

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
ENDOCRINOLOGIA**

**NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO E FIBRINOGENO EM PACIENTES  
COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS: ASSOCIAÇÃO  
COM MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS, PERFIL HORMONAL E  
METABÓLICO**

**ANDREA PRESTES NÁCUL**

**Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer**

**PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
ENDOCRINOLOGIA**

**NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO E FIBRINOGENO EM PACIENTES  
COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS: ASSOCIAÇÃO  
COM MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS, PERFIL HORMONAL E  
METABÓLICO**

**ANDREA PRESTES NÁCUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas – Endocrinologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer**

**PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2004**

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Poli Mara Spritzer, minha orientadora desde a iniciação científica, pela amizade, ensinamentos e exemplo a ser seguido de médica, pesquisadora e pessoa humana.

Aos colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica pela ótima convivência, ajuda mútua e momentos de aprendizado compartilhados.

Às bolsistas de iniciação científica Cláudia Dieckel Andrade e Patrícia Schwarz pelo auxílio na coleta dos dados e atendimento das pacientes.

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem Bittencourt Jr. pela disponibilidade e auxílio na realização da dosagem de óxido nítrico.

Ao Prof. Dr. Francisco Lhullier, pela disponibilidade e auxílio realização da dosagem de endotelina-1.

Aos colegas do Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia da UFRGS pela disponibilidade e auxílio no armazenamento do material da pesquisa.

À secretária Miriam Sant'Helena, pela disposição, auxílio e carinho em todos os momentos necessários.

À Iracema Vera Soares pela amizade e auxílio na coleta laboratorial das pacientes do estudo.

Ao PPG em Endocrinologia e ao GPPG do HCPA por disponibilizarem os meios para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, FAPERGS, PRONEX e FIPE/HCPA pelo apoio financeiro deste projeto.

À todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

À todas as pacientes que participaram deste estudo, pois são elas que nos instigam à pesquisa.

Aos meus pais, Leda e Augusto, meus irmãos, Miguel e Eduardo, que sempre me apóiam nas realizações, vibram nas vitórias e amparam nas dificuldades.

Ao Telmo, meu marido e futuro pai da nossa filha que está a caminho, meu grande amor e companheiro, pela compreensão nas horas em que me dediquei a este trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	03
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	08
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	12
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. Hiperandrogenismo feminino .....	13
1.2. Hirsutismo idiopático .....	14
1.3. Síndrome dos ovários policísticos .....	15
1.4. PCOS e fatores de risco cardiovasculares .....	16
1.5. Fisiopatologia do endotélio vascular .....	18
1.6. PCOS e disfunção endotelial .....	26
1.7. Fisiopatologia do sistema de coagulação e fibrinólise .....	28
1.8. PCOS, coagulação e disfibrinólise .....	30
<b>II – OBJETIVOS</b> .....	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33

### III – ARTIGO – VERSÃO EM INGLÊS

<b>Nitric oxide and fibrinogen levels in patients with polycystic ovary syndrome and idiopathic hirsutism</b> .....	43
Summary.....	45
Introduction .....	46
Patients and Methods.....	48
- Patients .....	48
- Study Protocol.....	49
- Assays .....	50
- Quantitative determination of fibrinogen .....	51
- Nitric oxide (NO) assay.....	51
- Statistical analysis .....	51
Results .....	52
Discussion.....	53
References .....	57

### IV – ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS

<b>Níveis de óxido nítrico e fibrinogênio em pacientes com síndrome dos ovários policísticos e hirsutismo idiopático</b> .....	69
Resumo .....	71
Introdução.....	73
Pacientes e Métodos .....	75
- Pacientes.....	75
- Protocolo de estudo .....	76
- Dosagens laboratoriais .....	77
- Determinação quantitativa de fibrinogênio .....	77
- Dosagem de óxido nítrico (NO) .....	78
Análise estatística .....	78

Resultados.....	78
Discussão .....	80
Referências .....	84

## **ANEXOS**

Anexo 1 - Níveis de endotelina-1 em pacientes com síndrome dos ovários policísticos e hirsutismo idiopático – resultados preliminares .....	97
Anexo 2 - Protocolo Hirsutismo.....	110
Anexo 3 – Termo de consentimento para participação no estudo de marcadores de disfunção endotelial, de disfibrinólise e de predisposição a trombofilia em pacientes Hiperandrogênicas .....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADP</b>	.....	difosfato de adenosina
<b>Ang II</b>	.....	angiotensina II
<b>ATP</b>	.....	trifosfato de adenosina
<b>AVC</b>	.....	Acidente Vascular Cerebral
<b>DCV</b>	.....	doença cardiovascular
<b>DHT</b>	.....	deidrotestosterona
<b>EDCF</b>	.....	endothelium derived contracting factor
<b>EDHF</b>	.....	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
<b>EDRF</b>	.....	endothelium-derived relaxing factor
<b>ET-1</b>	.....	endotelina-1
<b>FvW</b>	.....	fator de von Willebrand
<b>GFC</b>	.....	capacidade fibrinolítica global
<b>GnRH</b>	.....	gonadotrofin releasing hormone
<b>HAC-NC</b>	.....	Hiperplasia adrenal congênita – forma não-clássica
<b>HDL</b>	.....	High- density lipoprotein
<b>HOMA</b>	.....	Homeostasis Model of Assessment resistance index
<b>IAM</b>	.....	Infarto Agudo do Miocárdio
<b>ICAM-1</b>	.....	molécula de adesão intercelular
<b>IGF-1</b>	.....	insulin growth factor-1
<b>IGFBPs</b>	.....	insulin growth factor binding proteins
<b>IL-6</b>	.....	interleucina-6
<b>IMC</b>	.....	índice de massa corporal
<b>ITL</b>	.....	índice de testosterona livre
<b>LDL-colesterol</b>	.....	colesterol total



<b>LH</b>	.....	luteinizing hormone
<b>L-NMMA</b>	.....	N-monomethyl L-arginina
<b>MCh</b>	.....	metacolina
<b>NIH</b>	.....	National Institute of Health
<b>NO</b>	.....	óxido nítrico derivado do endotélio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	.....	ânion superóxido
<b>PAI-1</b>	.....	inibidor do ativador do plasminogênio tecidual-1
<b>PCOS</b>	.....	síndrome dos ovários policísticos
<b>PCR</b>	.....	proteína C reativa
<b>PDF</b>	.....	produtos de degradação da fibrina
<b>PDGF</b>	.....	fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PGI<sub>2</sub></b>	.....	prostaciclina
<b>RIG</b>	.....	relação insulina-glicose
<b>SHBG</b>	.....	steroid hormone binding globulin
<b>SPSS</b>	.....	Statistical Package for Social Sciences
<b>TAX<sub>2</sub></b>	.....	tromboxane A <sub>2</sub>
<b>TF</b>	.....	fator tecidual
<b>TGF-β</b>	.....	fator de crescimento transformante-β
<b>t-PA</b>	.....	ativador do plasminogênio tecidual
<b>VEGF</b>	.....	fator de crescimento vascular endotelial

## LISTA DE TABELAS

### I – INTRODUÇÃO

#### **Tabela 1**

Condições associadas com diminuição da vasodilatação dependente do endotélio..... 19

#### **Tabela 2**

Estímulos vasodilatadores do endotélio vascular ..... 21

#### **Tabela 3**

Exemplos de função endotelial e métodos de avaliação..... 25

### III – ARTIGO

#### **Table I**

Clinical and anthropometric data for hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH)..... 64

#### **Table II**

Nitric oxide and fibrinogen levels, hormonal and metabolic data for hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH)..... 65

**Table III (A and B)**

Correlations between nitric oxide and fibrinogen with anthropometric, hormonal, and metabolic variables in hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH) ..... 66

**IV – ARTIGO****Tabela I**

Avaliação clínica e antropométrica em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)..... 91

**Tabela II**

Avaliação hormonal, metabólica, níveis de óxido nítrico e fibrinogênio em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)..... 92

**Tabela III (A e B)**

Correlação entre níveis de óxido nítrico (NO) e fibrinogênio com variáveis antropométricas, hormonais e metabólicas em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)..... 93

## LISTA DE FIGURAS

### I - INTRODUÇÃO

#### Figura 1

Fisiologia do endotélio vascular ..... 22

### III – ARTIGO

#### Figure 1

Prevalence of insulin resistance and impaired glucose tolerance, assessed by HOMA and glucose levels 2 hs OGTT in hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH) ..... 68

### IV – ARTIGO

#### Figura 1

Prevalência de resistência insulínica e intolerância à glicose, acessado pelo HOMA e níveis de glicose duas horas após TTG em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI) ..... 95

## **I – INTRODUÇÃO**

### **1.1. Hiperandrogenismo feminino**

O hiperandrogenismo pode ser definido por aumento dos níveis circulantes de androgênios e/ou de sua ação sobre os tecidos-alvos. As manifestações clínicas deste distúrbio hormonal em mulheres podem ser classificadas em cosméticas, associadas a distúrbio menstrual e/ou infertilidade e metabólicas. As alterações cosméticas incluem hirsutismo, acne, alopecia e seborréia. A oligomenorréia e a hiperplasia endometrial são decorrentes de ciclos menstruais anovulatórios. As alterações metabólicas que podem estar associadas são obesidade, dislipidemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e diabetes tipo 2. As manifestações clínicas podem ocorrer isoladas ou associadas, dependendo da causa do hiperandrogenismo subjacente. (Kuttenn e cols., 1977; Spritzer & Kuttenn, 1985; Lisboa e cols., 1997)

O hiperandrogenismo na maioria das vezes será decorrente de um excesso na produção glandular de androgênios, de origem ovariana ou adrenal. O hiperandrogenismo de origem ovariana, na maioria dos casos, é decorrente da síndrome dos ovários policísticos (PCOS). Uma pequena parcela dos casos pode ser causada por tumores ovarianos virilizantes. Hiperplasia adrenal congênita – forma não-clássica (HAC-NC), tumores adrenais virilizantes

ou síndrome de Cushing são as causas adrenais possíveis de hiperandrogenismo. (Spritzer e cols., 1997)

Por outro lado, a etiologia do hiperandrogenismo pode estar associada a um distúrbio isolado na sensibilidade cutânea aos androgênios, denominando-se hiperandrogenismo periférico ou idiopático. Neste caso, os sinais e sintomas são decorrentes de uma hiperutilização isolada dos androgênios circulantes em concentrações normais, pelo folículo pilo-sebáceo, devido a alterações intrafoliculares no metabolismo androgênico. (Mowszowicz e cols., 1983; Lobo e cols., 1983; Oliveira e cols., 2003)

## **1.2. Hirsutismo idiopático**

O hirsutismo idiopático caracteriza-se por uma sensibilidade da pele aos hormônios circulantes em níveis normais, sem outras manifestações clínicas ou alterações laboratoriais. No hirsutismo periférico não há um aumento na produção de androgênios. Nestas pacientes, observa-se uma maior atividade da  $5\alpha$ -redutase junto ao folículo piloso quando comparadas a mulheres normais, o que ocasiona uma maior conversão de testosterona em deidrotestosterona (DHT), o mais potente dos hormônios masculinos. O quadro clínico é de hirsutismo isolado com ciclos menstruais regulares, ovulatórios e fertilidade preservada. (Horton e cols., 1982; Serafini & Lobo, 1985; Spritzer e cols., 2000; Azziz e cols., 2000) A prevalência de hirsutismo idiopático entre as mulheres hirsutas varia de acordo com a população estudada de é em torno de 5 a 40%. (Lisboa e cols., 1997; Azziz, 2003)

### 1.3. Síndrome dos ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (PCOS) é uma condição clínica heterogênea, caracterizada por hirsutismo, acne e/ou alopecia, ciclos menstruais irregulares, infertilidade e anormalidades endócrinas tais como hiperandrogenemia e secreção inapropriada de LH.

A PCOS é a endocrinopatia mais comum que afeta mulheres em idade reprodutiva, com uma prevalência de 8% para a população geral de mulheres (Michelmores e cols., 1999) e de cerca de 50% entre as hirsutas. (Lisboa e cols., 1997) Além disso, é responsável por aproximadamente 30-40% das amenorréias primárias e secundárias e 80% das oligomenorréias. (Goldzieher & Young, 1992; Spritzer & Mallmann, 2003)

Os critérios diagnósticos do NIH (Zawadski & Dunaif, 1990) foram revisados no “Rotterdam Consensus on Diagnostic Criteria for PCOS” (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004) e devem incluir, pelo menos, dois dos seguintes critérios: 1) oligo- ou anovulação; 2) sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo e 3) ovários policísticos, e exclusão de outras etiologias (hiperplasia adrenal congênita, tumores secretores de androgênios e síndrome de Cushing).

Embora a etiopatogenia da PCOS não tenha sido ainda esclarecida, mecanismos fisiopatológicos são reconhecidos, tais como: aumento da pulsatilidade do gerador de pulsos do GnRH, com subsequente alteração na secreção de gonadotrofinas; secreção acíclica de androgênios ovarianos e sua conversão periférica em estrogênios; resistência insulínica associada à redução de SHBG (steroid hormone binding globulin) e IGFbps (insulin growth factor binding proteins) e aumento intra-ovariano de IGF-1 (insulin growth factor-1) (Nácul e cols., 2003). Parece haver uma predisposição genética para a resistência insulínica, que se torna mais significativa com o aumento excessivo de peso (Franks e cols., 1997; Ehrmann e

cols., 1995), mas que ocorre também em pacientes com peso normal. (Morales e cols., 1996) Aproximadamente 20-75% das pacientes com PCOS apresentam resistência à insulina. Embora seja encontrada tanto nas pacientes magras quanto nas obesas, a resistência à insulina parece ser mais freqüente e causar maior impacto metabólico nas pacientes obesas com PCOS.(Dunaif, 1997; Poy e cols., 2001; Ehrmann 1999)

#### **1.4. PCOS e fatores de risco cardiovasculares**

A maioria das pacientes com PCOS apresenta características da síndrome metabólica, incluindo obesidade, resistência insulínica e dislipidemia, sugerindo um aumento no risco de doença cardiovascular (Sharpless, 2003), embora este dado não seja ainda consensual (Talbott, e cols., 2000; Wild e cols., 2000). Estudos mostram que a combinação de fatores de risco para síndrome metabólica nestas mulheres prediz um aumento de 7 vezes no risco de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) comparado com controles de mesma idade (Dahlgren e cols., 1992). Uma coorte retrospectiva que acompanhou mulheres com PCOS por 20 anos, embora tenha demonstrado uma maior prevalência de diabetes e fatores de risco cardiovasculares nestas pacientes em relação às controles, não demonstrou aumento na morbimortalidade por DCV (Wild, 2000). Talbott e cols. (2000) avaliaram a espessura da camada íntima média de artérias carótidas em pacientes com PCOS através de ultrassonografia. Apenas nas pacientes PCOS acima de 45 anos houve aumento significativo na espessura das placas ateroscleróticas, porém este aumento foi dependente da hiperinsulinemia e da obesidade central. Por outro lado, também não está determinado ainda se a PCOS carrega um aumento de risco de DCV acima daquele devido à obesidade e distribuição de gordura corporal, além de fatores dos fatores de risco tradicionais conhecidos.



A obesidade está presente em aproximadamente 44% das mulheres com PCOS (Carmina & Lobo, 1999). Quando presente, piora a resistência insulínica que resulta em maior incremento dos androgênios ovarianos e adrenais e da testosterona livre. Em comparação com mulheres magras com PCOS, as pacientes obesas com PCOS têm níveis mais elevados de testosterona e menores de LH (Oppermann e cols., 1993). Além disso, a obesidade na PCOS tem um padrão do tipo andróide, com um aumento da relação cintura-quadril, o qual está associado com diabete e aumento de risco de doença cardiovascular (Yildirim e cols., 2003) Christian e cols. (2003) demonstraram que a prevalência e extensão de calcificações em artérias coronárias em pacientes com PCOS estão associadas com a presença de obesidade.

A prevalência de tolerância diminuída à glicose e de diabetes é maior nas pacientes com PCOS, sendo 31% e 7,5% em pacientes obesas e 10,3% e 1,5% em magras, respectivamente (Legro e cols., 1999). Até 15% das pacientes com PCOS desenvolvem diabetes tipo II na menopausa (Ehrmann e cols., 1999) Como o desenvolvimento de diabetes tipo 2 é um fator de risco bem conhecido para doença macrovascular e, em especial, doença coronariana, a resistência insulínica e a hiperinsulinemia, adicionada da hiperglicemia e da hiperlipidemia, pode ser considerada uma associação de maior risco para determinantes importantes de aterosclerose (Donahue e cols., 1992).

O mecanismo molecular para a resistência insulínica ainda não está bem estabelecido. Um estudo mostrou anormalidades no receptor de insulina, levando a uma diminuição da sinalização da insulina em aproximadamente 50% das pacientes com PCOS estudadas. As pacientes que não apresentam defeito neste receptor poderiam ter uma anormalidade em locais mais distantes na via de sinalização da insulina (Dunaif, 1995). A resistência insulínica resultante, através de mecanismos não muito bem elucidados, poderia alterar a síntese do óxido nítrico derivado do endotélio (NO) e, por conseguinte, alterar a vasodilatação e os mecanismos de homeostase do endotélio, predispondo a um maior risco de DCV (Baron, 1996).

Um perfil lipídico aterogênico decorrente da resistência insulínica pode ser encontrado nas pacientes com PCOS e se caracteriza por aumento do colesterol total, LDL-colesterol, triglicerídeos e diminuição do HDL-colesterol e lipoproteína A1. A dislipidemia em pacientes PCOS magras não está bem estabelecida. Em um estudo foram encontrados níveis de HDL-colesterol significativamente menores em pacientes PCOS magras em relação aos controles de mesmo IMC. (Robinson e cols., 1996) Sampson e cols. (1996) não encontraram diferença no perfil lipídico em pacientes PCOS magras em relação aos controles de mesmo peso. Embora o hiperandrogenismo tenha alguma influência nestas anormalidades, a hiperinsulinemia parece ser a contribuição mais importante, principalmente na elevação dos triglicerídeos.

### **1.5. Fisiopatologia do endotélio vascular**

O endotélio, composto por uma camada monocelular de revestimento epitelial, delimita o sistema cardiovascular em toda sua extensão. Diferente do que se imaginava no passado, o endotélio não é apenas uma barreira entre o sangue e o interstício, pois exerce uma variedade de funções como permeabilidade seletiva a íons, proteínas e nutrientes, tráfego de leucócitos do sangue para os tecidos, atividade contrátil e proliferativa da musculatura lisa vascular, manutenção da integridade da parede vascular após lesão, hemostasia e tônus vascular. O endotélio tem a importante função de regulação da pressão arterial e do fluxo sanguíneo local através da produção de substâncias locais que agem como hormônios ou da modulação de outros sistemas sobre a malha vascular. Como o endotélio está em contato direto com o sangue, este é o primeiro a sofrer as conseqüências de várias manifestações patológicas do sistema vascular, como hipercolesterolemia, isquemia-reperfusão, diabetes e hipertensão arterial (Bittencourt, 1998).

O termo disfunção endotelial é mais frequentemente usado para denotar uma diminuição na vasodilatação dependente do endotélio, mas também compreende aquelas condições que levam a ativação do endotélio com anormalidades nas interações deste com leucócitos, plaquetas e substâncias reguladoras (Anderson, 1999) (Tabela 1). A disfunção endotelial tem sido identificada como um marcador precoce de doença cardiovascular (DCV) e pode prever a ocorrência de doença arterial coronariana no futuro, antes que as alterações ateroscleróticas apareçam nas artérias.

**Tabela 1** – Condições associadas com diminuição da vasodilatação dependente do endotélio

Aterosclerose	Diabetes tipo I e II
Hipercolesterolemia	Hiperglicemia
HDL-colesterol diminuído	Hipertrigliceridemia pós-prandial aguda
Lipoproteína-a aumentada	Tabagismo ativo e passivo
Partículas pequenas de LDL	Cardiomiopatia dilatada
Suscetibilidade a oxidação do LDL	Doença de Chagas
Hipertensão	Insuficiência cardíaca
Hiperhomocisteinemia	História familiar de cardiopatia isquêmica
Envelhecimento	Estado pós-menopausa
Vasculites	Doença de Kawasaki
Síndrome x	Pré-eclâmpsia
Resistência insulínica	Hipertensão pulmonar

Tabela adaptada de Anderson, TJ. J Am Coll Cardiol, 1999.

O tônus vascular depende do balanço entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores produzidos localmente pelo endotélio após estímulos específicos, bem como da responsividade da musculatura lisa aos mesmos (Bittencourt, 1998; Griendling & Alexander, 1996). Por muito tempo, os mecanismos envolvidos na regulação do sistema cardiovascular permaneceram obscuros, até que Furchgott & Zawadski demonstraram que em resposta a acetilcolina, o endotélio produzia um fator relaxante endógeno (EDRF- *endothelium-derived relaxing factor*), posteriormente identificado como óxido nítrico (NO) (Furchgott & Zawadski, 1980).

O NO é produto de oxidação com cinco elétrons do aminoácido L-arginina, mediado por uma das três isoformas da enzima óxido nítrico sintetase. O óxido nítrico tem ação importante contra a aterosclerose, através da redução da aderência plaquetária e monocitária ao endotélio, inibição da proliferação e migração da musculatura lisa vascular e diminuição da peroxidação lipídica (McIntyre & Dominiczak, 1997). Também é um potente vasodilatador endógeno em humanos e tem importante função na regulação do tônus vascular e na pressão. O NO participa do relaxamento da musculatura lisa vascular em resposta a diversas substâncias. (tabela 2)

**Tabela 2** – Estímulos vasodilatadores do endotélio vascular

Acetilcolina	Fluxo sanguíneo (estresse de cisalhamento)
Bradicinina	Catecolaminas
Serotonina	Ionóforos de cálcio
ADP,ATP	Substância P
Histamina	Hipóxia
Trombina	Estimulação elétrica

ADP= difosfato de adenosina ATP= trifosfato de adenosina  
Tabela adaptada de Anderson, TJ, J Am Coll Cardiol, 1999.

