CASSIANA ROSA GALVÃO GIRIBELA

**Avaliação da função endotelial venosa em mulheres
saudáveis em uso de anticoncepcional hormonal
combinado oral**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberto de Melo

São Paulo
2007

DEDICATÓRIA

À meus pais:

Laerte Giribola e Maria Helena Giribola meus orientadores; não da tese, mas da vida.

Sem eles nem uma linha desta dissertação seria possível.

À minha irmã Aricia Giribela, companheira em todos os momentos da vida pessoal e profissional.

Sem seu apoio e paciência esta dissertação não seria possível.

Ao meu irmão Flavio, para o qual dedico esta dissertação para que seja para ele modelo de perseverança, esforço, e dedicação à ciência e à medicina.

À minha avó Rosa Dinelli Galvão, que esteve presente em todos os momentos áridos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr Nilson Roberto de Melo: professor e orientador, não apenas pela orientação na realização da tese, mas por guiar meu caminho dentro da ginecologia, desde o início da residência médica, como modelo de integridade, honestidade, conhecimento, esforço, e trabalho.

À Professora Dra Fernanda Consolim Colombo: pesquisadora brilhante, professora, orientadora, e amiga nas horas difíceis.

Ao fisioterapeuta Marcelo Custódio Rubira cuja participação foi imprescindível e constante em todos os momentos da pesquisa.

Ao fisioterapeuta Rodrigo Dea Mea Plentz e a enfermeira Andréa S Muller pela participação na execução do protocolo de pesquisa.

Ao Professor Eduardo Moacir Krieger pela oportunidade de realizar a pesquisa em conjunto com a Unidade de Hipertensão do Incor.

As mulheres voluntárias do protocolo, que se dispuseram a perder horas preciosas do seu dia, para contribuir para a pesquisa, visando não a si próprias, mas à ciência e ao benefício de outras mulheres.

A Sra Wilma Baraldi pela revisão cuidadosa da língua portuguesa do texto da dissertação.

Ao Departamento de Medicina Preventiva --Laboratório de Processamento de Dados Biomédicos --LIM 39 – HC/FMUSP – pela consultoria em Epidemiologia e Estatística.

À Professora Dra Ângela Maggio da Fonseca pela dedicação e carinho.

Aos Professores Doutores Antonio Jorge Salomão, Domingos A. Petti e Nilo Bozzini pelo estímulo, confiança e reconhecimento constantes.

Ao Professor Dr Edmund C. Baracat pelo apoio e estímulo.

A Sra Claudia A Vieira, secretária da pós-graduação da ginecologia, pela seriedade, competência e dedicação.

A Sra Silvia Regina Garrubbo, secretária da Unidade de Hipertensão do Incor, pelo carinho, apoio e estímulo.

Ao colega Dr Marcos Desidério Ricci pelo constante apoio e estímulo.

A todos os docentes e assistentes do departamento de Ginecologia e Obstetrícia que com dedicação, experiência e sabedoria, participaram da minha formação e continuam contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr Heno Lopes pela oportunidade do estágio na unidade de hipertensão, durante minha vida acadêmica, que foi fundamental para a escolha no futuro, da minha linha de pesquisa, e pelo vínculo afetivo e científico que tenho ao Incor.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A Deus por iluminar e guiar meu caminho.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptadas de *International Commiteeee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista das abreviaturas

Lista das tabelas

Lista das figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Classificação e evolução dos anticoncepcionais hormonais combinados orais	5
2.2. Anticoncepcionais hormonais combinados orais e tromboembolismo venoso	6
2.3. Endotélio: o regulador da hemostasia	9
2.4. Diferenças entre o endotélio venoso e o arterial	11
2.5. Técnicas para avaliação da função endotelial	13
3. OBJETIVO	17
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
4.1. Comitê de ética em pesquisa	18
4.2. Seleção da população	18
4.3. População estudada	20
4.4. Protocolo de estudo da função endotelial	21
4.5. Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Características clínicas dos grupos estudados	29
5.2. Avaliação da resposta vasodilatadora	30
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	45
8. ANEXOS	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
Apêndice	

