC=ETP (mA)	454.27 ± 56.35	443.04 ± 44.86	0.30

TAFI: thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; D-dimer: fibrin degradation product; PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; TGT: thrombin generation test; T lag (s): thrombin generation lag-time; Tmax (s): time to peak thrombin generation; Cmax (mA/min): the peak amount of thrombin generation; AUC (mA): area under the thrombin generation curve; ETP (mA): endogenous thrombin potential.

* Student's t-test for paired samples.

Variables expressed as means ± standard deviation

Table 3: Correlation between clinical and laboratory variables and markers of hemostasis in women with PCOS (n=45)

	TAFI		D-dimer		PAI-1		TGT							
	(%)		(mg/L)		(U/ml)		T lag		T max		C max		AUC	
	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*
Age (years)	0.28	NS	0.30	0.04	0.36	0.01	-0.37	0.01	-0.29	0.04	0.21	0.16	0.27	0.06
BMI (kg/m²)	0.49	<0.01	0.40	<0.01	0.53	<0.01	-0.09	NS	-0.12	NS	0.37	0.01	0.41	<0,01
WC (cm)	0.46	<0.01	0.48	<0.01	0.44	<0.01	-0.13	NS	-0.14	NS	0.32	0.03	0.34	0.02
HC (cm)	0.28	NS	0.39	<0.01	0.28	0.05	-0.13	NS	-0.19	NS	0.24	NS	0.28	NS
W/H ratio	0.49	<0.01	0.38	0.01	0.48	<0.01	-0.09	NS	-0.04	NS	0.24	NS	0.25	NS
FGI	0.25	NS	0.13	NS	0.03	NS	0.21	NS	0.07	NS	0.06	NS	0.07	NS
FG (mg/dl)	0.42	<0.01	0.13	NS	0.27	NS	-0.16	NS	-0.02	NS	-0.04	NS	0.08	NS
Insul (μIU/ml)	0.04	NS	0.05	NS	0.38	0.01	-0.10	NS	-0.18	NS	0.16	NS	0.19	NS
HOMA-IR	0.05	NS	0.01	NS	0.36	0.01	0.03	NS	-0.13	NS	0.18	NS	0.23	NS
TT (ng/ml)	-0.02	NS	0.04	NS	0.09	NS	-0.12	NS	-0.02	NS	0.20	NS	0.25	NS
FT (pg/ml)	0.30	NS	-0.04	NS	0.29	0.06	0.24	NS	0.21	NS	0.31	0.03	0.39	<0.01

BMI: body mass index; WC: waist circumference; HC: hip circumference; W/H ratio: waist/hip ratio; FGI: Ferriman-Gallwey index; FG: fasting glucose; Insul: fasting insulin; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; TT: total testosterone; FT: free testosterone. TAFI: thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; D-dimer: fibrin degradation product; PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; TGT: thrombin generation test; T lag (s): thrombin generation lag-time; Tmax (s): time to peak thrombin generation; Cmax (mA/min): the peak amount of thrombin generation; AUC (mA): area under the thrombin generation curve. * Pearson's correlation.

4. Conclusões

- Os marcadores de fibrinólise (TAFI, PAI-1 e D-dímero) não diferiram entre os grupos de mulheres com SOP e com função gonadal normal.
- A T lag do teste de geração de trombina (TGT) foi significativamente menor nas mulheres com SOP do que nas controles, isto é, mulheres jovens com SOP geram trombina mais rapidamente que as controles de mesma idade e IMC, sugerindo maior risco de hipercoagulabilidade.
- Nas mulheres com SOP, níveis séricos dos marcadores de fibrinólise PAI-1 e D-dímero correlacionaram-se positivamente com os parâmetros clínicos idade, IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril e relação cintura-quadril, enquanto que o marcador TAFI correlacionou-se positivamente com IMC, circunferência da cintura e relação cintura-quadril, ressaltando o papel da obesidade como fator de risco tromboembólico. Dentre os parâmetros laboratoriais, a elevação do PAI-1 correlacionou-se com elevação da insulina e HOMA-IR, e a elevação dos níveis do TAFI, com glicemia.