A prostaciclina ( $PGI_2$ ), produzida pelas células endoteliais, tem potência vasodilatadora semelhante ao NO (Gryglewski, 1995). Sua liberação é estimulada pelos mesmos estímulos que levam à secreção de NO (Carter & Pearson, 1992). Em situações não patológicas, estes dois fatores agem mantendo as células da íntima e da média da parede arterial em estado de latência, não-proliferativo, ajudando a manter a contratilidade vascular (Raines & Ross, 1993). Estas interações, que visam manter a homeostase vascular, desaparecem nas situações patológicas que levam à disfunção endotelial, como a inflamação, hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose. (figura 1)

**Figura 1** – Fisiologia do endotélio vascular

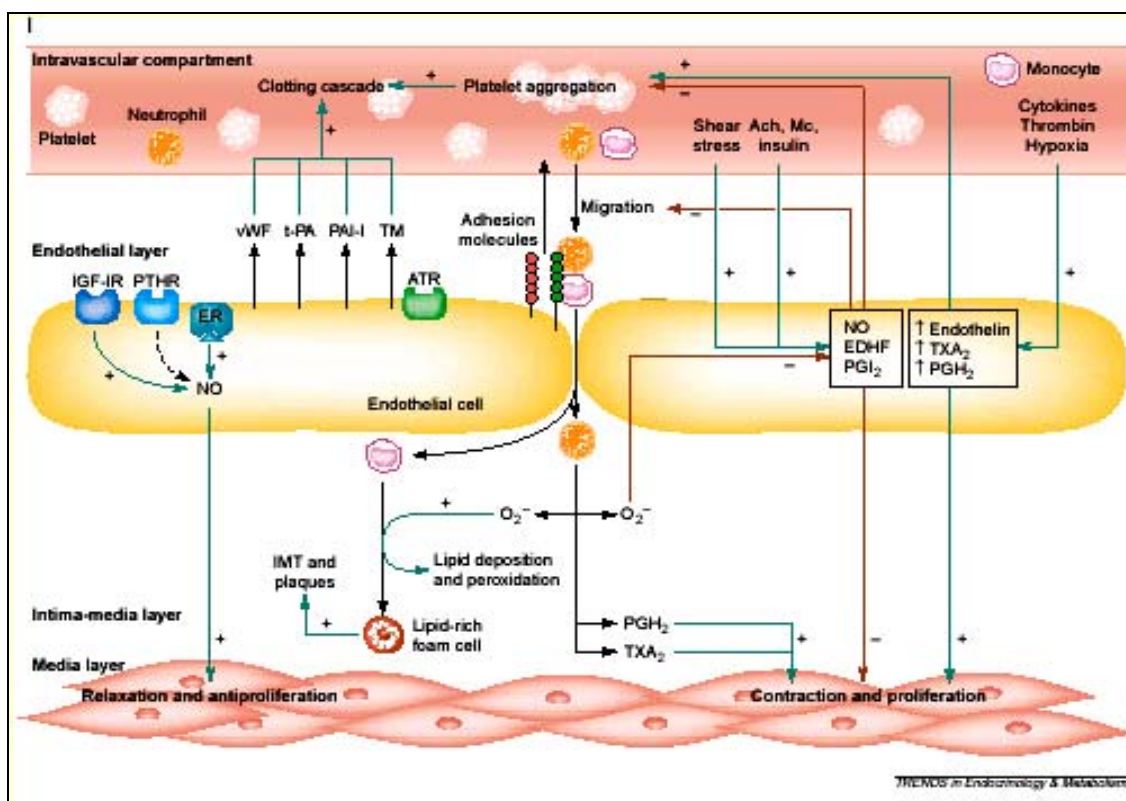


Figura adaptada de Abdu, TAM. Trends in Endocrinol Metab, 2001.

O endotélio saudável apresenta propriedades antiinflamatórias que são importantes na prevenção da aterosclerose e cardiopatia isquêmica (Libby, 1995). O NO endotelial inibe a adesão leucocitária (Kubes e cols., 1991) e a agregação plaquetária (Michelson e cols., 1996), exercendo função anti-trombótica, através de propriedades anti-adesivas e anti-agregantes (Radomski e cols., 1987). A adesão dos leucócitos não é importante somente durante os estágios iniciais da aterogênese, como também pode contribuir significativamente para a instabilidade da placa e sua ruptura (Crea e cols., 1997) Ativação plaquetária ocorre em condições associadas com disfunção endotelial, e está associada com síndromes coronarianas instáveis, em que foi demonstrada a diminuição da liberação de NO (Freedman e cols., 1998).

Em pessoas saudáveis, o efeito predominante da estimulação do endotélio é a vasodilatação. Já pacientes hipertensos apresentam uma diminuição da produção basal de NO e de seu sinergismo com PGI<sub>2</sub> na promoção da vasodilatação. O NO basal parece servir como neutralizador da ação de vários constritores endógenos e exógenos. Assim, a ação vasoconstritora de um agente pode ser aumentada se o endotélio fonte de NO for retirado (Umans & Levi, 1995).

Na aterogênese ocorrem alterações nas túnicas íntima e média das paredes vasculares, como aumento da permeabilidade do endotélio, infiltração de monócitos, proliferação de células musculares lisas adjacentes, agregação plaquetária e acúmulo de lipídeos, cálcio e componentes da matriz extracelular. Uma das primeiras reações do endotélio a estímulos irritantes aterogênicos é a regulação do tônus vascular, através da produção e liberação de NO (Schmitz e cols., 1991). Embora o NO seja vasodilatador e inibidor da oxidação endotelial de LDL (Malo-Ranta e cols., 1994), trata-se de radical livre que reage prontamente com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) liberado por macrófagos, produzindo peróxido-nitrito, potente agente oxidante que determina peroxidação lipídica e ampla destruição tecidual (Radi e cols., 1991). Além disso, há inativação do NO e impedimento de suas ações fisiológicas no endotélio vascular. Assim, excessiva produção de NO pelo endotélio é potencialmente deletéria, devido à aceleração da lesão aterosclerótica (Defeudis, 1995) e envolvimento na patogênese da hipertensão arterial. (Laurindo e cols., 1994; Alexander, 1995)

O endotélio também produz fatores de contração dependente do endotélio (EDCF – *endothelium derived contracting factor*) como a endotelina e o ânion superóxido, este último já abordado previamente. As endotelinas são polipeptídeos com 21 aminoácidos (endotelinas 1, 2 e 3), presentes em vários tecidos. Apenas a endotelina-1 (ET-1) é produzida pelas células endoteliais em resposta a angiotensina II, vasopressina, trombina, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), hipóxia, isquemia e estresse de cisalhamento (Levin, 1995). A liberação de

endotelina induz a produção de NO em resposta à estimulação de receptores localizados nas células musculares lisas dos vasos (Carvalho e cols., 1989; Harber & Lee, 1994), o que contrabalança as ações do peptídeo.

Existe um interesse crescente em desenvolver métodos de avaliação da função endotelial em humanos, bem como definir a quais marcadores bioquímicos este fenômeno se associa. O objetivo disto é prever quais indivíduos estão mais predispostos a desenvolver doenças cardiovasculares no futuro, no sentido de implementar medidas preventivas mais eficazes, muito antes que a doença esteja estabelecida. Na tabela 3 estão listados exemplos de métodos de avaliação da função endotelial.



**Tabela 3** – Exemplos de função endotelial e métodos de avaliação

<b>Função endotelial</b>	<b>Mediador<sup>a</sup></b>	<b>Teste da função</b>
Vasorregulação	NO, EDHF, ET-1, Ang II e TXA <sub>2</sub>	Dilatação endotélio-dependente fluxo-mediada da artéria braquial  Resposta a infusão intra-arterial de acetilcolina com ou sem L-NMMA  Pletismografia de impedância
Coagulação	PGI <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , FvW, fibrinogênio, trombomodulina e fator tecidual	Medida do fibrinogênio plasmático, FvW e níveis de trombomodulina
Fibrinólise	t-PA e PAI-1	Medida da atividade de t-PA e níveis de PAI-1
Inflamação	PCR, E-selectina, fibrinogênio ICAM-1 e IL-6	Medida plasmática ou sérica de PCR, E-selectina, fibrinogênio ICAM-1 e IL-6
Angiogênese	VEGF, PDGF e TGF-β	Medida de VEGF e níveis/atividade de PDGF
<sup>a</sup> Abreviações: Ang II, angiotensina II; PCR, proteína C reativa; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; ET-1, endotelina-1; ICAM-1, molécula de adesão intercelular; IL-6, interleucina-6; L-NMMA, N-monomethyl L-arginina; NO, óxido nítrico; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio tecidual-1; PGI <sub>2</sub> , prostaciclina; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF-β, fator de crescimento transformante-β; t-PA, ativador do plasminogênio tecidual; TF, fator tecidual; TAX <sub>2</sub> , tromboxane A <sub>2</sub> ; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; FvW, fator de von Willebrand		

Tabela adaptada de Abdu, TAM. Trends in Endocrinol Metab, 2001.

## 1.6. PCOS e disfunção endotelial

É conhecida a associação entre disfunção endotelial e resistência insulínica (Petri e cols., 1996; Spritzer e cols., 2000; Steinberg e cols., 1996; Irving e cols., 2001). Embora alguns estudos tenham demonstrado que a PCOS é caracterizada por disfunção endotelial, associada com hiperandrogenismo e resistência insulínica, os resultados ainda são conflitantes. (Wild e cols., 2000; Talbott e cols., 2000; Sampson e cols., 1996; Paradise e cols., 2001; Mather e cols., 2000; Lakhani e cols., 2000; Less e cols., 1998)

Petri e cols. (1996) demonstraram que a síntese de óxido nítrico derivado do endotélio e a sensibilidade à insulina estão positivamente relacionadas em humanos. Spritzer e cols. (2000) avaliaram níveis de óxido nítrico em pacientes pós-menopáusicas com e sem hiperinsulinemia medida pela relação insulina-glicose (RIG). Houve uma correlação negativa entre níveis de óxido nítrico e RIG nas pacientes hiperinsulinêmicas. Steinberg e cols. (1996) demonstraram uma diminuição na produção/liberação de óxido nítrico derivado do endotélio (NO) em pacientes hiperinsulinêmicos através da resposta do fluxo sanguíneo na artéria femoral após injeção de metacolina (MCh), nitroprussiato de sódio ou hiperinsulinemia. Assim, os estados de resistência à insulina parecem exibir uma vasodilatação, mediada pela insulina e dependente do óxido nítrico deficiente. Esta função endotelial defeituosa, decorrente da resistência à insulina, poderia conferir às pacientes com PCOS hiperinsulinêmicas um maior risco de doença macrovascular (Spritzer e cols., 2000). Paradisi e cols. (2001), avaliando mulheres com PCOS através da mesma metodologia de Steinberg e cols. (1996), encontraram uma vasodilatação dependente do endotélio 50% menor em relação ao grupo controle. O estudo também mostrou que índices elevados de androgênios estão associados com diminuição da vasodilatação endotelial dependente de óxido nítrico. A obesidade teve um efeito modulador da função endotelial em mulheres, independente de seu “status” hormonal, e o índice de massa corporal (IMC) e a testosterona livre mostraram ser marcadores importantes

da função endotelial. Por outro lado, Mather e cols. (2000) demonstraram não haver diferenças entre pacientes com PCOS e controles normais de mesma idade na vasodilatação, tanto dependente quanto independente do endotélio, medida por ultrassonografia da artéria braquial. Não houve correlação entre o grau de resistência insulínica ou hiperandrogenismo e a resposta braquial. As pacientes com PCOS eram significativamente mais obesas do que as controles, o que poderia favorecer o achado de anormalidades no grupo mais obeso, porém isto não foi demonstrado.

Níveis elevados de ET-1 tem sido encontrado em pacientes com síndrome metabólica (Ferri e cols., 1997; Ferri e cols., 1997) e diabetes tipo II (Wollesen e cols., 1999; Morise e cols., 1995). Irving e cols. (2001), avaliando homens saudáveis de 24-33 anos, encontrou associação positiva entre níveis de ET-1 com insulina plasmática, IMC e triglicérides. A dosagem de big-endotelina, o precursor inativo de ET-1, se associou positivamente com resistência à insulina, medida através do HOMA (Homeostasis Model of Assessment resistance index). Diamanti-Kandarakis e cols. (2001) evidenciaram níveis de ET-1 significativamente mais elevados em pacientes com PCOS e resistência à insulina quando comparadas com controles híginas de mesma idade. Após estratificar a amostra em obesas e não-obesas, as diferenças entre os grupos em relação a níveis mais elevados de androgênios, insulina e ET-1 permaneceram significativas. Este estudo também demonstrou uma correlação negativa entre ET-1 e utilização de glicose no grupo total de pacientes. Isto pode ser outra indicação do envolvimento da hiperinsulinemia e resistência insulínica com disfunção endotelial. A terapia com metformim em um subgrupo de pacientes com PCOS melhorou a sensibilidade à insulina com diminuição significativa da ET-1 sem alteração no peso das pacientes. Este achado sugere que níveis elevados de ET-1 é uma anormalidade distinta de pacientes com PCOS, independente da presença de obesidade.

## 1.7. Fisiopatologia do sistema de coagulação e fibrinólise

A coagulação, anticoagulação e fibrinólise interagem em complexo sistema para exercer hemostasia e manter o fluxo sanguíneo. A hiperatividade do sistema manifesta-se por trombose arterial ou venosa, da qual resultam várias síndromes cardiovasculares, como a cardiopatia isquêmica, doença cerebrovascular, trombose venosa, entre outras. A formação de um trombo ou a sua liberação total ou parcial, a qual chamamos de êmbolo, podem ocasionar a obstrução vascular. Doenças causadas por trombose e embolia são denominadas tromboembólicas (Fuchs & Picon, 1998).

Nas doenças tromboembólicas ocorre ativação no sistema de coagulação em sítios inadequados, causando repercussões deletérias para o organismo. O processo de hemostasia e formação do trombo ocorre através de dois mecanismos, a via extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca é desencadeada por fatores teciduais liberados quando há dano tecidual. A via intrínseca é ativada pelo contato entre o fator XII e fibras de colágeno quando há dano do endotélio. Ambas as vias podem ativar, de forma isolada ou em combinação, o fator X, o qual junto com outros fatores, converte a protrombina em trombina. A trombina apresenta três efeitos maiores: (1) catalisar a conversão do fibrinogênio em fibrina para a formação do coágulo; (2) ativar o fator XIII a XIIIa que estabiliza a fibrina; e (3) ativar os trombócitos durante a hemostasia. A transformação de fibrinogênio em fibrina é a via final comum da “cascata da coagulação”. Uma vez que o processo de coagulação é desencadeado, algum mecanismo deve começar a operar para impedir que este processo se dissemine pelo sistema vascular (trombose) (Agamemnon & Silbernagl, 1991). Assim, o processo de coagulação é antagonizado por sistemas anticoagulantes endógenos. A antitrombina III é a proteína plasmática mais importante envolvida na proteção contra a trombose. Essa proteína forma complexos com os fatores XIIIa, XIIa, XIa, Xa, IIa e calicreína, inativando-os. O sistema fibrinolítico pode ser ativado por vários estímulos, como estase sanguínea e isquemia. O endotélio sintetiza t-PA (fator tecidual ativador de plasminogênio) que, juntamente com uroquinase, são ativadores endógenos de plasminogênio. O t-PA é inibido no plasma pelo

PAI-1 (fator inibidor do ativador do plasminogênio). A uroquinase encontra-se no plasma sob forma de pró-uroquinase. A formação de fibrina é o maior estímulo fisiológico à ligação de plasminogênio a receptores endoteliais, onde t-PA o transforma em plasmina. Pelo mesmo processo, pró-uroquinase transforma-se e uroquinase, complementando a ação de t-PA (Gurewich, 1990). A plasmina formada, que é uma potente enzima proteolítica, digere a fibrina, transformando-a em produtos de degradação da fibrina (PDF), como D- dímeros, marcador sanguíneo de fibrinólise ativa (Cairs, 1996).

No sistema arterial, a aterosclerose é a maior causa de ativação do processo trombótico. A ruptura da placa aterosclerótica, expõe o subendotélio, altamente trombogênico, a componentes do sangue, propiciando adesão e agregação plaquetária. As primeiras plaquetas aderidas promovem a agregação de outras plaquetas. Sobre o agregado plaquetário atua o sistema de coagulação protéica do plasma, formando rede de fibrina que fixa e estabiliza o trombo (Lefkovits, 1995). No sistema venoso, estase sanguínea é a principal ativadora patológica da coagulação. Anormalidades intrínsecas da capacidade de coagulação e fibrinólise do plasma também contribuem para a trombose. Os marcadores que assumem importante papel na trombose arterial são o t-PA, PAI-1, fator VII, fator de von Willebrand e o fibrinogênio (Amowitz & Sobel, 1999; Atiomo e cols., 1998; Scarabin e cols., 1996). Entre os marcadores relacionados com trombose venosa, a Proteína C, a Proteína S e a Anti-trombina III, apresentam papel de destaque (Tsanadis e cols., 2002; Speroff, 1998).

A resistência à insulina altera a homeostase endotelial, aumentando o risco de trombose, ou pelo aumento de fatores pró-trombóticos, ou pela diminuição de fatores fibrinolíticos ou ambos (Amowitz & Sobel, 1999; Vague e cols., 1986; Atiomo e cols., 1998; Lindahl e cols., 1996; Colwell 1993).

Em um estudo epidemiológico foi encontrada uma associação entre resistência à insulina e baixa atividade fibrinolítica, diminuindo a remoção dos depósitos de fibrina nos

vasos (Lindahl e cols., 1996). O fibrinogênio está aumentado em pacientes com hiperinsulinemia e resistência à insulina, sendo considerado atualmente um fator de risco independente para doença cardiovascular (Lindahl e cols., 1996; Ernst & Resch, 1993). As mulheres apresentam níveis de fibrinogênio significativamente mais elevados do que os homens, e estes níveis são positivamente associados com resistência à insulina e hiperinsulinemia (Lindahl e cols., 1996). A meta-análise de seis estudos epidemiológicos que avaliaram a relação entre fibrinogênio e doença cardiovascular mostrou que o aumento do fibrinogênio se associou com IAM e AVC subsequente (Ernst & Resch, 1993). Apenas um estudo desta meta-análise avaliou pacientes do sexo feminino, no qual o fibrinogênio esteve significativamente associado com cardiopatia isquêmica, mas não com AVC (Kannel e cols., 1987).

Concentrações elevadas de fibrinogênio, Fator VIII e Fator von Willebrand têm sido associados de forma independente com aumento de risco para doença macrovascular em pacientes diabéticos (Kannel e cols., 1990). Deste modo, parece que resistência à insulina e hiperinsulinemia contribui para o estado de hipercoagulabilidade.

### **1.8. PCOS, coagulação e disfibrinólise**

A PCOS é um distúrbio caracterizado por aumento dos fatores de risco para DCV e presença de vários componentes da síndrome metabólica (Sharpless, 2003). Assim, é possível que um estado de hipercoagulabilidade e disfibrinólise esteja presente num subgrupo de pacientes e contribua para o desenvolvimento futuro de DCV nestas pacientes. Estudos prévios sobre coagulação e fibrinólise em pacientes com PCOS apresentam resultados conflitantes (Sampson, 1996; Atiomo e cols., 1998; Dahlgren e cols., 1994; Kelly e cols., 2002; Dereli e cols., 2003; Yildiz e cols., 2002). Dahlgren e cols. (1994) não encontraram

diferenças na atividade do PAI-1, vWF, fator VII em mulheres PCOS mais velhas comparadas com controles normais de mesma idade. Apesar de haver maior prevalência de hipertensão e diabetes nas pacientes com PCOS, os níveis de fibrinogênio foram mais baixos em relação às controles. Sampson e cols. (1996) encontraram, além de níveis mais elevados de PAI-1 em pacientes com PCOS, uma correlação positiva entre atividade do PAI-1 e níveis de insulina plasmática. Atiomo e cols. (1998) mostraram um aumento do tempo de lise do coágulo, da atividade do PAI-1 e de níveis de fibrinogênio em pacientes com PCOS em relação às controles. Porém, não houve controle para uma maior prevalência de obesidade no grupo das pacientes com PCOS, o que poderia ser um fator de confusão nos resultados. Kelly e cols. (2002) avaliaram diversos marcadores hemostáticos em pacientes com PCOS (fator VIIc, fibrinogênio, t-PA, D-dímeros, fator von Willebrand), encontrando apenas níveis significativamente mais elevados de t-PA em pacientes com PCOS em relação às controles com mesmo peso. Dereli e cols. (2003) encontraram maiores níveis de agregação plaquetária em pacientes com PCOS em comparação com pacientes hiperandrogênicas com HAC-NC ou mulheres normais. Além disso, a disfunção plaquetária se associou com uma diminuição da sensibilidade à insulina, independente dos níveis de androgênios. Anormalidades na função plaquetária, junto com aumento de fibrinogênio e PAI-1 são definidos como um estado pró-trombótico. Yildiz e cols. (2002) avaliaram a capacidade fibrinolítica global (GFC) em mulheres com PCOS. A GFC é um método que é sensível a todos os fatores envolvidos na fibrinólise. A GFC foi significativamente menor nas pacientes com PCOS em relação às controles. Os outros parâmetros hemostáticos avaliados pelos autores, incluindo fibrinogênio, foram comparáveis entre os dois grupos. A GFC se associou inversamente com androgênios e, surpreendentemente não se correlacionou com nenhum parâmetro de resistência insulínica (insulina basal, HOMA, relação insulina/glicose).

## **II – OBJETIVOS**

De acordo com as informações apresentadas na Introdução, são objetivos deste trabalho:

- 1- Comparar níveis séricos de óxido nítrico, fibrinogênio e endotelina-1 em pacientes hirsutas com PCOS e hirsutismo idiopático;
- 2- Verificar se existe associação entre níveis de óxido nítrico, fibrinogênio e endotelina-1 com variáveis antropométricas, hormonais e metabólicas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdu, T.A.M., Elhadd, T., Pfeifer, M., Clayton, R.N. (2001) Endothelial dysfunction in endocrine disease. *Trends Endocrinol. Metab.*, **12**, 257-265.
- Agamêmnon, D., Silbernagl, S. (1991) Color atlas of physiology. 4<sup>th</sup> ed. New York: Thieme Medical Publishers, Inc., 74-77.
- Alexander, R.W. (1995) Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*, **25**, 155-161.
- Amowitz, L.L., Sobel, B.E. (1999) Cardiovascular consequences of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol. Metab. North. Am.*, **28(2)**, 439-58, viii.
- Anderson, T.J. (1999) Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **34**, 631-637.
- Atiomo WU, Bates SA, Condon JE, Shaw S. (1998) The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, **69**, 263-41.
- Azziz, R., Carmina, E., Sawaya, M.E. (2000) Idiopathic hirsutism. *Endocr. Rev.*, **21**, 347-362.
- Azziz, R. (2003) The evaluation and management of hirsutism. *Obstet. Gynecol.*, **101**, 995-999.
- Baron, A.D. (1996) The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle: The potential role of endothelium-derived nitric oxide. *Diabetes*, **45**, 5105.
- Bittencourt Jr, P.I.H. (1998) Endotélio vascular. In: Fuchs, F.D., Wannmacher, L. Farmacologia Clínica. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 126-136.
- Cairns, J.A. (1996) Coronary thrombolysis. In: Hull, R., Pineo, G.F., eds. Disorders of thrombosis. Philadelphia. W.B. Saunders, 44-69.