Lista de abreviaturas e siglas

Ach	acetilcolina
AHCO	anticoncepcionais hormonais combinados orais
AVC	acidente vascular cerebral
AVCI	acidente vascular cerebrolisquêmico
bpm	batimentos por minuto
DCV	doença cardiovascular
DHVT	técnica de complacência venosa de uma veia do dorso da mão
DIU	dispositivo intra-uterino
DP	desvio padrão
E _{max}	venodilatação máxima
eNOS	enzima óxido nítrico sintetase
EP	erro padrão
FC	frequência cardíaca
FEV	função endotelial venosa
HDL-c	lipoproteína de alta densidade
IM	infarto do miocárdio
IMC	índice de massa corpórea
LDL-c	lipoproteína de baixa densidade
L-NMMA	N-monometil L-arginina
NO	óxido nítrico
NPS	nitroprussiato de sódio
PAD	pressão arterial diastólica

PAS	pressão arterial sistólica
PGI-2	prostaciclina
PP	pressão de pulso
TEV	tromboembolismo venoso
TVP	trombose venosa profunda
WHO	World Health Organization
kg	quilogramas
m	metros
m ²	metro quadrado
mg/dl	miligramas por decilitro
ml/min	mililitros por minuto
mmHg	milímetros de mercúrio
ng/ml	nanogramas por mililitro
pg/ml	picogramas por mililitro
µg	microgramas

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores médios de vasodilatação máxima (Emax) em resposta à acetilcolina e resultado do teste estatístico (Wilcoxon).	
.....	32
Tabela 2. Valores médios de vasodilatação máxima (Emax) em resposta ao nitroprussiato de sódio e resultado do teste estatístico (Wilcoxon).	
.....	35

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática do transdutor capaz de detectar pequenos deslocamentos lineares conforme a mudança do calibre da veia.	23
Figura 2. Transdutor (TDLV, Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ) e registro da vasodilatação em papel milimetrado.	24
Figura 3. Sistema de avaliação da técnica da complacência de uma veia do dorso da mão.	24
Gráfico 1. Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-caso em resposta à acetilcolina.	30
Gráfico 2. Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-controle em resposta à acetilcolina.	31
Gráfico 3. Dilatação média com uso da acetilcolina e respectivos erros padrão.	32

Gráfico 4. Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-caso em resposta ao nitroprussiato de sódio.	33
Gráfico 5. Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-controle em resposta ao nitroprussiato de sódio.	34
Gráfico 6. Dilatação média com uso do nitroprussiato de sódio e respectivos erros padrão.	35

Lista de anexos

Anexo A. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	46
Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	47
Anexo C. Descrição de características clínicas e valores dos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos estudados no momento basal, com respectivas médias e desvios padrão.	51
Anexo D. Comparação entre condição basal e após 4 meses, das características clínicas e valores dos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos estudados, com respectivas médias e desvios padrão.	52
Anexo E. Parâmetros hemodinâmicos dos grupos-controle e caso na condição basal e após 4 meses, com respectivas médias de desvio padrão.	53
Anexo F. Valores de vasodilatação máxima (Emax) do grupo-caso em resposta à acetilcolina.	53
Anexo G. Valores de vasodilatação máxima (Emax) do grupo-controle em resposta à acetilcolina.	54
Anexo H. Valores de vasodilatação máxima (Emax) do grupo-controle em resposta ao nitroprussiato de sódio.	54
Anexo I. Valores de vasodilatação máxima (Emax) do grupo-caso em resposta ao nitroprussiato de sódio.	55
Anexo J. Valores de estradiol (pg/ml) na fase folicular média e no período de uso do ACHO (7º dia do ciclo menstrual), no grupo-caso.	56

Anexo L. Valores de estradiol (pg/ml) na fase folicular média (7 ^o dia do ciclo menstrual), no grupo-controle.	56
---	----

Apêndice

Iniciais dos nomes, RGHC, idade, medidas antropométricas, valores dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos dos grupos estudados, no momento basal e no 4º mês.