- Na avaliação do teste de geração de trombina em mulheres com SOP, verificou-se que quanto maior a idade, mais rapidamente ocorre o início da geração de trombina (T lag) e menor o tempo para atingir o pico de sua formação (Tmáx), indicando que o avançar da idade aumenta o risco trombogênico. Os parâmetros IMC, circunferência da cintura e testosterona livre apresentaram correlação positiva direta com a concentração máxima de trombina (Cmáx) e com a área sob a curva (AUC) ou potencial de trombina endógena (ETP) do mesmo teste, reforçando que o ganho de peso e hiperandrogenismo laboratorial são fatores que se relacionam com maior risco de hipercoagulabilidade.

5. Referências Bibliográficas

1. Azziz R, Woods K, Reyna R, Key TJ, Stephens KC, Knochenhauer ES. The prevalence of polycystic ovary syndrome among unselected consecutive premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:2745-9.
2. Adams J, Polson DW, Frank S. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J Clin Res Ed.* 1986; 293:355-9.
3. Rotterdam ESHRE/ASRM – Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004; 81(5):19-25.
4. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W et al. The androgen excess and PCOS society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril.* 2009 Feb; 91(2):456-88.
5. Fauser B, Tarlatziz B, Rebar R, Legro R, Balen A, Lobo R et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM – Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril* 2012;97:28-38.
6. The ESHRE Capri Workshop Group. Hormones and cardiovascular disease in women. *Human Reproduction Update.* 2006; 12(5):483-97.

7. Ferriman DM, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol*. 1961; 21:1440-7.
8. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005; 112:2735-52.
9. Teede HJ, Misso ML, Deeks AA. Assessment and management of polycystic ovary syndrome: summary of an evidence-based guideline. *Med J Aust*. 2011; 195:s65-s112.
10. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:2038-49.
11. Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. Effects of medical therapy on insulin resistance and the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 2007; 30:471-8.
12. Mather KJ, Kwan F, Corenblum B. Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity. *Fertil Steril*. 2000; 73:150-6.
13. Grundy SM, Hansen B, Smith SC Jr, Cleeman JI, Kahn RA. Clinical management of metabolic syndrome: report of The American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute/American Diabetes Association conference of scientific issues related to management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:19-24.

14. Soares EMM, Azevedo GD, Gadelha RGN, Lemos TMAM, Maranhão TMAO. Prevalence of the metabolic syndrome and its components in Brazilian women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008; 89(3):649-55.
15. World Health Organization. Obesity prevening and managing. The Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva: WHO; 1997. 276 p.
16. Pudder J, Varga S, Kraenzlin M, Geyter C, Keller U, Müller B. Central fat excess in polycystic ovary syndrome: relation to low-grade imflamation and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2005; 90:6014-21.
17. De Ugarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril*. 2005; 83(5):1454-60.
18. Vasques AC, Rosado LE, Cássia G, Alfenas R, Geloneze B. Critical analysis on the use of the homeostasis model assessment (HOMA) indexes in the evaluation of the insulin resistance and the pancreatic beta cells functional capacity. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52(1):32-9.
19. Geloneze B, Tambascia MA. [Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance]. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006 Abr; 50(2): 208-15.
20. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixtured population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2006; 72: 219-20.

21. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Od A. Polycystic ovary syndrome and risk factor model based on a prospective population study of woman. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1992; 71:599-604.
22. Kravariti M, Naka KK, Kalantaridou NS, Kazakos N, Katsouras CS, Makrigiannakis CS et al. Predictors of endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:5088-95.
23. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina pectoris Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 332:635-41.
24. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Lindstedt G, Tengborn L. Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1994; 61:455-60.
25. Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*. 2001; 34:229-37.
26. Jenny NS, Mann KG. Coagulation cascade: an overview. In: Loscalzo J, Schafer AI. *Thrombosis and Hemorrhage*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p.3-27.
27. Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, Marder VJ. Overview of hemostasis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. *Hemostasis and Thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p.3-16.

28. Lourenço DM. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. *Revista da Sociedade Cardiológica do Estado de São Paulo*. 1997; 7(3):333-9.
29. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost*. 1999; 82:259-70.
30. Morimoto Y, Yoshioka A, Imai Y, Takahashi Y, Minowa H, Kirita T. Haemostatic management of intraoral bleeding in patients with congenital deficiency of alpha2-plasmin inhibitor or plasminogen activator inhibitor-1. *Haemophilia*. 2004; 10:669-74.
31. Repine T, Oswald M. Menorrhagia due to a qualitative deficiency of plasminogen activator inhibitor-1: case report and literature review. *Clinical Application Thrombosis Haemostatic*. 2004; 10:293-6.
32. Agren A, Wiman B, Stiller V, Lindmarker P, Sten-Linder M, Carlsson A et al. Evaluation of low PAI-1 activity as a risk factor for hemorrhagic diathesis. *J Thromb Haemost*. 2005; 4:201-8.
33. Cesarman-Maus G, Hajjar A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. 2005; 129:307-21.
34. Guimarães ACH, Bertina RM, Rijken DC. A new functional assay of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2005; 3:1284-92.
35. Mutch J, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and alpha2-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombin and plasma clots. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:812-7.
36. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:2511-8.