- Carmina, E., Lobo, R.A. (1999) Polycystic ovary síndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 1897-1899.
- Carter, T.D., Pearson, J. D. (1992) Regulation of prostacyclin synthesis in endothelial cells. *News. Physiol. Sci.*, **7**, 64-69.
- Carvalho, M.H.C, Scivoletto, R., Fortes, Z.B., Nigro, D. (1989) The role of endothelium in vascular reactivity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **22**, 533-545.
- Christian, R.C., Dumesic, D.A., Behrenbeck, T., Oberg, A.L., Sheedy II, P.F., Fitzpatrick, L.A. (2003) Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 2562-2568.
- Colwell JA. Vascular thrombosis in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1993; **42**:8.
- Crea, F., Biasucci, L.M., Bufón, A., et al. (1997) Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.*, **80**, Suppl: 10-6E.
- Dahlgren, E., Janson, P.O., Johansson, S., Lapidus, L., Lindstedt, G., Tengborn, L. (1994) Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, **61**, 455-460.
- Dahlgren, E., Janson, P.O., Johansson, S., Lapidus, L., Oden, A. (1992) Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **71**, 599-604.
- Defeudis, F.V. (1995) Excess EDRF/NO, a potentially deleterious condition that may be involved in accelerated atherogenesis and other chronic states. *Gen. Pharmacol.*, **26**, 667-680.
- Dereli, D., Ozgen, G., Buyukkececi, F., Guney, E., Yilmaz, C. (2003) Platelet dysfunction in lean women with polycystic ovary syndrome and association with insulin sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 2263-2268.

- Diamant-Kandarakis, E., Spina, G., Kouli, C., Migdalis, I. (2001) Increase endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86(10)**, 4666-4673.
- Donahue, R.P., Orchard, T.J. (1992) Diabetes mellitus and macrovascular complications. *Diabetes*, **15**, 1141.
- Dunaif, A. (1995) Hyperandrogenic anovulation (PCOS): A unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med*, **98** (suppl 1A):1A-33s.
- Dunaif, A. (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endoc. Rev.*, **18**, 774-800.
- Ehrmann, D.A., Barnes, R.B., Rosenfield, R.L. *et al.* (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, **22**, 141-146.
- Ehrmann, D.A., Sturis, J., Byrne, M.M., Karrison, T., Rosenfield, R.L., Polonsky, K.S., *et al.* (1995) Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome: relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Immunol.*, **96**, 520-527.
- Ernst E, Resch KL. (1993) Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann. Intern. Med.*, **118**, 956-63.
- Ferri, C., Bellini, C., Desideri, G., Baldoncini, R., De Siani, L., Santucci, A. (1997) Elevated plasma endothelin-1 levels as an additional risk factor in non-obese essential hypertensive patients with metabolic abnormalities. *Diabetologia*, **40**, 100-102.
- Ferri, C., Bellini, C., Desideri, G., Baldoncini, R., Properzi, G., Santucci, A. (1997) Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **105**, 38-40.
- Franks, S., Gharani, N., Waterworth, D., Batty, S., White, D., Williamson, R., *et al.* (1997) The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.*, **12**, 2641-2648.

- Freedman, J.E., Ting, B., Hankin, B., Loscalzo, J., Keaney, J.F.J., Vita, J.A. (1998) Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation*, **98**, 1481-1486.
- Fuchs, F.D., Picon, P.D. Antitrombóticos. (1998) In: Fuchs, F.D., Wannmacher, L. Farmacologia Clínica. 2<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 444-460.
- Furchgott, R.F., Zawadski, J.W. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **228**, 373-376.
- Goldzieher, J.W. Young, R.L. (1992) Selected aspects of polycystic ovarian disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **21**, 141-171.
- Griendling, K.K., Alexander, R.W. (1996) Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.*, **10**, 283-292.
- Gryglewski, R.J. (1995) Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol. Toxicol.*, **77**, 1-9.
- Gurewich, V. (1990) Monotherapy and combination therapies with pro-urokinase and tissue plasminogen activator. In: Sleight, P., Chamberlain, D.A.; eds. Thrombolysis – the dawn of a new era? London, 84-95.
- Harber, E., Lee, M-E. (1994) Endothelin to the rescue? *Nature*, **370**, 252-253.
- Horton, R., Hawks, D., Lobo, R. (1982) 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -androstenediol glucuronide in plasma. A marker of androgen action in idiopathic hirsutism. *J. Clin. Invest.*, **69**, 1203-1206, 1982.
- Irving, R.J., Noon, J.P., Watt, G.C.M., Webb, D.J., Walker, B.R. (2001) Activation of the endothelin system in insulin resistance. *Q. J. Med.*, **94**, 321-326.
- Kannel, W.B., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W.F., et al. (1990) Diabetes, fibrinogen, and risk of cardiovascular disease: The Framingham experience. *Am. Heart J.*, **120**, 672.
- Kannel W.B., Wolf PA, Castelli WP, D'agostino RB. (1987) Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA*, **258**, 1183-1186.

- Kelly, C.J.G., Lyall, H., Petrie, J.R., Gould, G.W., Connel, J.M.C., Rumley, A., Lowe, G.D.O., Sattar, N. (2002) A specific elevation in tissue plasminogen activator antigen in women with polycystic ovarian syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 3287-3290.
- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4651-4655.
- Kuttann, F., Mowszowicz, I., Shaison, G., Mauvais-Jarvis, P. (1977) Androgen production and skin metabolism in hirsutism. *J. Endocrinol.*, **78**, 83-91.
- Lakhani, K., Constantinovici, N., Purcell, W.M., Fernando, R. & Hardiman, P. (2000) Internal carotid-artery response to 5% carbon dioxide in women with polycystic ovaries. *The Lancet*, **356**, 1166-1167.
- Laurindo, F.R.M., Pedro, M.A., Barbeiro, H.V., Pileggi, F., Carvalho, M.H.C., Augusto, O., Lemos da Luz, P. (1994) Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ. Res.*, **74**, 700-709.
- Lees, C., Jurkovic, D., Zaidi, J., Campbell, S. (1998) Unexpected effect of a nitric oxide donor on uterine artery Doppler velocimetry in oligomenorrhic women with polycystic ovaries. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, **11**, 129-132.
- Lefkowitz, J., Plow, E.F., Topol, E.J. (1995) Mechanisms of disease: platelet glycoprotein IIB/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 1553-1559.
- Legro, R.S., Kusanman, A.R., Dodson, V.C., et al. (1999) Prevalence and predictors of the risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 165-174.
- Levin, E.R. Endothelins. (1995) *N. Engl. J. Med.*, **333**, 356-363.
- Libby, P. (1995) Molecular basis of the acute coronary syndromes. *Circulation*, **92**, 657-671.
- Lindahl B, Asplund K, Eliasson M, Evrin P. (1996) Insulin resistance syndrome and fibrinolytic activity: The Northern Sweden MONICA Study. *Int. J. Epidemiol.*, **25**, 291-99.

- Lisboa, K.O., Mattiello, S., Spritzer, P.M. (1997) Diagnóstico etiológico do hirsutismo em uma amostra de 122 pacientes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **41**, 18-23.
- Lobo, R.A., Goebelsmann, U., Horton, R. (1983) Evidence for the importance of peripheral tissue events in the development of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **57**, 393-397.
- Malo-Ranta, U., Ylä-Herttuala, S., Metsä-Ketälä, et al. (1994) Nitric oxide donor GEA3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett.*, **337**, 179-183.
- Mather, K.J., Verma, S., Coreblum, B. & Anderson, T.J. (2000) Normal endothelial function despite insulin resistance in health women with the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1851-1856.
- McIntyre, M., Dominiczak, A.F. (1997) Nitric oxide and cardiovascular disease. *Postgrad. Med. J.*, **73**, 630-634.
- Michelmore, K.F., Balen, A.H., Dunger, D.B., Vessey, M.P. (1999) Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in young women. *Clin. Endocrinol.*, **51**, 779-786.
- Michelson, A.D., Benoit, S.E., Furman, M.I., et al. (1996) Effects of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide on platelet surface glycoproteins. *Am. J. Physiol.*, **270**, H1640-1648.
- Morales, A.J., Laughlin, G.A., Butzow, T., Maheshwari, H., Baumann, G., Yen, S.S., et al. (1996) Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in non-obese and obese women with polycystic ovary syndrome: Common and distinct features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 2854-2864.
- Morise, T., Takeuchi, Y., Kawano, M., Koni, I., Takeda, R. (1995) Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von willebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care*, **18**, 87-89.
- Mowszowicz, I., Melanitou, E., Doukani, A., Wright, F., Kuttan, F., Mauvais-Jarvis, P. (1983) Androgen binding capacity and 5[alpha]-reductase activity in pubic skin fibroblasts from hirsute patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 1209-1213.

- Nácul, A.P., Comim, F., Spritzer, P.M. (2003) Aspectos neuroendócrinos na síndrome dos ovários policísticos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **47**, 432-439.
- Oliveira, I.O., Lhullier, C., Brum, I.S., Spritzer, P.M. (2003) Gene expression of type 2 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. *Steroids*, **68**, 641-649.
- Oppermann, K., Cho, M.M., Spritzer, P.M. (1993) LH serum levels in the differential diagnosis of hirsute anovulatory women. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **26**, 799-803.
- Paradisi, G., Steinberg, H.O., Hempfling, A., Cronin, J., Hook, G., Shepard, M.K., Baron, A.D. (2001) Polycystic ovary syndrome is associate with endothelial dysfunction. *Circulation*, **103**,1410-1415.
- Petrie, J.R., Ueda, S., Webb, D.J., Elliot, H.L., Connel, J.M. (1996) Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation*, **93**, 1331-1333.
- Poy, M., Wiltgen, D., Spritzer, P.M. (2001) Perfil hormonal e metabólico em pacientes hirsutas com a síndrome dos ovários policísticos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **45**, 352-360.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 481-487.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S. (1987) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **92**, 639-646.
- Raines, E.W., Ross, R. (1993) Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br. Heart J.*, **69**, S30-S37.
- Robinson, S., Henderson, A.D., Gelding, S.V., et al. (1996) Dyslipidaemia is associated with insulin resistance in women with polycystic ovaries. *Clin. Endocrinol.*, **44**, 277-284.

- Sampson, M., Kong, C., Patel, A., Unwin, R., Jacobs, H.S. (1996) Ambulatory blood pressure profiles and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity in lean women with and without the polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol.*, **45**, 623-629.
- Scarabin PY, Vissac A, Kirzin JM, Bourgeat P, Amiral J, Agher R, Guize L. (1996) Population correlates of coagulation Factor VII. Importance of age, sex, and menopausal status as determinants of activated Factor VII. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **16**, 1170-1176.
- Serafini, P., Lobo, R.A. (1985) Increased 5 $\alpha$ -reductase activity in idiopathic hirsutism. *Fertil. Steril.*, **43**, 74-78.
- Schmitz, G., Hankowitz, J., Kovacs, E.M. (1991) Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Atherosclerosis*, **88**, 109-132.
- Sharpless, J.L. (2003) Polycystic ovary syndrome and the metabolic syndrome. *Clinical Diabetes*, **21**, 154-161.
- Speroff, L. (1998) Oral contraceptives and arterial and venous thrombosis: a clinician's formulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **179**, s25-36.
- Spritzer, P.M., Kuttann, F. (1985) L'hirsutism: comment s'em débarrasser? *Presse Médicale*, **14**, 1065.
- Spritzer, P.M., Mallmann, E.S. (2001) Abordagem diagnóstico-terapêutica da amenorréia. In: Vilar, L., Castellar, E., Moura, E., et al, editors. *Endocrinologia Clínica*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Medsi, 483-493.
- Spritzer, P.M., Maturama, M.A., Farias, A., Bittencourt Jr, P.I.H. (2000) Nitric oxide levels and hyperinsulinemia in postmenopausal women: relationship with hormonal, metabolic and anthropometric measurements. Recent research in Gynecological Endocrinology. The Proceedings of the free communications and poster sessions of the 8<sup>th</sup> World Congress of Gynecological Endocrinology. Florence, Italy.
- Spritzer, P.M., Oppermann-Lisboa, K., Mattiello, S., Lhulier, F. (2000) Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin. Endocrinol.*, **52**, 587-594.



- Spritzer, P.M., Oppermann-Lisboa, K., Poy, M. (1997) Hiperandrogenismo. In: Freitas, F., Menke, C.H., Rivoire, W.A., Passos, E. P., et al. Rotinas em Ginecologia e Obstetrícia. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas.
- Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., Baron, A.D. (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the Syndrome of Insulin Resistance. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2601-2610.
- Talbott, E.O., Guzick, D.S., Sutton-Tyrrell, K., McHugh-Pemu, K.P., Zborowski, J.V., Remsberg, K.E., Kuller, L.H. (2000) Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2414-2421.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, **81**, 19-25.
- Tsanadis, G., Vartholomatos, G., Korkontzelos, I., Avgoustatos, F., Kakosimos, G., Sotiriadis, A., Tatsioni, A., Eleftheriou, A., Lolis, D. (2002) Polycystic ovarian syndrome and thrombophilia. *Hum. Reprod.*, **17**, 314-319.
- Umans, J.G., Levi, R. (1995) Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 771-790.
- Vague, P., Juhan-Vague, I., Aillaud, M.F. *et al.* (1986) Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level and relative body weight in normal and obese subjects. *Metabolism*, **35**, 250.
- Wild, S., Pierpoint, T., McKeigue, P., Jacobs, H. (2000) Cardiovascular disease I women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin. Endocrinol.*, **52**, 595-600.
- Wollesen, F., Berglund, L., Berne, C. (1999) Plasma endothelin-1 and total insulin exposure in diabetes mellitus. *Clin. Sci.*, **97**, 149-156.

- Yildirim, B., Sabir, N., Kaleli, B. (2003) Relation of intra-abdominal fat distribution to metabolic disorders in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, **79**, 1358-1364.
- Yildiz, B.O., Haznedaroglu, I.C., Kirazli, S., Bayraktar, M. (2002) Global fibrinolytic capacity decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 3871-3875.
- Zawadzki, J.K., Dunaif, A. (1990) Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Evans J.R., Hersaltine, S., Marriam, G.R., editors. Polycystic ovary syndrome. Boston: Blackwell, 377-384.

**III – ARTIGO**  
**Versão em inglês**

## **Nitric oxide and fibrinogen levels in patients with polycystic ovary syndrome and idiopathic hirsutism**

**Short title:** Nitric oxide and fibrinogen in PCOS patients

Andrea Prestes NÁCul, Cláudia Dieckel Andrade, Patrícia Scharwz, Paulo Ivo Homem Bittencourt Jr, Poli Mara Spritzer

Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul), PRONEX 26/98 (Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência em Pesquisa) and FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA).

### **Corresponding author:**

Poli Mara Spritzer, MD, PhD

Department of Physiology

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170 Porto Alegre, RS - Brazil

Phone: +55-51-3316-3671/Fax: +55-51-3316-3453

E-mail: [spritzer@ufrgs.br](mailto:spritzer@ufrgs.br)

**Keywords:** hirsutism, polycystic ovary syndrome, androgens, endothelial dysfunction, dysfibrinolysis, nitric oxide, fibrinogen, insulin resistance.

## SUMMARY

**Objective:** To assess endothelium-derived nitric oxide and fibrinogen levels in hirsute patients with polycystic ovary syndrome in comparison with ovulatory patients presenting idiopathic hirsutism.

**Design:** Cross-sectional study

**Patients:** Twenty-six women with PCOS and 20 age-matched women with regular, ovulatory cycles, normal androgen levels and isolated hirsutism (idiopathic hirsutism), as a control group.

**Measurements:** Nitric oxide ( $\text{NO}^{3+}$  plus  $\text{NO}^{2-}$  concentrations) and fibrinogen plasma levels were assessed and analyzed in association with anthropometric, metabolic and hormonal variables.

**Results:** The groups were similar in terms of positive familiar history for diabetes and Ferriman-Gallwey score for hirsutism. There were no significant differences in nitric oxide or fibrinogen levels between groups. In contrast, in PCOS-only patients, insulin levels and the homeostatic model assessment (HOMA) were negatively correlated with NO levels ( $r=-0.42$   $p<0.03$ ). Age, BMI and waist circumference were the only variables positively correlated with fibrinogen when all patients were considered.

**Conclusion:** The present data indicate a negative and BMI-independent association between NO levels with insulin resistance in PCOS patients but not with androgen levels. These results support the notion that clinical strategies aimed at reducing insulin resistance may be beneficial in PCOS patients not only to prevent diabetes and dislipidemia but also to decrease the insulin resistance-dependent risk for endothelial dysfunction in these patients.

## INTRODUCTION

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), characterized by hirsutism, irregular menstrual cycles and infertility, is associated with insulin resistance and compensatory hyperinsulinaemia in nearly 20-70% of cases. Although it is present both in lean and obese patients, insulin resistance seems to be more frequent and produce greater metabolic impact in obese PCOS patients (Dunaif et al., 1989; Spritzer et al., 2001; Ehrmann et al., 1999).

Insulin resistance is associated with a plenty of metabolic disorders including impaired glucose tolerance (Dunaif et al., 1989; Spritzer et al., 2001) hyperlipidaemia (Graf et al., 1990), endothelial dysfunction (Petrie et al., 1996), dysfibrinolysis (Vague et al., 1986). All these disorders together contribute to an increased risk of vascular arterial and venous disease in these patients. Impaired glucose tolerance and or type-2 diabetes mellitus (DM) are also more prevalent in PCOS patients when compared with weight and age-matched health controls or women with idiopathic hirsutism (Spritzer et al., 2001; Ehrmann et al., 1999; Legro et al., 1999). Insulin resistance is associated with an atherogenic lipid profile, with increase of total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and decrease of HDL-cholesterol. Moreover, insulin resistance is also associated with markers of endothelial dysfunction (Petrie et al., 1996; Spritzer et al., 2000; Irving et al., 2001; Steinberg et al., 1996).

Endothelium derived nitric oxide (NO) has important actions against atherosclerosis, through reduction in platelet and monocyte adhesion to the endothelium, inhibition of vascular smooth muscle proliferation and migration and reduction on lipid peroxidation (McIntyre & Dominiczak, 1997). NO is also a potent endogenous vasodilator in humans and plays a major role in the regulation of vascular tone and pressure. Synthesis of NO and insulin sensitivity is positively related in healthy humans (Petrie et al., 1996). Increased levels of endothelin-1, another product of endothelium secretion and a marker of vascular disease, have also been associated to insulin resistance and endothelial dysfunction (Irving et al., 2001). Therefore, an

impaired endothelial function could confer to insulin-resistant PCOS patients a greater risk of macrovascular disease.

Data concerning endothelial dysfunction and PCOS are still conflicting (Diamant-Kandarakis et al., 2001; Paradisi et al., 2001; Mather et al., 2000; Sampson et al., 1996; Lakhani et al., 2000; Wild et al., 2000) probably because of the young age of the studied patients and the absence of overt cardiovascular disease. Talbott et al (2000) have recently described that a significant difference in carotid intima-media wall thickness (IMT) was found only in older PCOS patients ( $\geq 45$  years-old) in comparison with normal control women with same age. Moreover, to the best of our knowledge, no data has been reported regarding nitric oxide levels in PCOS patients, a putative candidate to an early marker of endothelial dysfunction.

It has been suggested that fibrinogen is an independent risk factor for cardiovascular disease and is associated with insulin resistance (Lindahl et al., 1996; Ernst & Resch, 1993). A meta-analysis including six epidemiological studies have shown evidences suggesting an association of increased fibrinogen with acute myocardial infarction and stroke (Ernst & Resch, 1993). In contrast, the only study of this meta-analysis that evaluated female patients showed significant association of fibrinogen with coronary heart disease, but not with stroke (Kannel et al., 1987). Another study has also reported higher fibrinogen levels in PCOS patients (Atiomo et al., 1998).

Therefore, the aim of this study was to assess NO and fibrinogen levels in PCOS patients in comparison with age-matched ovulatory patients presenting idiopathic hirsutism.

## **PATIENTS AND METHODS**

### *Patients*

The study population included women consulting for hirsutism, seen consecutively during a 2-year period at the Gynecological Endocrinology Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Late-onset (non-classic) congenital adrenal hyperplasia patients were excluded on the basis of a high plasma level of 17-hydroxyprogesterone ( $> 5$  ng/dl) and/or its marked increase after ACTH stimulation ( $> 12$  ng/dl) (Spritzer et al., 1990; Aziz et al., 1994). Patients with the following conditions were also excluded: hyperprolactinemia (serum prolactin levels higher than  $20 \mu\text{g/L}$  on two different occasions); thyroid dysfunction; pregnancy; delivery, miscarriage or surgery in the last three months; use of heparin or aspirin within 15 days of the test; smoking; history of malignance or liver dysfunction.

Fifty patients were initially selected for the study. Three lost follow-up and 1 did not fulfill the diagnostic criteria of PCOS. Forty-six patients, whose ages ranged from 12 to 42 years, were enrolled in the study. None had received any drugs known to interfere with hormonal levels for at least 3 months before the study. The mean score for hirsutism, assigned by the original method of Ferriman and Gallwey (F-G) (1961), was  $19 \pm 7$  (Ferriman & Gallwey, 1961). Twenty-six patients were diagnosed as having polycystic ovary syndrome (PCOS) and 20 as having idiopathic hirsutism (IH).

The diagnosis of PCOS was based on the physical features of hyperandrogenism, disturbed menstrual cycles, elevated serum LH or LH/FSH ratio, increased levels of serum testosterone, FAI and/or androstenedione, and absence of ovarian or adrenal neoplasm or Cushing's syndrome. Although transabdominal or transvaginal ovarian ultrasound was performed on most of the patients and enlarged, cystic ovaries were detected, ultrasound was not required for the diagnosis of PCOS (Adams et al., 1986; Rotterdam, 2004; Herter et al., 1996).



Idiopathic hirsutism was diagnosed, as previously described (Spritzer et al., 2001; Spritzer et al., 2000; Comin & Spritzer, 2004), in hirsute patients with regular, ovulatory cycles (luteal phase progesterone levels higher than 12 nmol/L), normal androgen levels, and without any known underlying disease. The study protocol was approved by the local Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all subjects.