Resumo

Giribela, CRG. Avaliação da Função Endotelial Venosa em Mulheres Saudáveis em Uso de Anticoncepcional Combinado Hormonal Oral. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Aumento no risco de tromboembolismo venoso têm sido descrito em usuárias de anticoncepcionais hormonais combinados orais de terceira geração. Como a disfunção endotelial é reconhecida como o primeiro passo para o desenvolvimento da doença cardiovascular e de trombose, nosso objetivo foi analisar a função endotelial venosa em mulheres saudáveis em uso do anticoncepcional hormonal combinado oral contendo 15 µg etinilestradiol associados a 60 µg gestodeno. Avaliou-se a função endotelial venosa em 21 mulheres saudáveis pela técnica da complacência venosa da veia do dorso da mão, em estudo prospectivo caso-controle. Em 12 delas estudou-se a função endotelial venosa no momento basal e ao final do 4º mês do uso do anticoncepcional (grupo-caso). Em outras nove, usuárias de dispositivo intra-uterino T de cobre (grupo-controle), a função endotelial venosa foi avaliada no mesmo intervalo. Construíram-se curvas doses-resposta para acetilcolina e nitroprussiato de sódio após a pré-constricção da veia com fenilefrina. No grupo de usuárias de anticoncepcional hormonal houve diminuição da venodilatação máxima em resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio, porém, essa mudança não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). No grupo-controle não se detectaram mudanças significantes na venodilatação máxima entre o momento basal e o 4º mês. Assim, nosso estudo não mostrou mudanças significantes na função endotelial venosa em mulheres saudáveis em uso de anticoncepcional hormonal combinado oral em relação às não usuárias, avaliadas pela técnica da complacência venosa de uma veia do dorso da mão.

Descritores: endotélio; anticoncepcionais combinados orais.

Summary

Giribela, CRG. *Effect of a low dose oral contraceptive on venous endothelial function in healthy women*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007.

An increase in the incidence of venous thromboembolic events has been reported among users of third generation oral contraceptives. As endothelial dysfunction is recognized as an initial step in the development of cardiovascular disease and venous thromboembolism, our goal was to evaluate the effect of an oral contraceptive (15 µg ethinyl estradiol/ 60 µg gestodene) on the venous endothelial function of healthy women. Twenty one women were evaluated by the dorsal hand vein technique. In twelve women venous endothelial function was studied at baseline and after 4 months of oral contraceptives use. Nine users of intrauterine device (control group) had their venous endothelial function evaluated twice, in a similar time interval. After precontraction of the vein with phenylephrine, dose-response curves for acetylcholine and sodium nitroprusside were constructed. In the oral contraceptive group, the maximum venodilation response to acetylcholine and sodium nitroprusside decreased after a four months but this change was not statistically significant ($p > 0,05$). In the control group no significant changes were detected in maximum venodilation responses in a 4-month study interval. Therefore in our study, the use of oral contraceptives was not associated with significant changes in venous endothelial function accessed by the dorsal hand vein technique.

Key Words: endothelium; contraceptives oral hormonal.

1. Introdução

Estima-se que mais de 100 milhões de mulheres no mundo utilizem anticoncepcionais hormonais combinados orais (AHCO), que apresentam índice de gestação menor que 1%, quando usados de forma correta. Deve-se lembrar que os AHCO não apenas proporcionam anticoncepção eficaz, como oferecem numerosos benefícios não contraceptivos, tais como: melhora da dismenorréia, redução da perda sangüínea menstrual, regularização do ciclo menstrual, melhora da acne e redução do risco de câncer de ovário e de endométrio (Burkman et al., 2001).

Relataram-se efeitos adversos associados ao uso dos AHCO, notadamente maior risco de tromboembolismo venoso (TEV), acidente vascular cerebral (AVC) e infarto do miocárdio (IM), logo após sua introdução no início dos anos 60 (Barritt e Jordan, 1961; Gaylis e Kraner, 1962).

Desenvolveram-se novas formulações hormonais com a finalidade de reduzir esses riscos, inicialmente diminuindo-se a dose de estrogênio. A seguir, surgiram os AHCO de segunda geração contendo os progestogênios levonorgestrel e linestrenol. Subseqüentemente, doses menores de estrogênio foram combinadas com novos progestogênios, tais como desogestrel, norgestimato e gestodeno, dando origem aos AHCO de terceira geração. O

aparecimento dos novos progestogênios teve a finalidade de diminuir os efeitos androgênicos das pílulas de segunda geração, visando a melhores perfis lipídico e de carboidratos, a fim de reduzir o risco de doença cardiovascular (DCV) (Tanis e Rosendaal, 2003)

Estudos observacionais realizados na metade da década de 90 indicaram aumento na incidência de tromboembolismo venoso entre as usuárias de AHCO contendo os progestogênios de terceira geração (Jick et al., 1995; WHO, 1995a;b). A seguir, publicaram-se vários trabalhos confirmando ou refutando tais resultados, além de novos estudos comparando os efeitos hemostáticos laboratoriais dos AHCO de segunda e terceira gerações (Conard, 1999; Middeldorp et al., 2000; Tans et al., 2000), que podem ter pequena diferença no risco para TEV; porém os mecanismos responsáveis por esse aparente estado protrombótico não estão ainda esclarecidos (Middeldorp et al., 2000).