37. Atiomo WU, Bates SA, Condon JE, Shaw S, West JH, Prentice AG. The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1998; 69(2):236-41.
38. Van Tilburg NH, Rosendal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood*. 2000; 95:2855-9.
39. Oral B, Mermi B, Dilek M, Alanoğlu G, Sütçü R. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and other hemostatic parameters in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2009 Feb; 25(2):110-6.
40. Andolf E, Casslen B, Jorgensen C, Buchhave P, Lecander I. Fluid characteristics of benign ovarian cysts: correlation with recurrence after puncture. *Obstet Gynecol*. 1995; 86:529-35.
41. Piquette GN, Crabtree ME, Imam E-D, Milki A, Polan L. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human cumulus and granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 76:518-23.
42. Potter van Loon BJ, Kluft C, Radder JK, Blankenstein MA, Meinders AE. The cardiovascular risk factor plasminogen activator inhibitor type 1 is related to insulin resistance. *Metabolism*. 1993; 42:945-9.
43. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. The metabolic syndrome and insulin resistance: relationship to haemostatic and inflammatory markers in older non-diabetic men. *Atherosclerosis*. 2005; 181:101-8.
44. Hemker HC, Béguin S. Endogenous thrombin potential. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F(ed). *Laboratory techniques in thrombosis - a*

manual. 2nd ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.63-77.

45. Hemker HC, Willems GM. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost.* 1986; 56(1):9-17.
46. Hemker HC, Giesen P. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003; 33(1):4-15.
47. Yildiz BO, Haznedaroglu IC, Kirazli S, Bayraktar M. Global fibrinolytic system is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(8):3871-5.
48. Slopian R, Lewandowski K, Kolacz E, Zawilska K, Warenik-Szymankiewicz A. Comparison of fibrinolytic and metabolic system parameters in obese patients with polycystic ovary syndrome and woman with simple obesity. *Ginecol Endocrinol.* 2006; 22(11):651-4.
49. Kelly CJ, Lyall H, Petrie JR, Gould GH, Connel JM, Rumkley A et al. A specific elevation in tissue plasminogen activator antigen in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(7):3287-90.
50. Atiomo WU, Fox R, Condon JE, Shaw S, Friend J, Prentice AG et al. Raised plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is not an independent risk factor in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol.* 2000; 52:487-92.
51. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Di Biase S, Manguso F, Tauchmanova L et al. The increase of leukocytes as a new putative marker of low-grade chronic inflammation and early cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2005; 90:2-5.

52. Wild RA, Van Nort JJ, Grubb B, Bachman W, Hartz A, Barthomoleu M. Clinical signs of androgen excess and risk factors for coronary heart disease. *Fertil Steril*. 1990; 42:945-9.
53. Mak W, Dokras A. Polycystic ovarian syndrome and the risk of cardiovascular disease and thrombosis. *Semin Thromb Haemost*. 2009; 35:613-20.
54. Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ. Coagulopathies and thrombosis: usual and unusual causes and associations, Part II. *Semin Thromb Hemost*. 2009; 35:591-6.
55. Azziz R, Marin C, Hoq L. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:4650-8.
56. March WA, Moore VM, Willson KJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010; 25:544-51.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/08/10
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 800/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0620.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “MARCADORES DO SISTEMA HEMOSTÁTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Raquel Marques Furtado de Mendonça Louzeiro

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/08/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/08/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Avaliar os marcadores do sistema hemostático e sua associação com parâmetros clínicos e laboratoriais em mulheres com SOP.