The study protocol was approved by the local Ethics Committee (IRB-equivalent), and written informed consent was obtained from all subjects.

### *Study Protocol*

Anthropometric measurements included body weight, height, waist circumference, waist-to-hip ratio (WHR) (waist circumference was recorded at the narrowest point or at the umbilicus, and hip circumference at the level of the greater trochanter), and BMI (current measured weight in kg divided by height in m<sup>2</sup>).

The hormonal and metabolic assessment was made between days 2 and 10 of the menstrual cycle or on any day when the patients were amenorrheic. Two blood samples were drawn from an antecubital vein for determination of seric glucose and insulin: one after an overnight fast, and another 2 hours after the ingestion of 75 g of glucose (OGTT). Impaired glucose tolerance (IGT) was determined by glucose levels between 140 and 200 mg/ml on a 2-hour glucose tolerance test, as defined by the World Health Organization (Harris et al., 1985).

Blood samples were also drawn for nitric oxide, fibrinogen, LH, FSH, SHBG, total testosterone, androstenedione, cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides determinations. All samples were obtained between 8 and 10 a.m.

The free androgen index was estimated by dividing T (nmol/L) / SHBG (nmol/L) x 100. Homeostatic Model Assessment (HOMA) was calculated by multiplying insulin ( $\mu$ IU/ml) to glucose (mmol/l) and dividing this product to 22.5. The HOMA value correlates well with clamp techniques and has been used to study insulin resistance in PCOS patients of differing ethnic origins (Mather et al., 2001). The cut-off point to define insulin resistance has been considered as equal or higher than 3.8. (Wijeyaratne et al., 2002)

### *Assays*

Total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, and glucose were determined by colorimetric-enzymatic methods using the Mega (Bayer, Leverkusen, Germany). LDL cholesterol was determined indirectly using the formula  $LDL = total\ cholesterol - HDL + triglycerides / 5$ .

Serum LH and FSH were measured by specific immunometric assay (Diagnostic Products Corporation-DPC, Los Angeles) with an assay sensitivity of 0.05 mIU/ml for LH, and 0.1 mIU/ml for FSH and intra- and interassay CV of 3.6 % and 6.7%, respectively, for LH, and 2.1% and 4.3% for FSH. Serum androstenedione (A) levels were measured using the RIA method (DSL, Webster, Texas) with an assay sensitivity of 0.03 ng/ml, and intra- and interassay CV of 4.3% and 6%, respectively. Total serum testosterone (T) levels were measured with the RIA method (ICN, Costa Mesa, CA) with an intra- and interassay CV of 10% and 11.6%, respectively. SHBG was measured by chemiluminescent enzyme immunoassay (DPC, Los Angeles, CA) with an assay sensitivity of 0.2 nmol/L, and intra- and interassay CV of 6.1% and 8.0%, respectively. Serum insulin levels were measured with electrochemiluminescence immunoassay (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim) with an assay sensitivity of 0.20  $\mu$ IU/ml and an intra- and interassay CV of 1.8% and 2.5%, respectively.

### *Quantitative determination of fibrinogen*

Quantitative determination of fibrinogen plasma levels was measured by the clotting method of Clauss with Fibri-Prest® Automate (Diagnostica Stago, Asnieres-Sur-Seine – FRANCE).

### *Nitric oxide (NO) assay*

NO production was assessed by measuring plasma  $\text{NO}^{3+}$  plus  $\text{NO}^{2-}$  concentrations by the nitrate reductase-Griess method, using a commercial kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor – MI, USA).

### *Statistical analysis*

Results are presented as means  $\pm$  SD or median and interquartile range. Comparisons between the two group means were analyzed by Student t test; comparisons between median values were analyzed using the Mann-Whitney U test. Chi-square test was used to compare qualitative variables. Pearson's rank or Spearman's correlation coefficients were calculated between variables using a two-tailed significance test for variables with a gaussian or non-gaussian distribution, respectively. Partial correlations of fibrinogen levels and WHR, waist, SHBG, glucose 120' and HOMA were calculated (adjusted for BMI).

All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, USA). Data were considered to be significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Table 1 shows the baseline clinical features of the patients with PCOS and IH. No significant differences were observed between the two groups on age, age of pubarche, age of menarche, birth weight, weight, BMI, waist circumference, waist to hip ratio and Ferriman-Gallwey score for hirsutism. Twenty-one (45.6%) of patients were overweight or obese, with a body mass index (BMI) greater than 25 kg/m<sup>2</sup> (14 in the PCOS group and 7 in the IH group). There was a higher prevalence of overweight and obese patients in the PCOS group in relation to IH group, although not statistically significant. The positive familiar history for diabetes was similar in both groups, being 50% for PCOS and 55% for IH.

Fifty percent of PCOS and 35% of IH patients had insulin resistance assessed by the Homeostatic Model Assessment (HOMA), while impaired glucose tolerance was diagnosed in 4 (16%) and 1 (5,6%) patient of the PCOS and IH groups, respectively (Figure 1).

Table 2 shows similar nitric oxide serum levels as well as fibrinogen plasma levels between the both groups of hirsute patients. As expected, free androgen index and androstenedione levels were significantly higher in PCOS patients than IH women, even after controlling the analyses for BMI. Two-hour post OGTT glucose, fast insulin, HOMA, total cholesterol and triglycerides levels were higher in PCOS patients but without statistical significance. However, after adjustment to BMI the results became similar between the groups.

No correlations were observed between NO secretion and age, BMI, WHR or waist circumference neither in PCOS nor IH patients. Lipids, SHBG and androgen levels also did not present any correlation with NO. In turn, as shown in Table 3A, a negative and significant BMI-independent correlation was observed between NO with insulin levels and with HOMA

only in patients with PCOS. The effect-size of insulin resistance in decreasing NO levels is small, implicating a decrease of 0,52  $\mu\text{mol/L}$  and 0,15  $\mu\text{mol/L}$  in the NO to an increase of 71.75 pmol/L in insulin levels and 1 unit in HOMA, respectively. Even though, 18% of NO variance can be explained for insulin resistance in PCOS patients.

Table 3B shows a significant correlation between fibrinogen and BMI, found in both PCOS and IH patients. As expected, for the positive correlations between fibrinogen and WHR, waist circumference, SHBG and post OGTT glucose levels, the significance was lost after adjusting the analysis to BMI. While a correlation between fibrinogen and age was observed for the group of all patients and in the IH patients, no significant correlations were verified regarding fibrinogen with NO, lipids, TT, A, FAI, HOMA or fasting and post OGTT insulin levels. Therefore, weight was responsible for 32% of the fibrinogen variance in this group of hirsute patients with PCOS and IH.

## DISCUSSION

Women with PCOS are characterized by hyperandrogenemia and high incidence of hyperinsulinemia/insulin resistance, obesity and other signs associated to the metabolic syndrome. Thus, the association of PCOS with an increased risk for cardiovascular disease remains a plausible hypothesis and subject of great interest (Lakhani et al., 2000; Wild et al., 2000; Talbott et al., 2000; Birdsall et al., 1997; Loucks et al., 2000; Sharpless, 2003; Christian et al., 2003). We previously reported a positive and age- and BMI-independent association between endogenous androgens and hyperinsulinemia in postmenopausal women, in the absence of overt clinical disease (Maturana & Spritzer, 2002). In the present paper, we studied the relationship of hyperinsulinemia, lipids and androgen excess with NO and fibrinogen levels beyond the association with obesity *per se*, in PCOS patients. These PCOS women were assessed and compared to a group of IH women. We believe that ovulatory IH women can be

considered as an especially apt control group, since their hirsutism is similar to that of PCOS patients, however without the hormonal alterations that distinguish PCOS (Spritzer et al., 2001; Spritzer et al., 2000; Comin & Spritzer, 2004). In turn, we observed a higher prevalence of overweight and obese patients in the PCOS group in spite of no statistical differences. Therefore, considering that obesity is a powerful confounding influence when evaluating the potential independent association of PCOS with endothelial dysfunction and disfibrinolysis, we decided to control the analysis for the BMI.

No differences on NO or on fibrinogen levels were observed between PCOS patients and the control group of IH women. In turn, a negative correlation was observed between NO and insulin levels or HOMA only in the group of PCOS patients. In addition, fibrinogen levels presented a positive correlation with age and BMI when all patients were considered.

Insulin resistance and/or obesity have been associated to impaired production/release of endothelium-derived NO and endothelial dysfunction (Petrie et al., 1996; Steinberg et al., 1996). In contrast, only few studies have analyzed the endothelial function in PCOS patients. Paradisi et al (Paradisi et al., 2001) demonstrated a lower endothelium-dependent vasodilation response to metacholine (MCh) in PCOS patients in comparison to a control group, as a possible effect of an impaired NO secretion. Talbott et al (2000) found an increase of carotid intima-media wall thickness (IMT) only in PCOS patients older than 45 years, that was attenuated by fasting insulin and WHR adjustments, suggesting that, at least in part, the association of PCOS and IMT were related to insulin resistance and central obesity. In contrast, Mather et al (2000) showed no evidence of impaired endothelial function in PCOS patients compared with controls, despite marked differences in glucose/insulin ratio and free androgen index (FAI) between groups. There was no correlation between the degree of insulin resistance or hyperandrogenism and the brachial arterial diameter at ultrasound (Mather et al., 2000). Moreover, to the best of our knowledge, no studies regarding NO levels in PCOS patients are available on the literature.

While a negative correlation was observed between NO and markers of insulin resistance, like insulin levels or HOMA in our PCOS patients, no association were observed with BMI. These data suggest that, at least in PCOS patients, endothelial function is related rather with the presence of insulin resistance than with obesity per se.

The relation of endothelial dysfunction and hyperandrogenism in women with PCOS is not well established. The presence of sexual steroids receptors on the endothelium wall suggests that androgens could have direct effects on the vessels (Lin et al., 1986), although the results of the studies trying to assess this issue are still conflicting. Association between androgens levels and endothelial dysfunction were demonstrated by Paradisi et al (2001) and Diamant-Kandarakis et al (2001). In the former, there was a direct correlation between free testosterone with the magnitude of impairment of endothelium-dependent vasodilation. Free testosterone was responsible for 27% of the variance of the maximal leg blood flow (LBF) response to MCh (Paradisi et al., 2001). In the latter, positive correlations of endothelin-1 and free testosterone were demonstrated (Diamant-Kandarakis et al., 2001).

In turn, Bernini et al (1999), evaluating the relationship between endogenous androgens and carotid intimal-medial thickness (IMT) in pre and post-menopausal women reported an independent, inverse and significant correlation between carotid IMT and free testosterone.

In the present paper, in spite of the higher androgen levels observed in PCOS patients compared to IH women, no correlation was observed between NO and androgen levels. These data indicate that hyperandrogenism seems to have no influence on NO levels, at least when young women with PCOS are considered. Our data are in agreement with those of Mather et al (2000) that did not find any association of endothelium-dependent or -independent responses with androgens levels.

Previous studies have already demonstrated that high HDL-C has a vascular protective role (O'Brien et al., 1997; Zeiher et al., 1994) and that when older PCOS women are studied,

LDL-C and triglycerides were associated with carotid atherosclerosis (Talbot et al., 2000). However, the relationship of lipids and endothelial dysfunction are still not well established. One study found a weak inverse association between LDL-cholesterol levels and endothelium-dependent vasodilation (Steinberg et al., 1996). In PCOS women, no association was found between lipids and the MCh-induced peak endothelium-dependent vasodilation (Paradisi et al., 2001). We also did observe no associations between NO and lipids or lipoproteins. However, it is important to stress that the lipid profile of both groups ranged within the normal values. Moreover, both PCOS and IH patients presented similar serum concentrations of HDL and LDL-cholesterol and the observed total cholesterol and triglycerides differences among the groups were dependent of the BMI.

Fibrinogen may represent an independent risk factor for cardiovascular disease (Ernst & Resch, 1993; Folsom et al., 1991) and has been recently recognized as a component of the metabolic syndrome (Lindahl et al., 1996; Imperatore et al., 1998). Although the effect of insulin on plasma fibrinogen synthesis is inhibitory rather than stimulatory (De Feo et al., 1993), in a state of insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, the impaired peripheral insulin action could cause increases in fibrinogen levels. Moreover, high levels of fibrinogen have been shown to be an independent predictor of vascular complications in type II diabetes (Ganda & Arkin, 1992).

PCOS is a disorder characterized by insulin resistance in a number of patients and some studies have previously reported controversial data concerning coagulation and fibrinolysis in these patients. Fibrinogen levels in PCOS patients were reported either as increased (Kelly et al., 2002; Dereli et al., 2003) or as at similar levels (Dahlgren et al., 1994; Yildiz et al., 2002) when compared to control groups.

Despite similar levels of fibrinogen between the groups, our data show a moderate association between fibrinogen and BMI but not with androgens. Considering the well known association between fibrinogen and age (Ernst & Resch, 1993) and the previous evidence pointing to a state of hypercoagulability and disfibrinolysis in PCOS patients with insulin



resistance (Sampson et al., 1996; Kelly et al., 2002; Dereli et al., 2003; Dahlgren et al., 1994; Yildiz et al., 2002), the selection of older women with history of PCOS as well as the use of other hemostatic parameters, evaluating the fibrinolytic system in a global way, could be more efficient in demonstrate a possible link between fibrinogen and PCOS.

In conclusion, our data indicate an association between NO levels and insulin resistance in PCOS patients but not with androgen levels. The present results support the notion that clinical strategies aimed at reducing insulin resistance, like life style changes and the use of insulin-sensitizing drugs may be beneficial not only to prevent diabetes and dislipidemia but also to decrease the insulin resistance-dependent risk for endothelial dysfunction. Further studies are required to clarify the role of androgens on the pathogenesis of endothelial dysfunction in PCOS and specifically investigate the androgen action and/or the gene receptor in modulating NO secretion.

## REFERENCES

- Adams, J., Polson, D.W., Franks, S. (1986) Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *British Medical Journal*, **293**, 355-359.
- Atiomo, W.U., Bates, S.A., Condon, J.E., Shaw, S. (1998) The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **69(2)**, 236-241.
- Aziz, R., Dewailly, D., Owerbach, D. (1994) Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **78**, 810-815.
- Bernini, G.P., Sgro, M., Moretti, A., Argenio, G.F., Barlascini, C.O., Cristofani, R., Salvetti, A. (1999) Endogenous androgens and carotid intimal-medial thickness in women. *Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 2008-2012.

- Birdsall, M.A., Farquhar, C.M., White, H.D. (1997) Association between polycystic ovaries and extent of coronary artery disease in women having cardiac catheterization. *Annals of Internal Medicine*, **126**, 32-35.
- Christian, R.C., Dumesic, D.A., Behrenbeck, T., Oberg, A.L., Sheedy II, P.F., Fitzpatrick, L.A. (2003) Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 2562-2568.
- Comin, F.V., Spritzer, P.M. (2004) Increased growth hormone response to clonidine in nonobese normoinsulinemic patients with PCOS. *Fertility and Sterility*, **81**, 108-113.
- Dahlgren, E., Janson, P.O., Johansson, S., Lapidus, L., Lindstedt, G., Tengborn, L. (1994) Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **61**, 455-460.
- De Feo, P., Volpi, E., Lucidi, P., Cruciani, G., Reboldi, G., Siepi, D., Mannarino, E., Santeusano, F., Brunetti, P., Bolli, G. (1993) Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. *Diabetes*, **42**, 95-100.
- Dereli, D., Ozgen, G., Buyukkececi, F., Guney, E., Yilmaz, C. (2003) Platelet dysfunction in lean women with polycystic ovary syndrome and association with insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 2263-2268.
- Diamant-Kandarakis, E., Spina, G., Kouli, C., Migdalis, I. (2001) Increase endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86(10)**, 4666-4673.
- Dunaif, A., Segal, K.R., Futterweit, W., Dobrjansky A. (1989) Profound peripheral insulin resistance independent of obesity in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, **38(3)**, 1165-1174.

- Ehrmann, D.A., Barnes, R.B., Rosenfield, R.L., Cavaghan M.K., Imperial J. (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, **22**, 141-146.
- Ernst, E., Resch, K.L. (1993) Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Annals of Internal Medicine*, **118**, 956-963.
- Ferriman, D., Gallwey, J.D. (1961) Clinical assessment of body hair growth in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **21**, 1140 –1148.
- Folsom, A.R., Wu, K.K., Davis, C.E., Conlan, M.G., Sorlie, P.D., Szklo, M. (1991) Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, **91**, 191-205.
- Ganda, Arkin, F. (1992) Hyperfibrinogenemia: a major determinant of vascular complications in diabetes. In: Ernst, E.; ed. *Fibrinogen, A “New” Cardiovascular Risk Factor*. Oxford: Blackwell.
- Graf, M.J., Richards, C.J., Brown, V., Meissner, L., Dunaif, A. (1990) The independent effects of hyperandrogenaemia, hyperinsulinaemia and obesity on lipid and lipoprotein profiles in women. *Clinical Endocrinology*, **33**, 119-131.
- Harris, M.I., Hadden, W.C., Knowler, W.C., Bennett P.H. (1985) International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, **8(6)**, 562-567.
- Herter, L.D., Magalhães, J.A., Spritzer, P.M. (1996) Relevance of the determination of ovarian volume in adolescent girls with menstrual disorders. *Journal of Clinical Ultrasound*, **24**, 243-248.
- Imperatore, G., Riccardi, G., Iovine, C., Rivellese, A.A., Vaccaro, O. (1998) Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes Care*, **21**, 649-654.
- Irving, R.J., Noon, J.P., Watt, G.C.M., Webb, D.J., Walker, B.R. (2001) Activation of the endothelin system in insulin resistance. *Quarterly Journal of Medicine.*, **94**, 321-326.

- Kannel, W.B., Wolf, P.A., Castelli, W.P., D'agostino, R.B. (1987) Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA*, **258**, 1183-1186.
- Kelly, C.J.G., Lyall, H., Petrie, J.R., Gould, G.W., Connel, J.M.C., Rumley, A., Lowe, G.D.O., Sattar, N. (2002) A specific elevation in tissue plasminogen activator antigen in women with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3287-3290.
- Lakhani, K., Constantinovici, N., Purcell, W.M., Fernando, R. & Hardiman, P. (2000) Internal carotid-artery response to 5% carbon dioxide in women with polycystic ovaries. *Lancet*, **356**, 1166-1167.
- Legro, R.S., Kunesman, A.R., Dodson, V.C., Dunaif A. (1999) Prevalence and predictors of the risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 165-174.
- Lin, A.L., Gonzalez, Jr. R., Carey, K.D., Shain, S.A. (1986) Estradiol-17 $\beta$  affects estrogen receptor distribution and elevates progesterone receptor content in baboon aorta. *Arteriosclerosis*, **6**, 495-504.
- Lindahl, B., Asplund, K., Eliasson, M., Evrin, P. (1996) Insulin resistance syndrome and fibrinolytic activity: The Northern Sweden MONICA Study. *International Journal of Epidemiology*, **25**, 291-299.
- Loucks, T.L., Talbott, E.O., McHugh, K.P., Keelan, M., Berga, S.L., Guzick, D.S. (2000) Do polycystic-appearing ovaries affect the risk of cardiovascular disease among women with polycystic ovary syndrome? *Fertility and Sterility*, **74**, 547-552.
- Mather, K.J., Verma, S., Coreblum, B. & Anderson, T.J. (2000) Normal endothelial function despite insulin resistance in health women with the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85(5)**, 1851-1856.
- Mather, K.J., Hunt, A.E., Steinberg, H.O., Paradisi G., Hook G., Katz A, Quon M.J., Baron A D. (2001) Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: implications

- for research applications. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86(11)**, 5457-5464.
- Maturana, M.A., Spritzer, P.M. (2002) Association between hyperinsulinemia and endogenous androgen levels in peri-and postmenopausal women. *Metabolism*, **51**, 238-243.
- McIntyre, M., Dominiczak, A.F. (1997) Nitric oxide and cardiovascular disease. *Postgraduate Medical Journal*, **73**, 630-634.
- O'Brien, S.F., Watts, G.F., Playford, D.A., Burke, V., O'Neal, D.N., Best, J.D. (1997) Low-density lipoprotein size, high-density lipoprotein concentration, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetic Medicine*, **14**, 974-978.
- Paradisi, G., Steinberg, H.O., Hempfling, A., Cronin, J., Hook, G., Shepard, M.K., Baron, A.D. (2001) Polycystic ovary syndrome is associate with endothelial dysfunction. *Circulation*, **103**,1410-1415.
- Petrie, J.R., Ueda, S., Webb, D.J., Elliot, H.L., Connel, J.M. (1996) Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation*, **93**, 1331-1333.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary Syndrome. *Fertility and Sterility*, **81(1)**, 19-25.
- Sampson, M., Kong, C., Patel, A., Unwin, R., & Jacobs, H.S. (1996) Ambulatory blood pressure and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity in lean women with and without the polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, **45**, 623-629.
- Sharpless, J.L. (2003) Polycystic ovary syndrome and the metabolic syndrome. *Clinical Diabetes*, **21**, 154-161.
- Spritzer, P.M., Poy, M., Wiltgen, D., Mylius, L.S., Capp, E. (2001) Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH

- and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Human Reproduction*, **16**, 1340-1346.
- Spritzer, P.M., Maturama, M.A., Farias, A., Bittencourt Jr, P.I.H. (2000) Nitric oxide levels and hyperinsulinemia in postmenopausal women: relationship with hormonal, metabolic and anthropometric measurements. *Recent research in Gynecological Endocrinology*. The Proceedings of the free communications and poster sessions of the 8<sup>th</sup> World Congress of Gynecological Endocrinology. Florence, Italy.
- Spritzer, P.M., Oppermann-Lisboa, K., Mattiello, S., Lhullier, F. (2000) Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clinical Endocrinology*, **52**, 587-594.
- Spritzer, P., Billaud, L., Thalabard, J.C., Birman, P., Mowszowicz, I., Raux-Demay, M.C., Clair F., Ktttenn F., Mauvais-Jarvis P. (1990) Cyproterone Acetate versus Hydrocortisone treatment in Late-Onset Adrenal Hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **70**, 642-646.
- Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., Baron, A.D. (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the Syndrome of Insulin Resistance. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 2601-2610.
- Talbott, E. O., Guzick, D.S., Sutton-Tyrrell, K., McHugh-Pemu, K.P., Zborowski, J.V., Remsberg, K.E., Kuller, L.H. (2000) Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **20**, 2414-2421.
- Vague, P., Juhan-Vague, I., Aillaud, M.F., Badier C., Viard R., Alessi M.C., Collen D. (1986) Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level and relative body weight in normal and obese subjects. *Metabolism*, **35(3)**, 250-253.