A função endotelial exerce papel importante na patogênese da aterosclerose e da trombose (Gross e Aird, 2000). O endotélio é uma camada de células que reveste todos os vasos do organismo, interpondo-se entre o sangue e a camada muscular lisa dos vasos, embora por muito tempo tenha sido considerado estrutura inerte. Recentemente, deu-se grande atenção às funções que ele exerce, pois desempenha significativo papel na regulação do tônus vascular e da hemostasia (Broeders et al., 1998; Lin et al., 2003), por intermédio da liberação de substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico

(NO), e de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina. O endotélio é o principal responsável pela regulação do tônus vascular e pela migração e proliferação de diferentes tipos celulares para o espaço subendotelial, além de as células endoteliais serem produtoras de substâncias que afetam diretamente o crescimento celular, a função plaquetária e a coagulação sanguínea (Radomski e Moncada, 1993; Pawlak et al., 1998; Repo e Harlan, 1999).

Em contraste com os efeitos dos estrogênios endógenos, que preservam a função endotelial e são suprimidos durante o uso da contracepção oral, há evidências de que os AHCO, que utilizam estrogênio sintético, podem alterar a função endotelial com mudanças na biodisponibilidade do óxido nítrico, pois há aumento no risco de eventos cardiovasculares em mulheres em uso de AHCO (Peek et al., 1995; Subakir et al., 1995; Spitzer et al., 1996; Jick et al., 2000).

Há várias formas de avaliação da função endotelial periférica, porém, os métodos usados para análise não invasiva dessa função são padronizados de forma insuficiente (Kuvin et al., 2001). A análise da função endotelial por pletismografia arterial tem sido o método de escolha, empregando-se a artéria braquial para as infusões de drogas vasoativas, mas essa técnica requer punção intra-arterial, o que limita o uso do método. Além disso, essa técnica avalia o endotélio arterial, cuja disfunção está relacionada à aterosclerose e à trombose arterial e não ao desenvolvimento de tromboembolismo venoso em mulheres jovens (Celermajer, 1997).

Verificou-se que as veias do dorso da mão liberam NO ao serem pré-contraindidas com norepinefrina ou fenilefrina e a seguir estimuladas com um

agonista, como a acetilcolina ou a bradicinina (Vallance et al., 1989). Estudos recentes demonstraram a possibilidade de se avaliar a função endotelial no território venoso pela técnica de complacência venosa, considerada um método estabelecido para análise de efeitos de drogas no sistema venoso (Grossmann et al., 1996, 1998). Tem sido utilizada também para estudo das alterações nas respostas de vasodilatação no território venoso em pacientes com fatores de risco que afetam o endotélio arterial (Moreno et al., 1998; Chalon et al., 1999).

Como a alteração da função endotelial venosa poderia ser um dos mecanismos pelos quais os AHCO aumentam o risco de TEV, isso nos motivou a realizar um estudo com a técnica da complacência venosa para a avaliação do endotélio venoso em usuárias saudáveis de AHCO.

2. Revisão da Literatura

2.1. Classificação e evolução dos anticoncepcionais combinados hormonais orais

Nas últimas quatro décadas, as doses e os componentes hormonais das pílulas mudaram. O primeiro anticoncepcional foi comercializado em 1960, continha 150 µg de mestranol associados a 9.850 µg do noretinodrel, porém, devido aos efeitos adversos, as doses estrogênicas foram reduzidas com o passar dos anos, além do aparecimento de novos progestogênios (Fotherby e Caldwell, 1994).