III - SUMÁRIO

Estudo transversal para avaliação de 45 mulheres com SOP e 45 mulheres com função gonadal normal acompanhadas no CAISM, UNICAMP-SP, que preencherem os critérios de inclusão. Mulheres com função gonadal normal serão pareadas ao grupo de mulheres com SOP por idade em anos completos (± 2 anos) e IMC no mesmo grupo de estratificação, e avaliadas quanto à sua associação com parâmetros clínicos (relação cintura-quadril, índice Ferriman-Galleyway) e laboratoriais (dosagem de alguns marcadores de hemostasia, glicemia, insulina, testosterona total e livre). Análise dos dados: Serão comparados entre os grupos de mulheres com e sem SOP através do teste T Student pareado. A correlação entre os marcadores de hemostasia e alguns parâmetros clínicos e laboratoriais de mulheres com SOP será avaliada pelo índice de Pearson. Nível de significância será de 5%.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto apresenta-se redigido de forma clara, com metodologia adequada. Os critérios de inclusão, exclusão e descontinuação dos sujeitos estão definidos corretamente; cálculo do tamanho amostral e análise estatística muito foram embasados por cálculos estatísticos coerentes. Os aspectos éticos estão discutidos no corpo do projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e adequado às recomendações. O orçamento é detalhado e prevê ressarcimento de custos com alimentação para as voluntárias. Considero o projeto adequado a esse tipo de estudo.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de agosto de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

6.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

MARCADORES DO SISTEMA HEMOSTÁTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Pesquisadora responsável: MARIA RAQUEL M. F. MENDONÇA LOUZEIRO

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. CRISTINA LAGUNA BENETTI PINTO

Nome: _____
Idade: _____ HC: _____ RG: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ Estado: _____
Telefones de contato: _____

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é uma doença caracterizada por alterações na menstruação, surgimento de acne e pêlos em várias partes do corpo, além do aparecimento de ovários aumentados e com cistos ao ultrassom. Mulheres com SOP podem apresentar fatores que se relacionam com maior probabilidade de alterações na coagulação do sangue. Este estudo pretende comparar alguns marcadores de coagulação em mulheres com e sem SOP além de identificar se existe alguma associação entre esses marcadores e parâmetros clínicos e laboratoriais em mulheres com SOP. Será realizado em voluntárias com diagnóstico de SOP e em mulheres sem SOP, no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), UNICAMP, São Paulo, SP.

Eu, abaixo assinada, aceito participar voluntariamente deste estudo para medir o nível de algumas substâncias em meu sangue (exames bioquímicos, hormonais e de hemostasia).

Estou ciente de que, para participar deste estudo, precisarei vir ao hospital (CAISM) entre uma e duas vezes e que será também necessário ficar em jejum por 12 horas antes de retirar 30 ml (3 colheres de sopa) de sangue de uma veia do meu braço. Eventualmente, poderei ser reconvocada a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame. Foi explicado que o material usado para coleta de sangue é descartável (não foi usado em outra pessoa antes de ser usado em mim e também não será utilizado após em qualquer outra pessoa). Os riscos a que estarei sujeita seriam certo desconforto e/ou pequena dor na coleta de sangue, assim como formação de hematoma (mancha arroxeadada no local da punção), não havendo outros riscos previsíveis de maior gravidade. O benefício esperado nesta participação seria a minha contribuição para melhor entendimento desta doença. Caso algum dos meus exames tenha resultado alterado, independentemente do grupo a que eu pertença (com ou sem SOP),

serei informada do fato e encaminhada para tratamento. Fui também esclarecida que, para participação deste projeto, não poderei estar utilizando método contraceptivo hormonal algum (pílulas, adesivos, anel vaginal, injetáveis, DIU medicado) por três meses, e que, havendo o desejo de contracepção, receberei gratuitamente preservativos. Outras informações:

- a) Haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em consequência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
- b) Estarei livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo e isto não me acarretará prejuízo algum em qualquer outro tratamento ou procedimento de que possa necessitar futuramente em qualquer serviço deste hospital.
- c) Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão utilizadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, sendo minha identidade sempre preservada.
- d) Poderei tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, havendo o compromisso da pesquisadora em respondê-las.
- e) O material colhido neste estudo será utilizado para os objetivos propostos e a pesquisadora deseja saber se concordo que este material possa ser armazenado por até cinco anos, no Hemocentro da UNICAMP, tendo conhecimento de que não será utilizado em pesquisas genéticas. Eu:
() Autorizo o uso futuro para dosagem de novas substâncias que não as descritas neste projeto.
() NÃO autorizo o uso futuro para dosagem de novas substâncias que não as descritas neste projeto.
- f) Em caso de nova pesquisa com material biológico armazenado, ela será submetida a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP.