- Yildiz, B.O., Haznedaroglu, I.C., Kirazli, S., Bayraktar, M. (2002) Global fibrinolytic capacity decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3871-3875.
- Wijeyaratne, C.N., Balen, A.H., Barth, J.H., Belchetz P.E. (2002) Clinical manifestations and insulin resistance (IR) in polycystic ovary syndrome (PCOS) among South Asians and Caucasians: is there a difference? *Clinical Endocrinology*, **57**, 343-350.
- Wild, S., Pierpoint, T., McKeigue, P. & Jacobs, H. (2000) Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clinical Endocrinology*, **52**, 595-600.
- Zeiger, A.M., Schachinger, V., Hohnloser, S.H., Saubier, B., Just, H. (1994) Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans: elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation*, **89**, 2525-2532.

**Table I** - Clinical and anthropometric data for hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH)

	PCOS ( <i>n</i> =26)	IH ( <i>n</i> =20)	p
Age (years) <sup>a</sup>	21,4 ± 6,6	23,0 ± 7,8	0,44
Pubarche (age) <sup>b</sup>	11(8,5-11,5)	10 (9-11)	0,81
Menarche (age) <sup>b</sup>	12 (11-13)	12 (11-13)	0,91
Birth weight (g) <sup>a</sup>	3060 ± 447	3255 ± 492	0,33
Weight (kg) <sup>b</sup>	64,3 (55,9 – 96,1)	59,7 (52,7 – 70,6)	0,14
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	26,1 (21,5 – 36,9)	22,9 (20,8 – 29,2)	0,17
Waist circumference (cm) <sup>b</sup>	88 (70,5-105,7)	75 (69,5 – 82)	0,08
WHR <sup>b</sup>	0,8 (0,7 – 0,9)	0,8 (0,7 – 0,8)	0,11
Ferriman <sup>b</sup>	16 (12 – 25)	16 (11- 23)	0,34

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD (Student's *t* test) or <sup>b</sup> as median and interquartile range (25% to 75%) (Mann-Whitney *U* test).



**Table II** – Nitric oxide and fibrinogen levels, hormonal and metabolic data for hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH)

	PCOS (n=26)	IH (n=20)	P	P**
Testosterone (nmol/L) <sup>a</sup>	4,51 ± 2,01	3,48 ± 1,56	0,07	
SHBG (nmol/L) <sup>a</sup>	26,2 ± 17,3	34,8 ± 8,7	0,03	0,267
FAI <sup>b</sup>	15,48 (10,7 – 41,56)	9,46 (6,43 – 13,59)	0,003	0,03
Androstenedione (nmol/L) <sup>a</sup>	9,84 ± 3,98	7,22 ± 2,37	0,009	0,015
Nitric oxide (µmol/L) <sup>a</sup>	11,92 ± 4,23	11,33 ± 5,12	0,67	
Fibrinogen (mg/dl) <sup>a</sup>	330 ± 72	338 ± 78	0,72	
Fasting glucose (mmol/L) <sup>b</sup>	4,8 (4,4 – 5,3)	4,7 (4,4 – 4,9)	0,42	
2-hour glucose (mmol/L) <sup>a</sup>	5,7 ± 1,9	4,8 ± 1,2	0,07	0,56
Fasting insulin (pmol/L) <sup>b</sup>	147 (84 – 246)	112 (56 – 144)	0,06	0,19
2-hour insulin (pmol/L) <sup>b</sup>	553 (353 – 1256)	445 (203 – 767)	0,28	
HOMA <sup>b</sup>	3,76 (2,55 – 7,81)	3,14 (1,62 – 4,56)	0,08	0,24
Total Cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	4,75 ± 0,9	4,31 ± 0,74	0,09	0,19
HDL-C (mmol/L) <sup>a</sup>	1,37 ± 0,25	1,31 ± 0,23	0,59	
LDL-C (mmol/L) <sup>a</sup>	2,84 ± 0,67	2,58 ± 0,64	0,24	
Triglycerides (mmol/L) <sup>b</sup>	1,06 (0,75 – 1,54)	0,73 (0,53 – 1,06)	0,02	0,16

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD (Student's *t* test) or <sup>b</sup> as median and interquartile range (25% to 75%) (Mann-Whitney *U* test).

\*\*P adjusted by analyses of covariance with BMI as a covariate.

**Table III (A and B)** - Correlations between nitric oxide and fibrinogen with anthropometric, hormonal, and metabolic variables in hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH)

**A**

<b>NO versus</b>	PCOS + IH (n=46)		PCOS (n=26)		IH (n=20)	
	r	p	R	p	r	p
Fasting glucose	rs = -0,27	0,06	rs = -0,26	0,18	rs = -0,35	0,12
2-hour glucose	r = -0,171	0,27	R = -0,34	0,08	r = -0,11	0,64
Fasting insulin	rs = -0,18	0,21	rs = -0,42	0,03	rs = 0,01	0,94
2-hour insulin	rs = -0,03	0,81	rs = -0,16	0,44	rs = 0,04	0,86
HOMA	rs = -0,21	0,15	rs = -0,42	0,03	rs = 0,02	0,92

**B**

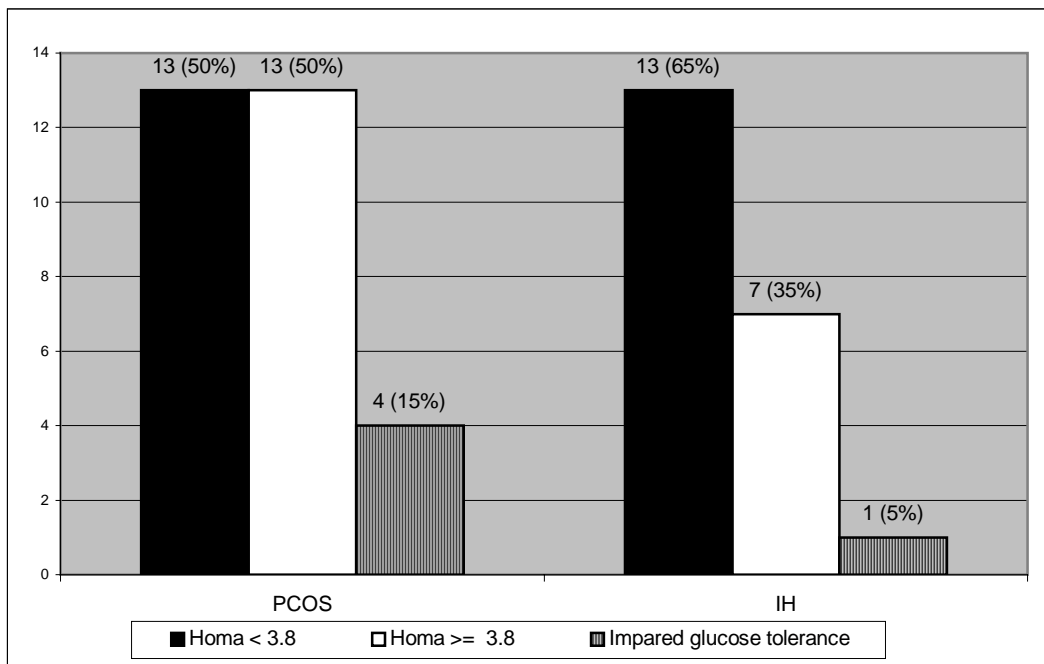
<b>Fibrinogen versus</b>	PCOS + HI (n=46)			PCOS (n=26)			HI (n=20)		
	r	p	p*	r	p	p*	r	p	p*
Age	r = 0,37	0,01		r = 0,19	0,33		r = 0,56	0,01	
BMI	rs = 0,57	0,000		rs = 0,49	0,01		rs = 0,73	0,000	
WHR	rs = 0,40	0,01	0,31	rs = 0,52	0,01	0,11	rs = 0,27	0,26	
Waist	rs = 0,54	0,000	0,34	rs = 0,54	0,009	0,20	rs = 0,54	0,02	0,53
SHBG	r = -0,3	0,04	0,78	r = -0,426	0,03	0,32	r = -0,14	0,56	
Fast glucose	rs = 0,16	0,26		rs = 0,09	0,64		rs = 0,24	0,30	
2-hour glucose	r = 0,37	0,01	0,8	r = 0,48	0,01	0,47	r = 0,26	0,30	

r, Pearson correlation coefficient; rs, Spearman's rank correlation coefficient.

\*, p adjusted for BMI in partial correlation

**Figure legend**

**Figure 1:** Prevalence of insulin resistance and impaired glucose tolerance, assessed by HOMA and glucose levels 2 hs OGTT in hirsute patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic hirsutism (IH)

**Fig 1**

**IV – ARTIGO**  
**Versão em português**

**Níveis de óxido nítrico e fibrinogênio em pacientes com síndrome dos ovários policísticos e hirsutismo idiopático.**

Andrea Prestes Nácul, Cláudia Dieckel Andrade, Patrícia Scharwz, Paulo Ivo Homem Bittencourt Jr, Poli Mara Spritzer

Unidade de Endocrinologia Ginecológica/ Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

## RESUMO

**Introdução:** O óxido nítrico (NO) e o fibrinogênio são importantes marcadores de disfunção endotelial e de disfibrinólise, respectivamente, sendo essas alterações relacionadas à resistência insulínica. A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS), caracterizada por irregularidade menstrual e anovulação crônica, está associada com resistência à insulina e hiperinsulinemia em porcentagem considerável dos casos. A disfunção endotelial, decorrente da resistência insulínica e de alterações nos níveis de NO e de fibrinogênio, poderia conferir a essas pacientes um maior risco de doença macrovascular.

**Objetivo:** Avaliar níveis séricos de óxido nítrico e de fibrinogênio em pacientes com PCOS e compará-los aos de pacientes com Hirsutismo Idiopático (HI).

**Materiais e métodos:** Estudo transversal. Foram avaliados níveis de óxido nítrico e de fibrinogênio e suas associações com variáveis antropométricas, metabólicas e hormonais em 26 pacientes hirsutas com PCOS e 20 pacientes do grupo controle com HI (ciclos regulares e ovulatórios, níveis normais de androgênios e hirsutismo isolado).

**Resultados:** Os grupos foram semelhantes quanto à história familiar de diabetes e gravidade do hirsutismo pelo escore de Ferriman-Gallway. Não houve diferenças significativas nos níveis de NO e de fibrinogênio entre os grupos PCOS e HI. Entretanto, nas pacientes com PCOS, insulina e HOMA (Homeostatic Model Assessment) foram negativamente correlacionadas com níveis de NO ( $r=-0.42$   $p<0.03$ ). Considerando-se todas as pacientes, idade, índice de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura tiveram correlação positiva com níveis de fibrinogênio.

**Conclusão:** Os resultados mostram associação negativa e não dependente do IMC entre NO e resistência insulínica, mas não com níveis de androgênios, apenas nas pacientes com PCOS. Assim, as estratégias clínicas que objetivam a redução da resistência insulínica podem trazer

benefícios às pacientes com PCOS não somente para a prevenção de diabetes e de dislipidemia, mas também para a redução do risco de disfunção endotelial nessas pacientes.



## INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (PCOS), caracterizada por hirsutismo, ciclos menstruais irregulares e infertilidade, está associada com resistência insulínica e hiperinsulinemia compensatória em aproximadamente 20-70% dos casos. Embora esteja presente tanto em pacientes obesas quanto magras, a resistência insulínica parece ser mais freqüente e produzir maior impacto metabólico em pacientes obesas com PCOS. (Dunaif e cols., 1989; Spritzer e cols., 2001; Ehrmann e cols., 1999).

A resistência insulínica está associada com diversas alterações metabólicas incluindo intolerância à glicose (Dunaif e cols., 1989; Spritzer e cols., 2001), dislipidemia (Graf e cols., 1990), disfunção endotelial (Petrie e cols., 1996) e disfibrinólise (Vague e cols., 1986). Todas estas alterações contribuem com conjunto para um aumento no risco de doença arterial e venosa nestes pacientes. A intolerância à glicose e/ou diabetes tipo 2 (DM) são também mais prevalentes em pacientes com PCOS quando comparados com controles de mesmo peso e idade ou mulheres com hirsutismo idiopático (Spritzer e cols., 2001; Ehrmann e cols., 1999; Legro e cols., 1999). A resistência insulínica está associada com um perfil lipídico aterogênico, com aumento do colesterol total, colesterol-LDL, triglicerídeos e diminuição do HDL-colesterol. Além disso, a resistência insulínica está também associada com marcadores de disfunção endotelial (Petrie e cols., 1996; Spritzer e cols., 2000; Irving e cols., 2001; Steinberg e cols., 1996).

O óxido nítrico derivado do endotélio (NO) tem ações importantes contra a aterosclerose, através da redução na agregação plaquetária e monocitária ao endotélio, inibição da proliferação e migração da camada muscular vascular e redução da peroxidação lipídica. (McIntyre & Dominiczak, 1997). O NO também é um potente vasodilatador endógeno em humanos e exerce um papel prioritário na regulação do tônus vascular e na pressão. A síntese de NO e a sensibilidade à insulina estão positivamente relacionadas em humanos (Petrie e

cols., 1996). O aumento nos níveis de endotelina-1 (ET-1), outro produto da secreção endotelial e marcador de doença vascular, também tem sido associado com resistência insulínica e disfunção endotelial (Irving e cols., 2001). Assim, uma alteração na função endotelial poderia conferir às pacientes com PCOS hiperinsulinêmicas maior risco de doença macrovascular.

Dados a respeito de disfunção endotelial e PCOS são ainda conflitantes (Diamant-Kandarakis e cols., 2001; Paradisi e cols., 2001; Mather e cols., 2000; Sampson e cols., 1996; Lakhani e cols., 2000; Wild e cols., 2000) provavelmente devido à idade jovem das pacientes estudadas e da ausência de doença cardiovascular (DCV) clínica. Talbott e cols. (2000) recentemente descreveram uma diferença significativa na espessura da camada íntima-média das artérias carotídeas apenas nas pacientes com PCOS mais velhas ( $\geq 45$  anos) em comparação com controles de mesma idade. Além disso, não temos conhecimento de algum estudo que tenha avaliado níveis de óxido nítrico em pacientes com PCOS, um candidato putativo a marcador precoce de disfunção endotelial.

O fibrinogênio tem sido apontado como um fator de risco independente para DCV e está associado com resistência insulínica (Lindahl e cols., 1996; Ernst & Resch, 1993). Uma meta-análise incluindo seis estudos epidemiológicos mostrou evidências sugerindo uma associação do aumento do fibrinogênio com infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (Ernst & Resch, 1993). Em contraste, o único estudo desta meta-análise que avaliou pacientes femininas mostrou associação do fibrinogênio com doença coronariana, mas não com acidente vascular cerebral (Kannel e cols., 1987). Outro estudo relatou níveis mais elevados de fibrinogênio em pacientes com PCOS (Atiomo e cols., 1998).

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar níveis de NO e de fibrinogênio em pacientes com PCOS em comparação com pacientes de mesma idade, ovulatórias e com hirsutismo idiopático.

## PACIENTES E MÉTODOS

### *Pacientes*

A população de estudo incluiu mulheres que consultaram por hirsutismo na Unidade de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante um período consecutivo de 2 anos. Hiperplasia adrenal congênita forma não-clássica foi excluída na presença de níveis basais elevados de 17-hidroxiprogesterona ( $> 5$  ng/dl) e/ou aumento marcado após estimulação com ACTH ( $> 12$  ng/dl) (Spritzer e cols. 1990, Aziz e cols. 1994). Pacientes com as seguintes condições também foram excluídas: hiperprolactinemia (níveis séricos de prolactina maiores do que  $20 \mu\text{g/L}$  em duas ocasiões diferentes); disfunção da tireóide; gestação; parto, abortamento ou cirurgia nos últimos 3 meses; uso de heparina ou aspirina dentro de 15 dias do teste; tabagismo; história de câncer ou disfunção hepática.

Cinquenta pacientes foram inicialmente selecionados para o estudo. Destas, 3 perderam o seguimento e 1 não preencheu os critério diagnósticos de PCOS. Quarenta e seis pacientes, cuja idade variou de 11 a 42 anos, foram selecionadas para o estudo. Nenhuma paciente fez uso de qualquer droga que pudesse interferir com os níveis hormonais por pelo menos 3 meses antes do estudo. O escore médio para hirsutismo, aferido pelo método de Ferriman e Gallwey (F-G) (1961) foi  $19 \pm 7$  (Ferriman & Gallwey 1961). Vinte e seis pacientes tiveram o diagnóstico de PCOS e 20 de HI.

O diagnóstico de PCOS foi baseado nas características clínicas de hiperandrogenismo, irregularidade menstrual, níveis séricos elevados de LH ou da relação LH/FSH, níveis séricos elevados de testosterona total, índice de testosterona livre (ITL) e/ou androstenediona, e exclusão de neoplasia ovariana ou adrenal ou síndrome de Cushing. Embora ultrassonografia transabdominal ou transvaginal tenha sido feita na maioria das pacientes, com detecção de ovários aumentados e policísticos, este exame não foi requerido para o diagnóstico de PCOS. (Adams e cols., 1986; Rotterdam, 2004; Herter e cols., 1996).

O hirsutismo idiopático foi diagnosticado, como previamente descrito (Spritzer e cols., 2001; Spritzer e cols., 2000; Comin & Spritzer, 2004), em pacientes hirsutas com ciclos menstruais regulares e ovulatórios (progesterona na fase lútea maior do que 3.8 ng/ml), níveis normais de androgênios, e nenhuma causa subjacente conhecida.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local, e todas as pacientes assinaram termo de consentimento informado.

#### *Protocolo de estudo*

As medidas antropométricas incluíram peso, altura, circunferência da cintura, relação cintura-quadril (RCQ) (a circunferência da cintura foi medida como o ponto mais estreito ou ao nível do umbigo, e a circunferência do quadril ao nível do trocanter maior) e índice de massa corporal (peso/altura<sup>2</sup>).

As dosagens hormonais e metabólicas foram feitas entre o 2º e o 10º dia do ciclo menstrual ou em qualquer dia se a paciente estivesse em amenorréia. Duas amostras de sangue foram retiradas de uma veia antecubital para a determinação de glicose e insulina sérica: uma após jejum de 12 horas e outra após duas horas da ingestão de 75 g de glicose. O diagnóstico de intolerância à glicose foi determinado por níveis de glicose entre 140 e 200 mg/ml no tempo 2 horas no teste de tolerância, como definido pela Organização Mundial de Saúde (1985).

Amostras de sangue foram retiradas para dosagem de óxido nítrico, fibrinogênio, LH, FSH, SHBG, testosterona total, androstenediona, colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos. Todas as amostras foram obtidas entre 8 e 10 horas da manhã.

O índice de testosterona livre foi estimado pela equação  $T \text{ (nmol/L)} / \text{SHBG (nmol/L)} \times 100$ . Homeostatic Model Assessment (HOMA) foi calculado através do produto da insulina ( $\mu\text{IU/ml}$ ) e glicose (mmol/l), dividido por 22,5. O valor do HOMA se correlaciona bem com

as técnicas de clampe e tem sido utilizado para avaliar resistência insulínica em pacientes com PCOS de diferentes origens étnicas (Wijeyaratne e cols. 2002, Mather e cols. 2001). O ponto de corte considerado para definir resistência insulínica foi um valor maior ou igual a 3,8. (Wijeyaratne e cols. 2002)

#### *Dosagens laboratoriais*

Colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e glicose foram determinadas por método enzimático colorimétrico usando o kit Mega (Bayer, Leverkusen, Germany). O LDL-colesterol foi determinado indiretamente pela fórmula  $LDL = \text{colesterol total} - HDL + \text{triglicerídeos} / 5$ .

LH e FSH séricos foram medidos por ensaio imunométrico (Diagnostic Products Corporation-DPC, Los Angeles) com sensibilidade de 0,05 mUI/ml para LH, 0,1 mIU/ml para FSH e coeficiente de variação (CV) intra- e inter-ensaio de 3,6% e 6,7%, respectivamente para LH e 2,1% e 4,3% para FSH. A testosterona total foi medida por método de radioimunoensaio (RIA) (ICN, Costa Mesa, CA) com um CV intra- e interensaio de 10% e 11,6%, respectivamente. A androstenediona foi medida por método de RIA (DSL, Webster, Texas) com sensibilidade de 0,03 ng/ml e CV intra-ensaio de 4,3% e interensaio de 6%. A SHBG foi dosada por ensaio imunométrico (DPC, Los Angeles, CA) com sensibilidade de 0,2 nmol/L e CV intra- e interensaio de 6,1% e 8%. Os níveis séricos de insulina foram medidos por imunoensaio de eletroquimioluminescência (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim) com uma sensibilidade de 0,20  $\mu$ IU/ml e um CV intra- e interensaio de 1,8% e 2,5%, respectivamente.

#### *Determinação quantitativa de fibrinogênio*

A determinação quantitativa de fibrinogênio foi realizada através do método de Clauss com Fibri-Prest® Automate (Diagnostica Stago, Asnieres-Sur-Seine – FRANCE).

### *Dosagem de óxido nítrico (NO)*

A produção de NO foi acessada pela medida das concentrações plasmáticas de  $\text{NO}^{3+}$  e  $\text{NO}^{2-}$  pelo método de Griess-nitrato redutase, utilizando um kit comercial (Cayman Chemical Company, Ann Arbor – MI, USA).

### *Análise estatística*

Os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  desvio-padrão ou medianas e intervalo interquartil. Comparações entre dois grupos foram analisadas pelo teste “t” de Student; comparações entre medianas foram analisadas usando-se Teste Mann-Whitney U, para amostras independentes. Coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman foram utilizados para correlações bivariadas entre as variáveis numéricas, conforme a natureza gaussiana ou não-gaussiana da variável, respectivamente. Correlações parciais de níveis de fibrinogênio com RCQ, cintura, SHBG, glicemia duas horas após o TTG e HOMA foram calculadas (ajustadas para o IMC). A análise estatística foi realizada usando-se *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Chicago, IL, USA), sendo considerado como significativo um valor de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

A tabela 1 mostra as características clínicas das pacientes com PCOS e HI. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos em relação à idade, idade da pubarca, idade da menarca, peso ao nascimento, IMC, circunferência da cintura, RCQ e escore de Ferriman-Gallwey para hirsutismo. Vinte e uma (45,6%) pacientes eram sobrepeso ou obesas, com um índice de massa corporal (IMC) maior do que  $25 \text{ Kg/m}^2$  (14 no grupo das PCOS e 7 no grupo das HI). Houve uma maior prevalência de sobrepeso e obesidade no grupo das pacientes com PCOS em relação ao grupo das HI, embora esta diferença não tenha sido

estatisticamente significativa. História familiar de diabetes foi similar nos dois grupos, sendo de 50% no grupo com PCOS e de 55% no grupo com HI.