Por ausência de um sistema formal de classificação, os progestogênios foram agrupados em “gerações”, tendo como base sua época de aparecimento. Assim, os AHCO introduzidos na década de 60 continham os chamados progestogênios de primeira geração, tais como noretisterona, noretinodrel e linestrenol, combinados com altas doses estrogênicas. Na década seguinte, conjuntamente com a redução das doses estrogênicas para 50 ug de etinilestradiol e, posteriormente, 30 ug, foram introduzidos os progestogênios de segunda geração, como o levonorgestrel e o d-norgestrel (Brody et al., 1989; Stanczyk e Roy, 1990) e nos anos 80, foram desenvolvidos os progestogênios de terceira geração, como o desogestrel e o gestodeno, para minimizar os

efeitos colaterais androgênicos dos progestogênios de segunda geração. O norgestimato introduzido nos anos 80 é parcialmente metabolizado em levonorgestrel, não podendo ser classificado como de terceira geração (Stanczyk, 1997).

2.2. Anticoncepcionais hormonais combinados orais e tromboembolismo venoso

A observação clínica correlacionando o uso de AHCO a TEV (Barritt e Jordan, 1961; Sartwell et al., 1969), acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI), e infarto do miocárdio (IM) (Boyce et al., 1963) foi feita pouco tempo após o início de sua comercialização na década de 60, incluindo casos fatais de doença tromboembólica.

O primeiro estudo caso-controle sobre TEV em usuárias de AHCO mostrou aumento de três vezes no risco relativo quando comparado ao de não usuárias (Records Unit and Research Advisory Service, 1967). Este resultado foi confirmado por outros estudos (Vessey e Doll, 1968, 1969; Sartwell et al., 1969; Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Programme, 1973) e, no início dos anos 70, os estrogênios foram responsabilizados pelo aumento desse risco (Inman et al., 1970), porém certas discrepâncias nos resultados sugeriam que a dose de estrogênio poderia não ser o único fator relacionado ao aumento de risco tromboembólico em usuárias de AHCO (Stolley et al., 1975).

Estudos realizados entre 1967 e 1993 não mostraram diminuição substancial no risco para trombose venosa, apesar da grande redução na dose estrogênica e introdução de novos progestogênios ocorrida nesse período (Koster et al., 1993; Rosendaal et al., 2001). Estes novos progestogênios, chamados de terceira geração, foram desenvolvidos com o objetivo de minimizar os efeitos adversos dos de segunda geração nos parâmetros metabólicos e hemodinâmicos, principalmente no perfil lipídico (Thorogood, 1997).

Entre 1995 e 1998, estudos observacionais relataram aumento de quatro vezes no risco de TEV em usuárias de AHCO contendo os progestogênios desogestrel e gestodeno, de terceira geração, em relação às usuárias de anticoncepcionais de segunda geração (Jick et al., 1995; WHO, 1995a,b; Spitzer et al., 1996). Pesquisas subseqüentes referiram também maior risco de embolia pulmonar fatal durante o uso de AHCO de terceira geração (Poulter, 2000).

Apesar das críticas a esses estudos, demonstrou-se, posteriormente, que o risco absoluto de trombose venosa entre usuárias de AHCO contendo progestogênios de terceira geração era de 2,9 a 6 para 10.000 mulheres/ano, enquanto para os de segunda geração era de 1,6 a 3,1 por 10.000 mulheres/ano; para não usuárias era de 1 para 10.000 mulheres/ano. No entanto, deve-se atentar para o fato de que o risco de TEV na gestação é de 8 a 10 para 10.000 mulheres/ano, portanto, superior ao decorrente do uso de qualquer formulação de AHCO (Bloemenkamp et al., 1995; Farmer et al., 1999;

Todd et al., 1999; Vandenbroucke et al., 2001; Rosendaal et al., 2003). Deve-se ressaltar que a associação entre o uso de AHCO e fatores de risco genéticos, como o fator V de Leiden, aumenta o risco de evento trombótico em aproximadamente 10 vezes em relação à população geral (Vandenbroucke et al., 1994; Rosendaal et al., 1995; Pabinger e Schneider, 1996).

O mecanismo para o aumento de eventos tromboembólicos venosos em usuárias de AHCO contendo progestogênios de terceira geração ainda é incerto. Realizaram-se estudos avaliando os níveis séricos de proteínas da coagulação com a finalidade de elucidar se alguma alteração nesses parâmetros seria responsável pelo incremento na incidência de TEV relatada nos estudos observacionais da década de 90 (Tans e Rosendaal, 2003).