Em caso de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP pelo telefone (19) 3521-8936 ou email: cep@fcm.unicamp.br.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo, e concordo em participar deste estudo após estar absolutamente esclarecida dos seus propósitos e receber uma cópia deste documento.

Campinas, _____/_____/_____

Maria Raquel M. F. M. Louzeiro
Pesquisadora responsável
Fone: (19) 3521-9306

Assinatura da voluntária

6.3. Anexo 3 – Ficha de Coleta de Dados

FORMULÁRIO

MARCADORES DO SISTEMA HEMOSTÁTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Pesquisador: _____ Nº estudo: _____

Data da coleta: |__|_|/|__|_|/|__|_|

Consulta	Data	Resultado	Retorno

Dados de Identificação:

Nº Caso: _____ Nº Controle: _____

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Contato: _____

Telefone: _____

Contato: _____

Nº HC: _____ Nº GE: _____

1. Identificação

Nº Caso: _____

Nº Controle: _____

1.1 Quantos anos completos a Sra. tem? |__| |__| anos

1.2. Qual a cor da sua pele? [1] Branca [2] Preta [3] Amarela [4] Parda
[5] Indígena

1.3. Qual o estado marital da Sra.?

[1] Solteira [2] Casada [3] Vive junto [4] Divorciada [5] Viúva [6] Outra

1.4. Se foi à escola, qual a última série que completou? [] Não fui à escola
[] _____

2. Antecedentes Patológicos

2.1. A Sra. tem:

A) HAS	[1] Sim	[2] Não
B) Diabetes	[1] Sim	[2] Não
C) Endocrinopatias	[1] Sim	[2] Não
D) SAAF	[1] Sim	[2] Não
E) Outros	[1] Sim Qual? _____	[2] Não

2.2 A Sra. fuma? [1] Sim [2] Não → passe para 2.5

2.3. Quantos cigarros por dia? |__| |__| cigarros

2.4. Há quanto tempo? _____

2.5. A Sra. usa de rotina algum medicamento? [Sim] [Não] → passe para 3

2.6. Qual medicamento? _____

- | | | | |
|---------------|-----------------------|-----------|----------------|
| A) HAS | [1] Sim | [2] Não | [3] Não sabe |
| B) Diabetes | [1] Sim | [2] Não | [3] Não sabe |
| C) Obesidade | [1] Sim | [2] Não | [3] Não sabe |
| D) Hirsutismo | [1] Sim | [2] Não | [3] Não sabe |
| E) Outros | [1] Sim Qual? _____ | [2] Não | [3] Não sabe |

- 4.1. Qual a data da sua última menstruação? |__|__|__|__|__|__|
- 4.2. A Sra. usa algum método contraceptivo? [1] Sim [2] Não → passe para 4.4
- 4.3. Qual o método? [1] Preservativo masculino [2] DIU de cobre [3] Laqueadura
[4] Vasectomia [5] Outros (preservativo feminino, diafragma, comportamental) _____
- 4.4. Com quantos anos a Sra. menstruou pela primeira vez? |__|__|__| anos
- 4.5. Quantas gestações a Sra. já teve? G____ P____ A____ C____
- 4.6. Como é o ciclo menstrual da Sra.?
- [1] Regular [2] Espaniomenorreia [3] Amenorreia [4] Polimenorreia

- 5.1. Peso: _____ Kg
- 5.2. Altura: _____ m
- 5.3. IMC: _____ Kg/m²
- 5.4. Medida da cintura: _____ cm
- 5.5. Medida do quadril: _____ cm
- 5.6. Relação cintura-quadril: _____
- 5.7. Acne: [1] Sim Grau: _____ Local: _____ [2] Não
- 5.8. Acantose nigricans: [1] Sim Local: _____ [2] Não
- 5.9. Índice de Ferriman-Galleway: |__| |__|

6. Resultado de exames

	Mês/Ano	Resultado
A) Glicemia		mg/dl
B) Insulina		μUI/ml
C) HOMA-IR		
D) TT		ng/ml
E) TL		pg/ml
F) PAI-1		U/ml
G) TAFI		%
H) T lag		s
I) T máx		s
J) Cmáx		mA/min
L) AUC=ETP		mA
I) D-dímero		mg/L

6.1. USG pélvico (transvaginal ou transabdominal): _____