Cinquenta por cento das pacientes com PCOS e 35% das com HI tinham resistência insulínica acessada pelo método “Homeostatic Model Assessment” (HOMA), com intolerância à glicose diagnosticada em 4 (16%) e 1 (5,6%) pacientes com PCOS e HI, respectivamente (Figura 1).

A tabela 2 mostra níveis séricos de NO bem como níveis plasmáticos de fibrinogênio similares entre os grupos de pacientes hirsutas. Como esperado, o ITL e os níveis de androstenediona foram significativamente maiores nas pacientes com PCOS do que nas HI, mesmo após controle da análise para o IMC. A glicemia duas horas após o TTG, insulina basal, HOMA, colesterol total e triglicérides foram maiores nas pacientes com PCOS, porém sem significância estatística. De qualquer modo, após ajuste para o IMC os resultados ficaram similares entre os grupos.

Não foram observadas correlações entre níveis de óxido nítrico e idade, IMC, RCQ ou circunferência do quadril em nenhum dos grupos de pacientes hirsutas. Lipídios, SHBG ou androgênios não apresentaram correlações com NO. Por outro lado, como demonstrado na tabela 3A, uma correlação negativa e significativa, independente do IMC foi observada entre NO com níveis de insulina e com HOMA apenas no grupo das pacientes com PCOS. O tamanho de efeito da resistência insulínica em diminuir níveis de NO é pequeno, implicando uma diminuição de 0,52  $\mu\text{mol/L}$  e 0,15  $\mu\text{mol/L}$  no NO para um aumento de 10  $\mu\text{IU/ml}$  nos níveis de insulina e de 1 unidade no HOMA, respectivamente. Entretanto, 18% da variância do NO pode ser explicada pela resistência insulínica nas pacientes com PCOS.

A tabela 3B mostra uma correlação significativa entre fibrinogênio e IMC, encontrada tanto no grupo das pacientes com PCOS quanto nas com HI. Como esperado, as correlações positivas entre fibrinogênio e RCQ, circunferência da cintura, SHBG e níveis de glicose após o TTG foram perdidas após ajuste da análise para o IMC. Embora uma correlação entre

fibrinogênio e idade tenha sido observada no grupo total de pacientes e no grupo das HI, não foram encontradas correlações significativas de fibrinogênio com NO, lipídios, TT, A, ITL, HOMA ou níveis de insulina basal ou após o TTG em nenhum grupo. Neste grupo de pacientes hirsutas com PCOS e HI, o peso foi responsável por 32% da variância do fibrinogênio.

## DISCUSSÃO

Mulheres com PCOS são caracterizadas por hiperandrogenemia e alta incidência de hiperinsulinemia/resistência insulínica, obesidade e outros sinais associados com a síndrome metabólica. Assim, a associação de PCOS com um risco aumentado para DCV permanece uma hipótese plausível e assunto de grande interesse (Lakhani e cols., 2000; Wild e cols., 2000; Talbott e cols., 2000; Birdsall e cols., 1997; Loucks e cols., 2000; Sharpless, 2003; Christian e cols., 2003). Nós relatamos previamente uma associação positiva, independente da idade e do IMC, entre androgênios e hiperinsulinemia em mulheres pós-menopáusicas sem doença clínica aparente (Maturana & Spritzer, 2002). No presente artigo, nós estudamos a correlação de hiperinsulinemia, lipídios e excesso de androgênios com níveis de NO e fibrinogênio além da associação com obesidade *per se*, em pacientes com PCOS. Estas mulheres com PCOS foram avaliadas e comparadas com um grupo de mulheres com HI. Nós acreditamos que mulheres ovulatórias com HI podem ser consideradas um grupo controle especialmente apto, uma vez que o hirsutismo delas é similar ao de pacientes com PCOS, entretanto sem as alterações hormonais que distingue a PCOS (Spritzer e cols., 2001; Spritzer e cols., 2000; Comin & Spritzer, 2004). Por outro lado, observamos uma maior prevalência de sobrepeso e obesidade no grupo de pacientes com PCOS apesar de não haver diferença estatística significativa. Assim, considerando que a obesidade é um potente fator de confusão quando avaliamos potencial associação independente da PCOS com disfunção endotelial e disfibrinólise, nós decidimos controlar a análise para o IMC.



Não foram observadas diferenças nos níveis de NO ou fibrinogênio entre as pacientes com PCOS e o grupo controle de mulheres com HI. No entanto, uma correlação negativa foi observada entre NO e níveis de insulina ou HOMA apenas no grupo das pacientes com PCOS. Além disso, níveis de fibrinogênio apresentaram uma correlação positiva com idade e IMC quando todos as pacientes foram considerados.

A resistência insulínica e/ou obesidade têm sido associadas com alteração na produção/liberação do NO derivado do endotélio e com disfunção endotelial (Petrie e cols., 1996; Steinberg e cols., 1996). Em contraste, apenas alguns estudos têm analisado a função endotelial em pacientes com PCOS. Paradise e cols. (2001) demonstraram uma menor vasodilatação dependente do endotélio em resposta a metacolina (MCh) em pacientes com PCOS em comparação com um grupo controle, sendo um possível efeito da secreção alterada de NO. Talbot e cols. (2000) encontraram um aumento na espessura da camada íntima-média da artéria carótida apenas em pacientes com PCOS com mais de 45 anos em relação às controles normais de mesma idade. Esta diferença entre os grupos foi atenuada após ajustes na análise para insulina basal e RCQ, sugerindo que, ao menos em parte, a associação entre PCOS e espessamento da camada íntima-média carotídea estava relacionada com resistência insulínica e obesidade central. Em contraste, Mather e cols. (2000) não conseguiram mostrar evidências de alteração na função endotelial em pacientes com PCOS comparadas com controles, apesar de marcadas diferenças na relação insulina/glicose e índice de androgênios livres entre os grupos. Não houve correlação entre o grau de resistência insulínica ou hiperandrogenismo e o diâmetro da artéria braquial ao ultrassom. Além disso, não temos conhecimento de nenhum estudo na literatura que tenha avaliado níveis de NO em pacientes com PCOS.

Ao mesmo tempo em que uma correlação negativa foi observada entre NO e marcadores de resistência insulínica, como níveis de insulina ou HOMA, nas pacientes com PCOS, não houve associação com IMC. Estes resultados sugerem que, pelo menos em

pacientes com PCOS, a função endotelial está relacionada mais com a presença de resistência insulínica do que com obesidade *per se*.

A relação entre disfunção endotelial e hiperandrogenismo em mulheres com PCOS ainda não está bem estabelecida. A presença de receptores para hormônios esteróides na parede endotelial sugere que os androgênios poderiam ter efeitos diretos nos vasos (Lin e cols., 1986), embora os resultados dos estudos abordando este assunto são ainda conflitantes. Associação entre níveis de androgênios e disfunção endotelial foi demonstrada por Paradise e cols. (2001) e Diamant-Kandarakis e cols. (2001). No primeiro, houve uma correlação direta entre testosterona livre com a magnitude da alteração na vasodilatação dependente do endotélio. A testosterona livre foi responsável por 27% da variância do fluxo máximo no membro inferior em resposta à MCh (Paradise e cols. 2001). No segundo, foram demonstradas correlações positivas entre endotelina-1 e testosterona livre (Diamant-Kandarakis e cols. 2001)

Por outro lado, Bernini e cols. (1999), avaliando a relação entre androgênios endógenos e espessura da camada íntima-média carotídea em mulheres pré- e pós-menopáusicas relataram uma correlação independente, inversa e significativa, entre espessura da camada íntima-média e testosterona livre.

No presente estudo, apesar de níveis mais elevados de androgênios observados em pacientes com PCOS comparadas com controles com HI, não foram observadas correlações entre NO e níveis de androgênios. Estes resultados indicam que o hiperandrogenismo não parece ter influência nos níveis de NO, pelo menos quando mulheres jovens com PCOS são avaliadas. Nossos resultados estão em concordância com os de Mather e cols. (2000) em que não foi encontrada qualquer associação entre as respostas endotélio-dependente ou independente com níveis de androgênios.

Estudos prévios já demonstraram que níveis elevados de colesterol-HDL têm função vascular protetora (O'Brien e cols., 1997; Zeiher e cols., 1994). Quando foram estudadas mulheres mais velhas com PCOS, o colesterol-LDL e os triglicérides se associaram com

aterosclerose carotídea (Talbot e cols., 2000). Entretanto, a correlação entre lipídios e disfunção endotelial ainda não está bem estabelecida. Um estudo encontrou uma associação fraca e inversa entre níveis de colesterol-LDL e vasodilatação dependente do endotélio (Steinberg e cols., 1996). Em mulheres com PCOS não foi encontrada associação entre lipídios e vasodilatação dependente do endotélio induzida por MCh (Paradisi e cols., 2001). Nós também não observamos associações entre NO e lipídios ou lipoproteínas. Entretanto, é importante salientar que o perfil lipídico em ambos os grupos estavam dentro dos limites da normalidade. Além disso, tanto as pacientes com PCOS quanto às com HI apresentavam concentrações séricas de colesterol-HDL e LDL similares, e as diferenças observadas no colesterol total e triglicerídeos entre os grupos foram dependentes do IMC.

O fibrinogênio pode representar um fator de risco independente para DCV (Ernst & Resch, 1993; Folsom e cols., 1991) e tem sido recentemente reconhecido como um componente da síndrome metabólica (Lindahl e cols., 1996; Imperatore e cols., 1998). Embora o efeito da insulina na síntese do fibrinogênio plasmático seja inibitório, ao invés de estimulatório (De Feo e cols., 1993), um estado de resistência insulínica e hiperinsulinemia compensatória com alteração na ação periférica da insulina poderia causar aumento nos níveis do fibrinogênio. Além disso, tem sido demonstrado que níveis elevados de fibrinogênio são um fator preditivo de complicações vasculares em pacientes com diabetes tipo 2 (Ganda & Arkin, 1992).

A PCOS é um distúrbio caracterizado por resistência insulínica em uma percentagem considerável das pacientes, e alguns estudos relataram previamente resultados controversos em relação à coagulação e fibrinólise nestas pacientes. Foram relatados níveis de fibrinogênio tanto elevados (Kelly e cols., 2002; Dereli e cols., 2003) quanto similares (Dahlgren e cols., 1994; Yildiz e cols., 2002) em pacientes com PCOS comparadas com grupo controle.

Apesar de níveis similares de fibrinogênio entre os grupos, nossos resultados mostram uma associação moderada entre fibrinogênio e IMC, porém não com androgênios. Considerando a associação bem conhecida entre fibrinogênio e idade (Ernst & Resch, 1993) e

as evidências prévias apontando para um estado de hipercoagulabilidade e disfibrinólise em pacientes com PCOS e resistência insulínica (Sampson e cols., 1996; Kelly e cols., 2002; Dereli e cols., 2003; Dahlgren e cols., 1994; Yildiz e cols., 2002), a seleção de mulheres mais velhas com história de PCOS e o uso de outros parâmetros hemostáticos, avaliando o sistema fibrinolítico de uma maneira global, poderia ser mais eficiente em demonstrar uma possível ligação entre fibrinogênio e PCOS.

Em conclusão, nossos resultados indicam uma associação entre níveis de NO e resistência insulínica em pacientes com PCOS, porém não com níveis de androgênios. O presente estudo apóia a idéia de que estratégias clínicas objetivando a redução da resistência insulínica, alterações no estilo de vida e o uso de agentes sensibilizadores da ação da insulina poderiam ser benéficas não apenas para prevenir o diabetes e a dislipidemia, mas também para diminuir o risco de disfunção endotelial dependente da resistência insulínica. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel dos androgênios na patogênese da disfunção endotelial na PCOS e especificamente investigar a ação androgênica e/ou o gene do receptor na modulação da secreção de NO.

## REFERÊNCIAS

- Adams, J., Polson, D.W., Franks, S. (1986) Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism.. *British Medical Journal*, **293**, 355-359.
- Atiomo, W.U., Bates, S.A., Condon, J.E., Shaw, S. (1998) The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*., **69(2)**, 236-241.
- Aziz, R., Dewailly, D., Owerbach, D. (1994) Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*., **78**, 810-815.

- Bernini, G.P., Sgro, M., Moretti, A., Argenio, G.F., Barlascini, C.O., Cristofani, R., Salvetti, A. (1999) Endogenous androgens and carotid intimal-medial thickness in women. *Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 2008-2012.
- Birdsall, M.A., Farquhar, C.M., White, H.D. (1997) Association between polycystic ovaries and extent of coronary artery disease in women having cardiac catheterization. *Annals of Internal Medicine*, **126**, 32-35.
- Christian, R.C., Dumesic, D.A., Behrenbeck, T., Oberg, A.L., Sheedy II, P.F., Fitzpatrick, L.A. (2003) Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 2562-2568.
- Comin, F.V., Spritzer, P.M. (2004) Increased growth hormone response to clonidine in nonobese normoinsulinemic patients with PCOS. *Fertility and Sterility*, **81**, 108-113.
- Dahlgren, E., Janson, P.O., Johansson, S., Lapidus, L., Lindstedt, G., Tengborn, L. (1994) Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **61**, 455-460.
- De Feo, P., Volpi, E., Lucidi, P., Cruciani, G., Reboldi, G., Siepi, D., Mannarino, E., Santeusano, F., Brunetti, P., Bolli, G. (1993) Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. *Diabetes*, **42**, 95-100.
- Dereli, D., Ozgen, G., Buyukkececi, F., Guney, E., Yilmaz, C. (2003) Platelet dysfunction in lean women with polycystic ovary syndrome and association with insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 2263-2268.
- Diamant-Kandarakis, E., Spina, G., Kouli, C., Migdalis, I. (2001) Increase endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86(10)**, 4666-4673.

- Dunaif, A., Segal, K.R., Futterweit, W., Dobrjansky A. (1989) Profound peripheral insulin resistance independent of obesity in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, **38(3)**, 1165-1174.
- Ehrmann, D.A., Barnes, R.B., Rosenfield, R.L., Cavaghan M.K., Imperial J. (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, **22**, 141-146.
- Ernst, E., Resch, K.L. (1993) Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Annals of Internal Medicine*, **118**, 956-963.
- Ferriman, D., Gallwey, J.D. (1961) Clinical assessment of body hair growth in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **21**, 1140 –1148.
- Folsom, A.R., Wu, K.K., Davis, C.E., Conlan, M.G., Sorlie, P.D., Szklo, M. (1991) Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, **91**, 191-205.
- Ganda, Arkin, F. (1992) Hyperfibrinogenemia: a major determinant of vascular complications in diabetes. In: Ernst, E.; ed. *Fibrinogen, A “New” Cardiovascular Risk Factor*. Oxford: Blackwell.
- Graf, M.J., Richards, C.J., Brown, V., Meissner, L., Dunaif, A. (1990) The independent effects of hyperandrogenaemia, hyperinsulinaemia and obesity on lipid and lipoprotein profiles in women. *Clinical Endocrinology*, **33**, 119-131.
- Harris, M.I., Hadden, W.C., Knowler, W.C., Bennett P.H. (1985) International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, **8(6)**, 562-567.
- Herter, L.D., Magalhães, J.A., Spritzer, P.M. (1996) Relevance of the determination of ovarian volume in adolescent girls with menstrual disorders. *Journal of Clinical Ultrasound*, **24**, 243-248.
- Imperatore, G., Riccardi, G., Iovine, C., Rivellese, A.A., Vaccaro, O. (1998) Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes Care*, **21**, 649-654.

- Irving, R.J., Noon, J.P., Watt, G.C.M., Webb, D.J., Walker, B.R. (2001) Activation of the endothelin system in insulin resistance. *Quarterly Journal of Medicine.*, **94**, 321-326.
- Kannel, W.B., Wolf, P.A., Castelli, W.P., D'agostino, R.B. (1987) Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA*, **258**, 1183-1186.
- Kelly, C.J.G., Lyall, H., Petrie, J.R., Gould, G.W., Connel, J.M.C., Rumley, A., Lowe, G.D.O., Sattar, N. (2002) A specific elevation in tissue plasminogen activator antigen in women with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3287-3290.
- Lakhani, K., Constantinovici, N., Purcell, W.M., Fernando, R. & Hardiman, P. (2000) Internal carotid-artery response to 5% carbon dioxide in women with polycystic ovaries. *Lancet*, **356**, 1166-1167.
- Legro, R.S., Kunesman, A.R., Dodson, V.C., Dunaif A. (1999) Prevalence and predictors of the risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 165-174.
- Lin, A.L., Gonzalez, Jr. R., Carey, K.D., Shain, S.A. (1986) Estradiol-17 $\beta$  affects estrogen receptor distribution and elevates progesterone receptor content in baboon aorta. *Arteriosclerosis*, **6**, 495-504.
- Lindahl, B., Asplund, K., Eliasson, M., Evrin, P. (1996) Insulin resistance syndrome and fibrinolytic activity: The Northern Sweden MONICA Study. *International Journal of Epidemiology*, **25**, 291-299.
- Loucks, T.L., Talbott, E.O., McHugh, K.P., Keelan, M., Berga, S.L., Guzick, D.S. (2000) Do polycystic-appearing ovaries affect the risk of cardiovascular disease among women with polycystic ovary syndrome? *Fertility and Sterility*, **74**, 547-552.
- Mather, K.J., Verma, S., Coreblum, B. & Anderson, T.J. (2000) Normal endothelial function despite insulin resistance in health women with the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, **85(5)**, 1851-1856.

- Mather, K.J., Hunt, A.E., Steinberg, H.O., Paradisi G., Hook G., Katz A, Quon M.J., Baron A D. (2001) Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: implications for research applications. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86(11)**, 5457-5464.
- Maturana, M.A., Spritzer, P.M. (2002) Association between hyperinsulinemia and endogenous androgen levels in peri-and postmenopausal women. *Metabolism*, **51**, 238-243.
- McIntyre, M., Dominiczak, A.F. (1997) Nitric oxide and cardiovascular disease. *Postgraduate Medical Journal*, **73**, 630-634.
- O'Brien, S.F., Watts, G.F., Playford, D.A., Burke, V., O'Neal, D.N., Best, J.D. (1997) Low-density lipoprotein size, high-density lipoprotein concentration, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetic Medicine*, **14**, 974-978.
- Paradisi, G., Steinberg, H.O., Hempfling, A., Cronin, J., Hook, G., Shepard, M.K., Baron, A.D. (2001) Polycystic ovary syndrome is associate with endothelial dysfunction. *Circulation*, **103**,1410-1415.
- Petrie, J.R., Ueda, S., Webb, D.J., Elliot, H.L., Connel, J.M. (1996) Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation*, **93**, 1331-1333.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary Syndrome. *Fertility and Sterility*, **81(1)**, 19-25.
- Sampson, M., Kong, C., Patel, A., Unwin, R., & Jacobs, H.S. (1996) Ambulatory blood pressure and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity in lean women with and without the polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, **45**, 623-629.
- Sharpless, J.L. (2003) Polycystic ovary syndrome and the metabolic syndrome. *Clinical Diabetes*, **21**, 154-161.



- Spritzer, P.M., Poy, M., Wiltgen, D., Mylius, L.S., Capp, E. (2001) Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Human Reproduction*, **16**, 1340-1346.
- Spritzer, P.M., Maturama, M.A., Farias, A., Bittencourt Jr, P.I.H. (2000) Nitric oxide levels and hyperinsulinemia in postmenopausal women: relationship with hormonal, metabolic and anthropometric measurements. *Recent research in Gynecological Endocrinology*. The Proceedings of the free communications and poster sessions of the 8<sup>th</sup> World Congress of Gynecological Endocrinology. Florence, Italy.
- Spritzer, P.M., Oppermann-Lisboa, K., Mattiello, S., Lhullier, F. (2000) Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clinical Endocrinology*, **52**, 587-594.
- Spritzer, P., Billaud, L., Thalabard, J.C., Birman, P., Mowszowicz, I., Raux-Demay, M.C., Clair F., Ktttenn F., Mauvais-Jarvis P. (1990) Cyproterone Acetate versus Hydrocortisone treatment in Late-Onset Adrenal Hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **70**, 642-646.
- Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., Baron, A.D. (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the Syndrome of Insulin Resistance. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 2601-2610.
- Talbott, E. O., Guzick, D.S., Sutton-Tyrrell, K., McHugh-Pemu, K.P., Zborowski, J.V., Remsberg, K.E., Kuller, L.H. (2000) Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **20**, 2414-2421.
- Vague, P., Juhan-Vague, I., Aillaud, M.F., Badier C., Viard R., Alessi M.C., Collen D. (1986) Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level and relative body weight in normal and obese subjects. *Metabolism*, **35(3)**, 250-253.

- Yildiz, B.O., Haznedaroglu, I.C., Kirazli, S., Bayraktar, M. (2002) Global fibrinolytic capacity decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3871-3875.
- Wijeyaratne, C.N., Balen, A.H., Barth, J.H., Belchetz P.E. (2002) Clinical manifestations and insulin resistance (IR) in polycystic ovary syndrome (PCOS) among South Asians and Caucasians: is there a difference? *Clinical Endocrinology*, **57**, 343-350.
- Wild, S., Pierpoint, T., McKeigue, P. & Jacobs, H. (2000) Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clinical Endocrinology*, **52**, 595-600.
- Zeiger, A.M., Schachinger, V., Hohnloser, S.H., Saubier, B., Just, H. (1994) Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans: elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation*, **89**, 2525-2532.

**Tabela I** – Avaliação clínica e antropométrica em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)

	PCOS (N=26)	HI (n=20)	p
Idade (anos) <sup>a</sup>	21,4 ± 6,6	23,0 ± 7,8	0,44
Pubarca (anos) <sup>b</sup>	11(8,5-11,5)	10 (9-11)	0,81
Menarca (anos) <sup>b</sup>	12 (11-13)	12 (11-13)	0,91
Peso nascimento (g) <sup>a</sup>	3060 ± 447	3255 ± 492	0,33
Peso (kg) <sup>b</sup>	64,3 (55,9 – 96,1)	59,7 (52,7 – 70,6)	0,14
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	26,1 (21,5 – 36,9)	22,9 (20,8 – 29,2)	0,17
Cintura (cm) <sup>b</sup>	88 (70,5-105,7)	75 (69,5 – 82)	0,08
RCQ <sup>b</sup>	0,8 (0,7 – 0,9)	0,8 (0,7 – 0,8)	0,11
Ferriman <sup>b</sup>	16 (12 – 25)	16 (11- 23)	0,34

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± DP (Teste T de Student) e <sup>b</sup> mediana e intervalo interquartil (25% to 75%) (Teste de Mann-Whitney *U*).