Notaram-se efeitos dos AHCO no sistema hemostático: elevações dos níveis de fatores procoagulantes como fibrinogênio, protrombina e fatores VII, IX, X e XII, além de redução dos fatores anticoagulantes, como proteína S e antitrombina III (Ernst, 1992; Quehenberger et al., 1996; Conard, 1999; Middeldorp et al., 2000). Outra alteração observada foi a resistência à proteína C ativada adquirida sem o fator V de Leiden, mais pronunciada em mulheres que utilizavam AHCO de terceira do que nas usuárias de segunda geração (Osterud et al., 1994 ; Olivieri et al., 1995; Rosing et al., 1999; Tans et al., 2000).

Como resultado dessas alterações no sistema hemostático haveria discreta tendência procoagulante, porém, apesar das variações encontradas nos parâmetros da hemostasia, os níveis desses fatores ainda se encontravam

dentro dos limites da normalidade (Middeldorp et al., 2000). Além disso, nem todos os parâmetros estão relacionados diretamente à trombose venosa, como o fator VII e o fibrinogênio, mais correlacionados ao aumento de incidência de trombose arterial (Rosendaal et al., 2003). Deve-se mencionar que a simples alteração nos níveis de fatores procoagulantes não causa, necessariamente, estado protrombótico, pois este é dependente de influências genéticas, ambientais e locais no vaso, no qual, os aspectos mais importantes referem-se ao endotélio e ao fenótipo que ele expressa em cada território vascular (Rosenberg e Aird, 1999; Gross e Aird, 2000).

2.3. Endotélio: o regulador da hemostasia

De acordo com a tríade de Virchow, ocorre trombose por perda da integridade da parede vascular, estase do fluxo sangüíneo ou alteração das proteínas da coagulação. Atualmente, vê-se esse conceito sob nova óptica, pois, sabe-se que a integridade da parede vascular é constituída de componentes funcionais e estruturais (Gross e Aird, 2000).

A lesão da parede vascular é um poderoso iniciador do mecanismo de coagulação; contudo, a perda funcional da sua integridade por alterações na função do endotélio representa a forma mais importante de desencadeamento do estado protrombótico (Brotman et al., 2004). Da mesma maneira, a estase do fluxo sangüíneo inicia-se não apenas pelo aumento na pressão hidrostática, mas principalmente pelo desequilíbrio de fatores vasorregulatórios produzidos

no endotélio, que agem na musculatura lisa vascular, causando vasodilatação, que, por sua vez, acarreta diminuição do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, maior estase (Lowe, 2003). Deve-se lembrar que os níveis circulantes de substâncias procoagulantes e anticoagulantes exercem diferentes efeitos hemostáticos a depender do território vascular e do fenótipo pró ou anticoagulante do endotélio naquele local (Chung e Lip, 2003).

O endotélio tem grande número de propriedades que afetam direta ou indiretamente o equilíbrio hemostático, incluindo a expressão de moléculas de adesão e liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. Sob condições normais, o endotélio intacto apresenta, na superfície, níveis baixos de moléculas de adesão; entretanto, quando ativado, há aumento na expressão dessas moléculas, promovendo a interação com leucócitos, plaquetas e hemácias, o que pode, por sua vez, causar dano endotelial (Rodgers, 1988; Bombeli et al., 1997; Repo e Harlan, 1999).

Além da produção e expressão das moléculas pró e anticoagulantes, o endotélio sintetiza uma variedade de substâncias vasoativas, como NO, endotelina-1 e prostaciclina (PGI₂), que influenciam o processo trombótico e a resposta vasomotora (Palmer et al., 1987; Cambria et al., 1994). O equilíbrio entre moléculas vasoconstritoras e vasodilatadoras tem efeito muito importante na hemostasia local, pois, o diâmetro do vaso é determinante crítico do fluxo e da estase sanguínea (Lowe, 2003).

A produção desses fatores vasoativos endoteliais se altera na trombose venosa. Após a lesão da parede do vaso, as plaquetas são ativadas, formando-

se um trombo plaquetário. Para limitar a extensão do trombo, o endotélio libera NO e PGI-2 para diminuir a ativação plaquetária (Pawlak et al., 1998; Broeders et al., 2001).