**Tabela II** – Avaliação hormonal, metabólica, níveis de óxido nítrico e fibrinogênio em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)

	PCOS (n=26)	HI (n=20)	P	P**
Testosterona (ng/ml) <sup>a</sup>	1,01 ± 0,45	0,78 ± 0,35	0,07	
SHBG (nmol/L) <sup>a</sup>	26,2 ± 17,3	34,8 ± 8,7	0,03	0,267
ITL <sup>b</sup>	15,48 (10,7 - 41,56)	9,46 (6,43 - 13,59)	0,003	0,03
Androstenediona (ng/ml) <sup>a</sup>	2,82 ± 1,14	2,07 ± 0,68	0,009	0,015
Óxido nítrico (μmol/L) <sup>a</sup>	11,92 ± 4,23	11,33 ± 5,12	0,67	
Fibrinogênio (mg/dl) <sup>a</sup>	330 ± 72	338 ± 78	0,72	
Glicemia basal (mg/dl) <sup>b</sup>	87 (80 - 95)	84 (79 - 89)	0,42	
Glicemia 120' (mg/dl) <sup>a</sup>	102 ± 35	86 ± 21	0,07	0,56
Insulina basal (μUI/ml) <sup>b</sup>	20,5 (11,8 - 34,4)	15,7 (7,9 - 20,1)	0,06	0,19
Insulina 120' (μUI/ml) <sup>b</sup>	77,2 (49,2 - 175,1)	62,1 (28,4 - 106,9)	0,28	
HOMA <sup>b</sup>	3,76 (2,55 - 7,81)	3,14 (1,62 - 4,56)	0,08	0,24
Colesterol total (mg/dl) <sup>a</sup>	184 ± 35	167 ± 29	0,09	0,19
C-HDL (mg/dl) <sup>a</sup>	53 ± 10	51 ± 9	0,59	
C-LDL (mg/dl) <sup>a</sup>	110 ± 26	100 ± 25	0,24	
Triglicerídeos (mg/dl) <sup>b</sup>	94 (67 - 137)	65 (47 - 94)	0,02	0,16

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± DP (Teste T de Student) e <sup>b</sup> mediana e intervalo interquartil (25% to 75%) (Teste de Mann-Whitney *U*).

\*\*P ajustado por análise de covariância com IMC como covariável.

**Tabela III (A e B) - Correlação entre níveis de óxido nítrico (NO) e fibrinogênio com variáveis antropométricas, hormonais e metabólicas em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)**

**A**

NO verso	PCOS + IH (n=46)		PCOS (n=26)		IH (n=20)	
	R	p	r	p	r	p
Glicemia basal	rs = -0,27	0,06	rs = -0,26	0,18	rs = -0,35	0,12
Glicemia 120'	r = -0,171	0,27	r = -0,34	0,08	r = -0,11	0,64
Insulina basal	rs = -0,18	0,21	rs = -0,42	0,03	rs = 0,01	0,94
Insulina 120'	rs = -0,03	0,81	rs = -0,16	0,44	rs = 0,04	0,86
HOMA	rs = -0,21	0,15	rs = -0,42	0,03	rs = 0,02	0,92

**B**

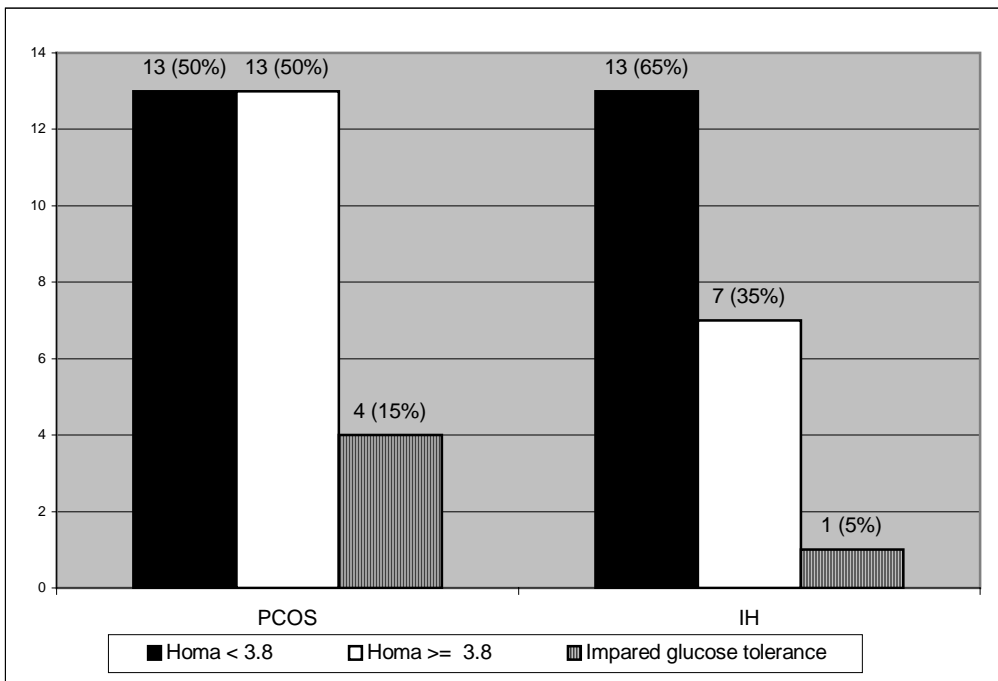
Fibrinogênio verso	PCOS + HI (n=46)			PCOS (n=26)			HI (n=20)		
	r	p	p*	r	p	p*	r	p	p*
Idade	r = 0,37	0,01		r = 0,19	0,33		r = 0,56	0,01	
IMC	rs = 0,57	0,000		rs = 0,49	0,01		rs = 0,73	0,000	
RCQ	rs = 0,40	0,01	0,31	rs = 0,52	0,01	0,11	rs = 0,27	0,26	
Cintura	rs = 0,54	0,000	0,34	rs = 0,54	0,009	0,20	rs = 0,54	0,02	0,53
SHBG	r = -0,3	0,04	0,78	r = -0,43	0,03	0,32	r = -0,14	0,56	
Glicemia basal	rs = 0,16	0,26		rs = 0,09	0,64		rs = 0,24	0,30	
Glicemia 120'	r = 0,37	0,01	0,8	r = 0,48	0,01	0,47	r = 0,26	0,30	

r, Coeficiente de correlação de Pearson; rs, Coeficiente de correlação de Spearman.

\*, p ajustado para IMC por correlação parcial.

### **Legenda da Figura**

**Figura 1** - Prevalência de resistência insulínica e intolerância à glicose, acessado pelo HOMA e níveis de glicose duas horas após TTG em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)

**Fig 1**

## **ANEXOS**



## ANEXO 1

### **Níveis de endotelina-1 em pacientes com síndrome dos ovários policísticos e hirsutismo idiopático – resultados preliminares.**

Andrea Prestes Nácul, Patrícia Schwarz, Cláudia Dickel Andrade, Francisco Lhullier, Poli Mara Spritzer

Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Fundamentação:** A síndrome dos ovários policísticos (PCOS) apresenta várias características em comum com a síndrome metabólica, tais como obesidade, resistência insulínica e dislipidemia. A resistência insulínica está associada com aumento dos níveis séricos de endotelina-1 (ET-1), causando alterações na função endotelial, que pode elevar o risco de DCV nestas pacientes.

**Objetivo:** avaliar níveis séricos de ET-1 em pacientes com PCOS em comparação com mulheres com hirsutismo idiopático (HI).

**Delineamento:** estudo transversal

**Pacientes e métodos:** Avaliamos níveis de ET-1 e suas associações com variáveis antropométricas (peso, índice de massa corporal, circunferência da cintura, relação cintura/quadril) metabólicas (glicose e insulina basais e após 75g de glicose, HOMA, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicerídeos) e hormonais (testosterona total, androstenediona, SHBG, índice de androgênios livres) em 26 pacientes com PCOS em comparação com 20 mulheres com ciclos regulares e ovulatórios com HI (grupo controle).

**Resultados:** Encontramos níveis mais elevados, porém não significativos, de ET-1 no grupo com PCOS em relação às controles, 0,84 (0,55-1,16) e 0,49 (0,3-1,16), respectivamente. Após estratificar a amostra total de pacientes por idade (< 25 anos, ≥ 25 anos), encontramos níveis de ET-1 significativamente mais elevados nas pacientes mais velhas. Nas pacientes com PCOS, houve uma associação positiva entre níveis de glicose basal com ET-1 ( $r_s=0,48$   $p<0,03$ ).

**Conclusão:** Os resultados preliminares já apontam para níveis mais elevados de ET-1 nas pacientes com PCOS, apesar da nossa amostra ainda não ter atingido o poder necessário para demonstrar diferenças entre os grupos. Com a continuação do estudo e o aumento do número de pacientes, esperamos demonstrar esta diferença. Além disso, é possível que mulheres mais velhas com PCOS, porém sem DCV estabelecida, já apresentem alterações na função vascular, demonstrada pelo aumento dos níveis de ET-1.

**Palavras-chave:** hirsutismo idiopático, síndrome dos ovários policísticos/ disfunção endotelial, endotelina-1, resistência insulínica

## INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (PCOS) apresenta várias características em comum com a síndrome metabólica, tais como obesidade, resistência insulínica e dislipidemia, sugerindo um aumento de risco de doença cardiovascular (DCV) nestas pacientes (Sharpless, 2003).

Níveis aumentados de endotelina-1 (ET-1), um marcador de doença vascular, tem sido encontrado em pacientes com síndrome metabólica (Ferri 1997) e diabetes (Wollesen 1999, Morise 1995). Endotelinas são polipeptídeos com 21 aminoácidos (endotelina 1, 2 e 3), presentes em diversos tecidos. Apenas a ET-1 é produzida pelas células endoteliais em resposta a angiotensina II, vasopressina, trombina, lipoproteína de baixa densidade (LDL),

hipóxia, isquemia e estresse de cisalhamento (Levin 1995). A liberação de ET-1 induz a produção e liberação de óxido nítrico (NO) endotelial em resposta ao estímulo dos receptores localizados nas células musculares lisas endoteliais, o que contra-balança as ações constritoras do peptídeo (Carvalho e cols. 1999, Harber & Lee 1994).

Irving e cols. (2001), encontraram uma associação positiva entre ET-1 e resistência insulínica em homens saudáveis. Diamant-Kandarakis e cols. (2001) demonstraram que mulheres com PCOS, obesas e não-obesas, apresentavam níveis mais elevados de ET-1 do que os controles de mesma idade.

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar níveis de ET-1 em pacientes com PCOS em comparação com mulheres de mesma idade com ciclos regulares e ovulatórios, níveis normais de androgênios e hirsutismo isolado (hirsutismo idiopático).

## **PACIENTES E MÉTODOS**

### *Pacientes*

A população de estudo incluiu mulheres que consultaram por hirsutismo na Unidade de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante um período consecutivo de 2 anos. Hiperplasia adrenal congênita forma não-clássica foi excluída na presença de níveis basais elevados de 17-hidroxiprogesterona ( $> 5$  ng/dl) e/ou aumento marcado após estimulação com ACTH ( $> 12$  ng/dl) (Spritzer e cols. 1990, Aziz e cols. 1994). Pacientes com as seguintes condições também foram excluídos: hiperprolactinemia (níveis séricos de prolactina maiores do que  $20 \mu\text{g/L}$  em duas ocasiões diferentes); disfunção da tireóide; gestação; parto, abortamento ou cirurgia nos últimos 3 meses; uso de heparina ou aspirina dentro de 15 dias do teste; tabagismo; história de câncer ou disfunção hepática.

Cinquenta pacientes foram inicialmente selecionados para o estudo. Destes, 3 perderam o seguimento e 1 não preencheu os critérios diagnósticos de PCOS. Quarenta e seis pacientes, cuja idade variou de 11 a 42 anos, foram selecionadas para o estudo. Nenhuma paciente fez uso de qualquer droga que pudesse interferir com os níveis hormonais por pelo menos 3 meses antes do estudo. O escore médio para hirsutismo, aferido pelo método de Ferriman e Gallwey

(F-G) (1961) foi  $19 \pm 7$  (Ferriman & Gallwey 1961). Vinte e seis pacientes tiveram o diagnóstico de PCOS e 20 de HI.

O diagnóstico de PCOS foi baseado nas características clínicas de hiperandrogenismo, irregularidade menstrual, níveis séricos elevados de LH ou da relação LH/FSH, níveis séricos elevados de testosterona total, índice de testosterona livre (ITL) e/ou androstenediona, e exclusão de neoplasia ovariana ou adrenal ou síndrome de Cushing.

O hirsutismo idiopático foi diagnosticado, como previamente descrito (Spritzer e cols. 2001, Spritzer e cols. 2000, Comin & Spritzer 2004), em pacientes hirsutas com ciclos menstruais regulares e ovulatórios (progesterona na fase lútea maior do que 3.8 ng/ml), níveis normais de androgênios, e nenhuma causa subjacente conhecida.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local, e todas as pacientes assinaram termo de consentimento informado.

#### *Protocolo de estudo*

As medidas antropométricas incluíram peso, altura, circunferência da cintura, relação cintura-quadril (RCQ) (a circunferência da cintura foi medida como o ponto mais estreito ou ao nível do umbigo, e a circunferência do quadril ao nível do trocanter maior) e índice de massa corporal (peso/altura<sup>2</sup>).

As dosagens hormonais e metabólicas foram feitas entre o 2º e o 10º dia do ciclo menstrual ou em qualquer dia se a paciente estivesse em amenorréia. Duas amostras de sangue foram retiradas de uma veia antecubital para a determinação de glicose e insulina sérica: uma após jejum de 12 horas e outra após duas horas da ingestão de 75 g de glicose. O diagnóstico de intolerância à glicose foi determinado por níveis de glicose entre 140 e 200 mg/ml no tempo 2 horas no teste de tolerância, como definido pela Organização Mundial de Saúde (1985).

Amostras de sangue foram retiradas para dosagem de endotelina-1, SHBG, testosterona total e androstenediona. Todas as amostras foram obtidas entre 8 e 10 horas da manhã.

O índice de testosterona livre foi estimado pela equação  $T \text{ (nmol/L)} / \text{SHBG (nmol/L)} \times 100$ . Homeostatic Model Assessment (HOMA) foi calculado através do produto da insulina

( $\mu\text{IU/ml}$ ) e glicose (mmol/l), dividido por 22,5. O valor do HOMA se correlaciona bem com as técnicas de clamp e sido utilizado para avaliar resistência insulínica em pacientes com PCOS de diferentes origens étnicas (Wijeyaratne e cols. 2002, Mather e cols. 2001). O ponto de corte considerado para definir resistência insulínica foi um valor maior ou igual a 3,8. (Wijeyaratne e cols. 2002)

#### *Dosagens laboratorias*

Colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e glicose foram determinados por método enzimático colorimétrico usando o kit Mega (Bayer, Leverkusen, Germany). O LDL-colesterol foi determinado indiretamente pela fórmula  $\text{LDL} = \text{colesterol total} - \text{HDL} + \text{triglicerídeos} / 5$ .

A testosterona total foi medida por método de radioimunoensaio (RIA) (ICN, Costa Mesa, CA) com um coeficiente de variação (CV) intra- e interensaio de 10% e 11,6%, respectivamente. A androstenediona foi medida por método de RIA (DSL, Webster, Texas) com sensibilidade de 0,03 ng/ml e CV intra-ensaio de 4,3% e interensaio de 6%. A SHBG foi dosada por ensaio imunométrico (DPC, Los Angeles, CA) com sensibilidade de 0,2 nmol/L e CV intra- e interensaio de 6,1% e 8%. Os níveis séricos de insulina foram medidos por imunoensaio de eletroquimioluminescência (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim) com uma sensibilidade de 0,20  $\mu\text{IU/ml}$  e um CV intra- e interensaio de 1,8% e 2,5%, respectivamente.

#### *Dosagem de Endotelina-1 Humana (ET-1)*

A endotelina-1 foi dosada através de imunoensaio enzimático quantitativo (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), com sensibilidade de menos do que 1,0 pg/mL. O valor médio é de 0,6 pg/mL com uma variação de 0,3-0,9 pg/mL. CV intraensaio foi de 4,4%.

#### *Análise estatística*

Os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  desvio-padrão ou medianas e intervalo interquartil. Comparações entre dois grupos foram analisadas pelo teste “t” de Student; comparações entre medianas foram analisadas usando-se Teste Mann-Whitney U,

para amostras independentes. Coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman foram utilizados para correlações bivariadas entre as variáveis numéricas, conforme a natureza gaussiana ou não-gaussiana da variável, respectivamente. A análise estatística foi realizada usando-se *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Chicago, IL, USA), sendo considerado como significativo um valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Encontramos níveis mais elevados, embora não significativos, de ET-1 no grupo das pacientes com PCOS em relação ao grupo controle com HI, 0,84 (0,55-1,16) e 0,49 (0,3-1,16)  $p=0,135$ , respectivamente. (Figura 1) Não houve correlação de ET-1 com IMC, RCQ, circunferência do quadril, androgênios ou lipídeos em nenhum dos grupos estudados ou quando as pacientes foram analisadas conjuntamente. Em contraste, houve uma correlação positiva e significativa entre ET-1 e glicemia de jejum apenas no grupo das pacientes com PCOS (tabela 1). O cálculo do “effect-size” mostra que 23% da variância da ET-1 pode ser explicada por níveis de glicose nas pacientes com PCOS. Isto implica um aumento de 0,3 pg/ml na ET-1 para um aumento de 10 mg/dl nos níveis da glicemia de jejum. Houve uma correlação positiva, porém não significativa, entre ET-1 e idade, no grupo das pacientes com PCOS ( $r_s=0,37$ ,  $p=0,06$ ). Entretanto, quando toda a amostra de pacientes foi estratificada de acordo com classes de idade abaixo de 25 anos ou maior ou igual aos 25 anos, a mediana da ET-1 foi significativamente maior no grupo das pacientes mais velhas (figura 2).

## DISCUSSÃO

Encontramos níveis mais elevados, porém não significativos, de ET-1 no grupo com PCOS em relação às controles. Em contraste, houve uma associação significativa entre ET-1 e glicemia de jejum apenas no grupo com PCOS. Entretanto, não encontramos associação de ET-1 com níveis de insulina, HOMA ou androgênios. Um aumento nos níveis de ET-1 parece estar associado com envelhecimento. Após estratificar a amostra

total de pacientes por idade (< 25 anos, ≥ 25 anos), encontramos níveis de ET-1 significativamente mais elevados nas pacientes mais velhas.

Irving e cols. (2000) avaliaram níveis de ET-1 e seu precursor, big-endotelina-1, em homens saudáveis entre 24-33 anos. O aumento dos níveis plasmáticos de ET-1 se associou positivamente com IMC, insulina plasmática e triglicérides. A big-endotelina-1 se associou com resistência insulínica, acessada pelo HOMA. Em contraste com nossos resultados, eles não encontraram associação entre ET-1 com glicose ou idade.

Uma vez que pacientes com resistência insulínica apresentam uma vasodilatação, dependente de óxido nítrico (NO), alterada (Steinberg 1996), a perda da “down-regulation” na síntese de ET-1 exercida pelo NO poderia explicar o aumento da ET-1 nestes pacientes.

Diamanti-Kandarakis e cols. (2001) demonstraram níveis mais elevados de ET-1 em 43 pacientes com PCOS comparadas com 17 controles de mesma idade. Após estratificar o grupo em obesas e não-obesas, as diferenças para níveis mais elevados de androgênios, insulina e ET-1 nas pacientes com PCOS em relação às controles de mesmo peso permaneceram significativas. Uma associação negativa entre ET-1 e utilização de glicose foi demonstrada no grupo total de pacientes. Isto pode ser outro indicativo do envolvimento da resistência insulínica e hiperinsulinemia com disfunção endotelial. Seis meses de tratamento com metformin em um subgrupo de pacientes com PCOS melhorou a sensibilidade à insulina com redução significativa de ET-1 sem alterações significativas no peso das pacientes. Estes achados sugerem que níveis elevados de ET-1, seja uma anormalidade distinta de mulheres com PCOS, independente da presença de obesidade. Nosso estudo corrobora esta hipótese porque não encontramos associação entre ET-1 com IMC ou RCQ.

O poder de nossa amostra de pacientes para demonstrar diferenças entre os grupos para níveis de ET-1 foi de 22%. A falta de associação entre ET-1 com insulina de jejum ou HOMA em nosso estudo poderia ser explicada por não haver diferença entre os grupos para estas variáveis. O poder da amostra para demonstrar diferenças entre os grupos em relação à insulina e HOMA foi de, respectivamente, 49,5% e 41,5%. Assim, com a continuação do estudo e aumento da amostra, é provável que as pacientes com PCOS

apresentem níveis significativamente maiores de endotelina-1 em relação às controles e que este aumento se associe com hiperinsulinemia/resistência insulínica.

A associação de PCOS com DCV prematura permanece um assunto de interesse. Talbott e cols. (2000) encontraram um aumento da espessura da camada íntima-média das artérias carótidas apenas em pacientes com PCOS acima de 45 anos. A insulina de jejum e a RCQ atenuaram esta associação, sugerindo que, ao menos em parte, a associação de PCOS com espessamento da camada íntima-média carotídea está relacionada com hiperinsulinemia e obesidade central. Uma grande parte do risco de aterosclerose prematura pode ser explicado pelos fatores de risco cardiovasculares associados com PCOS. Ainda podem existir outros efeitos do PCOS além destas variáveis responsáveis pelo aumento da prevalência de DCV nestas pacientes. Em nosso estudo, a associação de níveis mais elevados de ET-1 em pacientes com maior idade pode nos dar uma pista de que a quebra do equilíbrio do endotélio seja responsável pelo desenvolvimento de desfechos cardiovasculares adversos nas pacientes com PCOS.

Talvez a nossa amostra de pacientes seja muito jovem para apresentar anormalidades endoteliais resultantes de alterações metabólicas que caracterizam pacientes com PCOS e levam ao aumento de risco cardiovascular.

É possível que mulheres mais velhas com PCOS, embora sem doença macrovascular estabelecida, já apresentem alterações na função vascular. Assim, estratégias clínicas objetivando a redução da resistência insulínica, tais como o uso do metformin e alterações no estilo de vida, podem ser muito importantes para prevenir desfechos cardiovasculares nestas mulheres.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aziz, R., Dewailly, D., Owerbach, D. (1994) Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 810-815.
- Carvalho, M.H.C, Scivoletto, R., Fortes, Z.B., Nigro, D. (1989) The role of endothelium in vascular reactivity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **22**, 533-545.



- Comin, F.V., Spritzer, P.M. (2004) Increased growth hormone response to clonidine in nonobese normoinsulinemic patients with PCOS. *Fertil. Steril.*, **81**, 108-113.
- Diamant-Kandarakis, E., Spina, G., Kouli, C., Migdalis, I. (2001) Increase endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86(10)**, 4666-4673.
- Ferri, C., Bellini, C., Desideri, G., Baldoncini, R., De Siati, L., Santucci, A. (1997) Elevated plasma endothelin-1 levels as an additional risk factor in non-obese essential hypertensive patients with metabolic abnormalities. *Diabetologia*, **40**, 100-102.
- Ferriman, D., Gallwey, J.D. (1961) Clinical assessment of body hair growth in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **21**, 1140 –1148.
- Harber, E., Lee, M-E. (1994) Endothelin to the rescue? *Nature*, **370**, 252-253.
- Harris, M.I., Hadden, W.C., Knowler, W.C. et al: International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance.
- Irving, R.J., Noon, J.P., Watt, G.C.M., Webb, D.J., Walker, B.R. (2001) Activation of the endothelin system in insulin resistance. *Q. J. Med.*, **94**, 321-326.
- Levin, E.R. Endothelins. (1995) *N Engl. J. Med.*, **333**, 356-363.
- Mather, K.J., Hunt, A.E., Steinberg, H.O. et al. (2001) Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: implications for research applications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 5457-5464.
- Morise, T., Takeuchi, Y., Kawano, M., Koni, I., Takeda, R. (1995) Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von willebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care*, **18**, 87-89.
- Sharpless, J.L. (2003) Polycystic ovary syndrome and the metabolic syndrome. *Clinical Diabetes*, **21**, 154-161.
- Spritzer, P., Billaud, L., Thalabard, J.C., Birman, P., Mowszowicz, I., Raux-Demay, M.C. et al. (1990) Cyproterone Acetate versus Hydrocortisone treatment in Late-Onset Adrenal Hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**, 642-646.
- Spritzer, P.M., Oppermann-Lisboa, K., Mattiello, S., Lhullier, F. (2000) Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin. Endocrinol.*, **52**, 587-594.

- Spritzer, P.M., Poy, M., Wiltgen, D., Mylius, L.S., Capp, E. (2001) Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum. Reprod.*, **16**, 1340-1346.
- Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., Baron, A.D. (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the Syndrome of Insulin Resistance. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2601-2610.
- Talbott, E.O., Guzick, D.S., Sutton-Tyrrell, K., McHugh-Pemu, K.P., Zborowski, J.V., Remsberg, K.E., Kuller, L.H. (2000) Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2414-2421.
- Wijeyaratne, C.N., Balen, A.H., Barth, J.H. et al. (2002) Clinical manifestations and insulin resistance (IR) in polycystic ovary syndrome (PCOS) among South Asians and Caucasians: is there a difference? *Clin. Endocrinol.*, **57**, 343-350.
- Wollesen, F., Berglund, L., Berne, C. (1999) Plasma endothelin-1 and total insulin exposure in diabetes mellitus. *Clin. Sci.*, **97**, 149-156.
- World Health Organization: Diabetes Mellitus: Report of a study group. Geneva, WHO, 1985 (Tech Rep Ser No. 727)

**Tabela I** - Correlação entre endotelina-1 e variáveis antropométricas, hormonais e metabólicas em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e hirsutismo idiopático (HI)

<b>Endotelina-1</b>	PCOS + HI (n=46)		PCOS (n=26)		HI (n=20)	
	R	P	R	P	R	P
<b>verso:</b>						
Idade	rs = 0,25	0,09	rs = 0,37	0,06	rs = 0,18	0,45
Testosterona	rs = 0,003	0,98	rs = -0,36	0,07	rs = 0,35	0,13
Androstenediona	rs = 0,13	0,40	rs = -0,32	0,11	rs = 0,39	0,09
SHBG	rs = 0,10	0,50	rs = 0,12	0,56	rs = 0,28	0,24
ITL	rs = 0,01	0,95	rs = -0,32	0,11	rs = 0,20	0,39
Glicemia de jejum	rs = 0,24	0,11	rs = 0,48*	0,02	rs = -0,02	0,93
Glicose 2hs	rs = 0,12	0,90	rs = 0,13	0,54	rs = -0,36	0,14
Insulina de jejum	rs = 0,08	0,59	rs = 0,26	0,19	rs = -0,31	0,18
Insulina 2hs	rs = -0,10	0,51	rs = -0,02	0,93	rs = -0,27	0,28
HOMA	rs = 0,09	0,57	rs = 0,31	0,12	rs = -0,30	0,20

rs, Coeficiente de correlação de Spearman. \*,  $p < 0,05$

**Figura 1** - Níveis de Endotelina-1 em pacientes hirsutas com síndrome dos ovários policísticos (n=26) e hirsutismo idiopático (n=20).

**Figura 2** - Níveis de Endotelina-1 em pacientes hirsutas (n=46) estratificadas por idade <25 ou ≥25 anos.

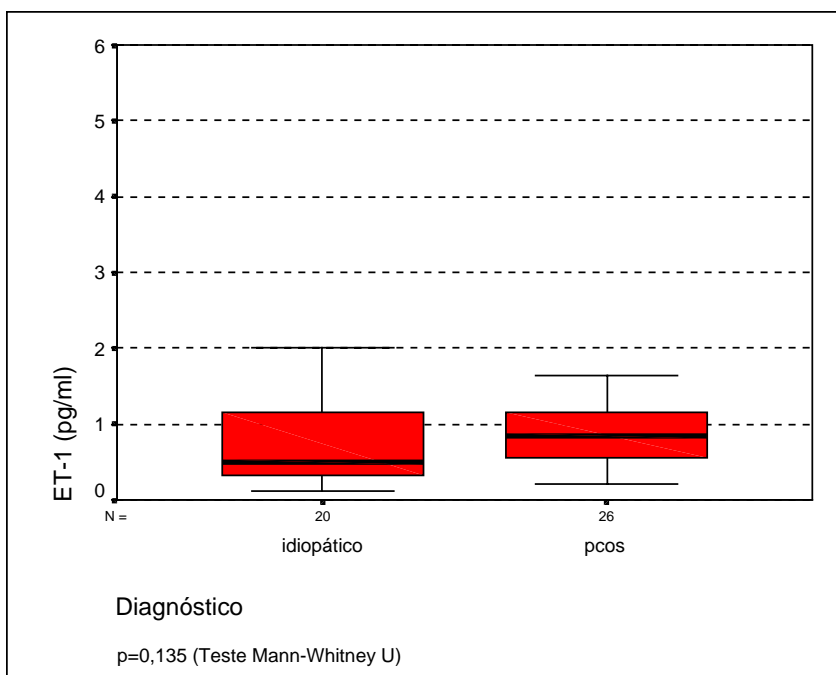


Figura 1

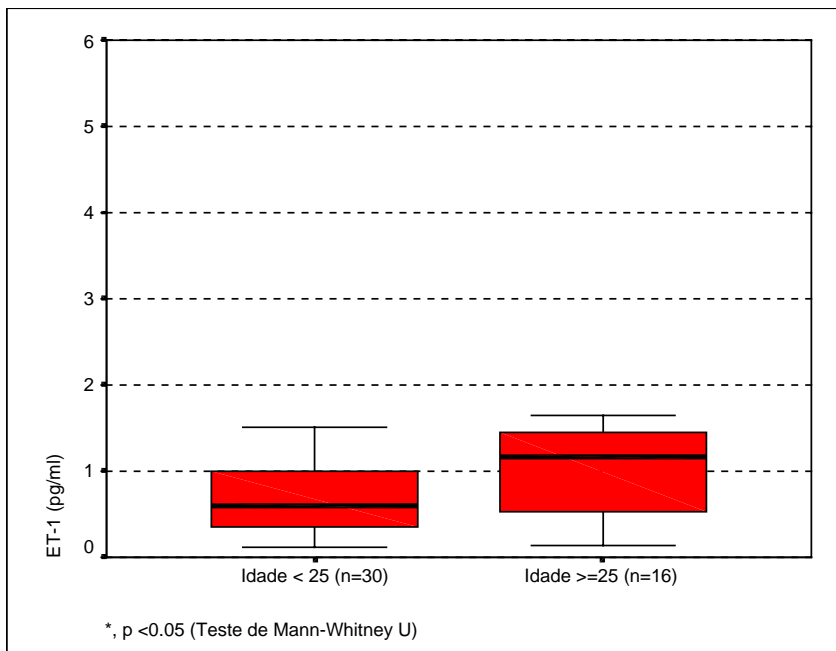


Figura 2

## ANEXO 2

**UNIDADE DE ENDOCRINOLOGIA GINECOLÓGICA**  
**SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA**  
**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**PROTOCOLO HIRSUTISMO**

## 1. IDENTIFICAÇÃO:

**Nome:** \_\_\_\_\_ **Reg:** \_\_\_\_\_ **Nº** \_\_\_\_\_  
 Idade: \_\_\_\_\_ Data inicial: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

## 2. ANAMNESE:

*Época de início do hirsutismo:* \_\_\_\_\_

Evolução: \_\_\_\_\_

Outros sinais de androgenização (acne, seborréia, alopecia) \_\_\_\_\_

DUM 1: \_\_\_\_\_ DUM 2: \_\_\_\_\_ DUM 3: \_\_\_\_\_ Ciclos: \_\_\_\_\_

Pubarca: \_\_\_\_\_ Menarca: \_\_\_\_\_ Paridade: \_\_\_\_\_ Peso ao nascer: \_\_\_\_\_

Uso de drogas: \_\_\_\_\_

Doenças correlatas: \_\_\_\_\_

Gestação, parto, abortamento ou cirurgia nos 3 meses precedentes: \_\_\_\_\_

Uso de aspirina ou heparina: \_\_\_\_\_ Tabagismo: \_\_\_\_\_

Obesidade peripuberal: \_\_\_\_\_

Método anticoncepcivo: \_\_\_\_\_

Investigação prévia: \_\_\_\_\_

Tratamento prévio: \_\_\_\_\_

HF de hirsutismo: \_\_\_\_\_ HF de infertilidade: \_\_\_\_\_

HF de trombo-embolismo: \_\_\_\_\_ HF de Diabete Mellitus: \_\_\_\_\_

HF de HAC-NC: \_\_\_\_\_ HF de dislipidemia: \_\_\_\_\_

HF de DCV: \_\_\_\_\_ Origem étnica: \_\_\_\_\_

## 3. EXAME CLÍNICO:

*Peso:* \_\_\_\_\_ *Alt:* \_\_\_\_\_ *IMC:* \_\_\_\_\_ *C:* \_\_\_\_\_ *Q:* \_\_\_\_\_

*C/Q:* \_\_\_\_\_ *PA 1:* \_\_\_\_\_ *PA 2:* \_\_\_\_\_ *Acantose:* \_\_\_\_\_

Mamas: \_\_\_\_\_ Galactorréia: \_\_\_\_\_ Estrias purpúreas: \_\_\_\_\_

Genitália externa: \_\_\_\_\_

Genitália interna: \_\_\_\_\_

Escore de Ferriman: Lábio sup: \_\_\_\_\_ Mentó: \_\_\_\_\_ Tórax: \_\_\_\_\_ Região dorsal: \_\_\_\_\_

Região lombar: \_\_\_\_\_ Abd sup: \_\_\_\_\_ Abd inf: \_\_\_\_\_ Braço: \_\_\_\_\_ Coxas: \_\_\_\_\_

TOTAL MODIF: (s/ pernas e AB): \_\_\_\_\_ Pernas: \_\_\_\_\_ Antebraço: \_\_\_\_\_ TOTAL: \_\_\_\_\_

ACNE (+ a 4+): \_\_\_\_\_ Seborréia: \_\_\_\_\_ Alopecia: \_\_\_\_\_

## 4. AVALIAÇÃO LABORATORIAL: Rotina:

T total: \_\_\_\_\_ SHBG: \_\_\_\_\_ ITL: \_\_\_\_\_

SDHEA: \_\_\_\_\_ Glicemia 0': \_\_\_\_\_ Glicemia 120': \_\_\_\_\_ K<sup>+</sup>: \_\_\_\_\_

Insulina 0': \_\_\_\_\_ Insulina 120': \_\_\_\_\_ Rel. I/G: \_\_\_\_\_

LH(-15'): \_\_\_\_\_ LH 0': \_\_\_\_\_ FSH: \_\_\_\_\_ Prl (pool): \_\_\_\_\_

TSH: \_\_\_\_\_ T4: \_\_\_\_\_ Triglicerídeos: \_\_\_\_\_ Fibrinogênio: \_\_\_\_\_

Colesterol T: \_\_\_\_\_ HDL-c: \_\_\_\_\_ LDL-c: \_\_\_\_\_

Fatores hematológicos e disfunção endotelial:

Fator VII: \_\_\_\_\_ Fator VIII: \_\_\_\_\_ Fator vWB: \_\_\_\_\_  
 Óxido nítrico: \_\_\_\_\_ Endotelina-1: \_\_\_\_\_ Proteína C: \_\_\_\_\_  
 Res. Prot. C ativ.: \_\_\_\_\_ Proteína S: \_\_\_\_\_ AT-III: \_\_\_\_\_ PAI-1: \_\_\_\_\_

TESTE DO ACTH: 17OHP 0': \_\_\_\_\_ 60': \_\_\_\_\_ CORTISOL 0': \_\_\_\_\_ 60': \_\_\_\_\_  
 A=0 0': \_\_\_\_\_ 60': \_\_\_\_\_

Se a paciente ciclar: Progesterona sérica ( 4º, 6º e 8º ou 3º, 5º e 7º dias após ↑ da temperatura basal, na 2ª fase do ciclo / 23º e 25º dias do ciclo menstrual):

1ª dosagem, dia/mês, dia do ciclo: \_\_\_\_\_ 2ª dosagem, dia/mês, dia do ciclo: \_\_\_\_\_

ULTRA-SONOGRAFIA: Data: ( \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ) ÚTERO: \_\_\_\_\_  
 OD: \_\_\_\_\_ VOL: \_\_\_\_\_ OE: \_\_\_\_\_ VOL: \_\_\_\_\_ ESP. ENDOM: \_\_\_\_\_

5. DIAGNÓSTICO FEITO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_:

( ) Idiopático ( ) Neoplasia ovariana ( ) PCOS ( ) HAC-NC ( ) Neoplasia adrenal  
 ( ) S. Cushing ( ) Uso de fármacos, especificar: \_\_\_\_\_

6. TRATAMENTO INICIADO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_:

( ) CPA – Dose e dias do ciclo: \_\_\_\_\_ ( ) ACO (especificar): \_\_\_\_\_  
 ( ) Diane ( ) Associações (especificar): \_\_\_\_\_  
 ( ) EPL – Dose e dias: \_\_\_\_\_ ( ) Progesterona 2º (especificar): \_\_\_\_\_  
 ( ) Outros: \_\_\_\_\_

7. SEGUIMENTO (AVALIAÇÃO TRIMESTRAL):

3 MESES DE TRATAMENTO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_:

Queixas: \_\_\_\_\_  
 Peso: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ C: \_\_\_\_\_ Q: \_\_\_\_\_ C/Q: \_\_\_\_\_ PA 1: \_\_\_\_\_ PA 2: \_\_\_\_\_  
 Ferriman: LS: M: T: RD: RL: ABS: B: AB: TOTAL MOD:  
 C: P: TOTAL: DUM 1: \_\_\_\_\_ DUM 2: \_\_\_\_\_ DUM 3: \_\_\_\_\_  
 Conduta: \_\_\_\_\_

6 MESES DE TRATAMENTO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_:

Queixas: \_\_\_\_\_  
 Peso: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ C: \_\_\_\_\_ Q: \_\_\_\_\_ C/Q: \_\_\_\_\_ PA 1: \_\_\_\_\_ PA 2: \_\_\_\_\_  
 Ferriman: LS: M: T: RD: RL: ABS: B: AB: TOTAL MOD:  
 C: P: TOTAL: DUM 1: \_\_\_\_\_ DUM 2: \_\_\_\_\_ DUM 3: \_\_\_\_\_  
 T total: \_\_\_\_\_ A=0: \_\_\_\_\_ SDHEA: \_\_\_\_\_ SHBG: \_\_\_\_\_ ITL: \_\_\_\_\_ K: \_\_\_\_\_  
 Insulina: \_\_\_\_\_ Glicose: \_\_\_\_\_ Col-T: \_\_\_\_\_ C-HDL: \_\_\_\_\_ C-LDL: \_\_\_\_\_  
 Tgl: \_\_\_\_\_ Fibrinogênio: \_\_\_\_\_ LH (-15'): \_\_\_\_\_ LH ( 0'): \_\_\_\_\_ Gli120 (se basal alterada): \_\_\_\_\_

Fatores hematológicos e de disfunção endotelial:

Fator VII: \_\_\_\_\_ Fator VIII: \_\_\_\_\_ Fator vWB: \_\_\_\_\_  
 Óxido nítrico: \_\_\_\_\_ Endotelina-1: \_\_\_\_\_ Proteína C: \_\_\_\_\_  
 Res. Prot. C ativ.: \_\_\_\_\_ Proteína S: \_\_\_\_\_ AT-III: \_\_\_\_\_ PAI-1: \_\_\_\_\_

ULTRA-SONOGRAFIA: Data: ( \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ) ÚTERO: \_\_\_\_\_  
 OD: \_\_\_\_\_ VOL: \_\_\_\_\_ OE: \_\_\_\_\_ VOL: \_\_\_\_\_ ESP. ENDOM: \_\_\_\_\_  
 Conduta: \_\_\_\_\_

9 MESES DE TRATAMENTO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_:

Queixas: \_\_\_\_\_  
 Peso: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ C: \_\_\_\_\_ Q: \_\_\_\_\_ C/Q: \_\_\_\_\_ PA 1: \_\_\_\_\_ PA 2: \_\_\_\_\_  
 Ferriman: LS: M: T: RD: RL: ABS: B: AB: TOTAL MOD:  
 C: P: TOTAL: DUM 1: \_\_\_\_\_ DUM 2: \_\_\_\_\_ DUM 3: \_\_\_\_\_  
 Conduta: \_\_\_\_\_

UM ANO DE TRATAMENTO EM \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ :

Queixas: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ C: \_\_\_\_\_ Q: \_\_\_\_\_ C/Q: \_\_\_\_\_ PA 1: \_\_\_\_\_ PA 2: \_\_\_\_\_

Ferriman: LS: \_\_\_\_\_ M: \_\_\_\_\_ T: \_\_\_\_\_ RD: \_\_\_\_\_ RL: \_\_\_\_\_ ABS: \_\_\_\_\_ B: \_\_\_\_\_ AB: \_\_\_\_\_ TOTAL MOD: \_\_\_\_\_

C: \_\_\_\_\_ P: \_\_\_\_\_ TOTAL: \_\_\_\_\_ DUM 1: \_\_\_\_\_ DUM 2: \_\_\_\_\_ DUM 3: \_\_\_\_\_

T total: \_\_\_\_\_ A=0: \_\_\_\_\_ SDHEA: \_\_\_\_\_ SHBG: \_\_\_\_\_ ITL: \_\_\_\_\_ K: \_\_\_\_\_

Insulina: \_\_\_\_\_ Glicose: \_\_\_\_\_ Col-T: \_\_\_\_\_ C-HDL: \_\_\_\_\_ C-LDL: \_\_\_\_\_

Tgl: \_\_\_\_\_ Fibrinogênio: \_\_\_\_\_ LH (-15'): \_\_\_\_\_ LH ( 0'): \_\_\_\_\_ Gli120 (se basal alterada): \_\_\_\_\_

Fatores hematológicos e de disfunção endotelial:

Fator VII: \_\_\_\_\_ Fator VIII: \_\_\_\_\_ Fator vWB: \_\_\_\_\_

Óxido nítrico: \_\_\_\_\_ Endotelina-1: \_\_\_\_\_ Proteína C: \_\_\_\_\_

Res. Prot. C ativ.: \_\_\_\_\_ Proteína S: \_\_\_\_\_ AT-III: \_\_\_\_\_ PAI-1: \_\_\_\_\_

ULTRA-SONOGRAFIA: Data: (\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_) ÚTERO: \_\_\_\_\_

OD: \_\_\_\_\_ VOL: \_\_\_\_\_ OE: \_\_\_\_\_ VOL: \_\_\_\_\_ ESP. ENDOM: \_\_\_\_\_

Conduta: \_\_\_\_\_

SEGUIR MESMA ROTINA PARA OS 15, 18, 21 E 24 MESES DE TRATAMENTO



**ANEXO 3**

**Unidade de Endocrinologia Ginecológica  
Serviço de Endocrinologia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO DE  
MARCADORES DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, DE DISFIBRINÓLISE E DE  
PREDISPOSIÇÃO A TROMBOFILIA EM PACIENTES HIPERANDROGÊNICAS**

Este ambulatório está pesquisando fatores que possam aumentar o risco de doenças do coração e vasos sanguíneos em pacientes com excesso nos níveis de androgênios ou de sua ação no corpo. Esta informação poderá auxiliar no futuro a detectar aquelas pacientes com maior risco e que precisam receber medidas preventivas. Nesta pesquisa todas as pacientes incluídas serão avaliadas clinicamente e coletarão sangue para exames laboratoriais. Além dos exames de rotina, serão incluídos exames para avaliação de fatores hematológicos e avaliação de mutações gênicas. Não há risco adicional ao da coleta habitual de sangue. Após a coleta dos dados para o estudo, as pacientes receberão tratamento conforme o protocolo de nosso ambulatório.

Nossa equipe estará lhe acompanhando regularmente de maneira facilitada através de consultas ambulatoriais. Além disso, seus dados serão mantidos em sigilo e privacidade. Caso você queira, por qualquer razão, você poderá desistir de participar do estudo sem deixar de ser atendida no Ambulatório. Caso tenha qualquer dúvida ou pergunta fique à vontade para fazê-las antes de decidir se aceita participar do nosso estudo.

Declaro que estou ciente do exposto acima e que concordo em participar do estudo.

---

**Nome e Assinatura**

**Data:** \_\_\_\_\_

**Pesquisadores responsáveis: Dra. Andrea Prestes Nácul  
Dra. Poli Mara Spritzer**

Telefone para contato: 3316-8246