O NO é sintetizado por células endoteliais a partir dos átomos de nitrogênio guanidino terminais da L-arginina (Kelm e Schrader, 1990). O aumento da síntese e a liberação de NO também é dependente da quantidade do seu precursor L-arginina (Kelm e Schrader, 1990; Panza et al., 1993).

O NO tem várias funções: as duas mais importantes para o sistema cardiovascular são a capacidade vasodilatadora e a inibição da agregação e da adesão plaquetária (Radomski e Moncada, 1993; Anggard, 1994; Vanhoutte e Scott-Burden, 1994; Fukuto e Chaudhuri, 1995). Diversos estudos mostraram que o bloqueio na produção de NO promove trombose experimental, enquanto o seu aumento, fornecendo precursores como L-arginina, oferece proteção contra trombose em vênulas (Yao et al., 1992; Willerson et al., 1996; Broeders et al., 1998). Observou-se, em estudos experimentais, que o NO é mais importante para inibir o tromboembolismo em vênulas do que em arteríolas, pois, nestas, além do NO, a PGI-2 tem relevante função na inibição da trombose (Broeders et al., 1998; Broeders et al., 2001; Lin et al., 2003).

2.4. Diferenças entre o endotélio venoso e o arterial

O endotélio venoso libera NO quando estimulado por agonistas como acetilcolina e bradicinina, porém, isso não ocorre continuamente, como nas

artérias (Vallance, 2000). Nas veias, o relaxamento provocado pela acetilcolina é ao redor de 30%, bem menor que o das artérias (Thom et al., 1987; Luscher et al., 1988). Seidel e La Rochelle (1987), em estudo com artérias femorais e veias safenas de cães, sugeriram que a diferença na resposta aos vasodilatadores endotélio-dependentes de artérias e veias era consequência da menor liberação de NO pelo endotélio venoso do que da menor capacidade de resposta da musculatura lisa venosa ao NO. Verificou-se que essa diferença era causada pelo gene da enzima NO sintetase (eNOS), cuja expressão pode diferir, dependendo do órgão e do vaso arterial ou venoso; a quantidade de eNOS é maior no endotélio das artérias do que no das veias (Bachmann et al., 1995; Andries et al., 1998).

As diferenças entre o endotélio de artérias e veias têm grande importância clínica, pois, veias como a safena são utilizadas para a revascularização em pacientes com obstrução coronariana. Além disso, os eventos tromboembólicos em território venoso são influenciados por fatores de risco diferentes daqueles da trombose arterial, pois, a trombose venosa é evento agudo, em contraste com a maioria das tromboses arteriais, que ocorrem em vasos com doença aterosclerótica prévia (He, 2005; Kanellaki-Kyparissi et al., 2005).

Essas diferenças também são fundamentais para a compreensão da fisiopatologia de diversas doenças vasculares, bem como para a escolha da metodologia a ser empregada para estudar o endotélio.

2.5. Técnicas para avaliação da função endotelial

O endotélio pode ser avaliado diretamente na artéria e na veia, ao passo que na circulação sistêmica o estudo de sua função é indireto, por intermédio de marcadores (Kuvin e Karas, 2003).

Avalia-se o endotélio arterial quando se deseja analisar doenças relacionadas à sua disfunção, como aterosclerose, doença das artérias coronárias e doença isquêmica cerebral (Celermajer, 1997; Rubenfire et al., 2000).

O estudo do endotélio venoso tem grande importância em diversas situações fisiopatológicas como, por exemplo, para se avaliar o efeito de drogas com ação no sistema venoso, na terapêutica de doenças como a insuficiência cardíaca congestiva e na sua disfunção, como no tromboembolismo venoso (Grossman et al., 1998; Grossman et al., 2000; Lin et al., 2003).

A maioria das técnicas de avaliação da função endotelial em humanos mede a variação do fluxo sangüíneo ou o diâmetro de grandes vasos arteriais ou venosos de determinado segmento anatômico após a infusão de drogas vasoativas ou manobras de isquemia local (Celermajer et al., 1992). A acetilcolina e a bradicinina são as substâncias mais utilizadas para avaliar a dilatação endotélio-dependente. Apesar de a bradicinina oferecer melhor resposta vasodilatadora do que a acetilcolina, o custo limita o seu uso. A vasodilatação endotélio-independente pode ser avaliada pela administração de

substâncias que agem diretamente nas células musculares lisas, como a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio (Collier et al., 1972; Vallance et al., 1989; Sorensen et al., 1995).

Até o momento, a maioria dos métodos que surgiram como alternativas à avaliação invasiva das artérias coronárias implica em análise da função endotelial arterial periférica. Entre eles, podem-se citar a pletismografia e o Doppler (Sorensen et al., 1995). A pletismografia, feita com infusão intra-arterial braquial ou femoral de agentes vasoativos, tem como maior limitação ser um procedimento invasivo (Joannides et al., 1995). O Doppler é exame de imagem da artéria braquial muito empregado, que analisa a vasodilatação induzida pela hiperemia reativa. Sua grande vantagem é não ser invasivo (Corretti et al., 2002), porém, é método que não apresenta padronização adequada (Kuvin et al., 2001).

Há ainda a possibilidade de dosagem de níveis séricos de marcadores de disfunção endotelial, estresse oxidativo ou de atividade fibrinolítica do endotélio (Rubanyi e Vanhoutte, 1986; Szmitko et al., 2003a,b). Essa avaliação tem muitas limitações, pois, vários estímulos, como exercício físico, infecções ou mudanças no metabolismo hepático, alteram os níveis sanguíneos ou urinários desses metabólitos, não tendo correlação com a disfunção endotelial (Rodriguez-Plaza et al., 1997; Lauer et al., 2002). Além disso, suas dosagens não mostram nenhuma informação sobre o local do envolvimento da doença e não indicam se a disfunção endotelial é causa ou consequência da moléstia de base (Gross e Aird, 2000; Kuvin e Karas, 2003; Hoetzer et al., 2003).

Pode-se também estudar a função endotelial *in vitro* ou em animais. A principal limitação dos estudos *in vitro*, é o fato de as células endoteliais removidas do tecido original poderem se comportar de maneira diferente daquela *in vivo*. O fator limitante das pesquisas de função endotelial em animais são os resultados nem sempre semelhantes aos do ser humano (Meredith et al., 1993; Re et al., 1994).

A técnica da complacência venosa de uma veia do dorso da mão (DHVT, do inglês, “dorsal hand vein technique”) é o único método direto e *in vivo* disponível, até o momento, para análise do endotélio venoso. Oferece oportunidade singular para a avaliação direta de estímulos fisiológicos e farmacológicos no sistema vascular venoso humano. Suas principais vantagens são o fácil acesso da veia do dorso da mão, baixa pressão intravascular e distensibilidade da parede do vaso (Aellig, 1994a,b), além de menor índice de complicações locais em relação à pletismografia arterial, que pode apresentar hematoma no local da punção da artéria. As drogas utilizadas têm apenas efeitos locais, os resultados sofrem menor interferência e há redução de riscos dos efeitos sistêmicos dos fármacos infundidos para os voluntários (Grossmann et al., 1996; Grossman et al., 1998).

Na DHVT são utilizadas substâncias como a acetilcolina e a bradicinina, que causam dilatação do vaso endotélio-dependente, predominantemente por liberação de óxido nítrico, servindo como medida indireta da produção adequada ou não de NO pela veia, que tem influência significativa no risco de

TEV (Vallance et al., 1989; Broeders et al., 1998; Vallance, 2000; Lin et al., 2003).

Essa técnica tem sido empregada para a análise de pacientes com fatores de risco que afetam o endotélio arterial, como tabagismo e hipertensão arterial sistêmica, demonstrando-se que eles também podem provocar disfunção endotelial no território venoso (Moreno et al., 1998; Chalon et al., 1999; Grossmann et al., 2001; de Sousa et al., 2005).

Como na literatura não existe ainda um método considerado padrão-ouro para a medida da função endotelial e do estresse oxidativo em humanos, propusemo-nos a realizar o presente estudo, para análise da função endotelial venosa em usuárias saudáveis de AHCO, através da DHVT, que é a única técnica disponível até o presente momento, para avaliação direta e *in vivo* da função endotelial venosa.

3. Objetivo

Avaliar a função endotelial venosa em mulheres saudáveis em uso de anticoncepcional hormonal combinado oral durante 4 meses, em relação a não usuárias, pela técnica da complacência venosa de uma veia do dorso da mão.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. (InCor-FMUSP), Protocolo ? 525/02, aprovado em 20 de novembro de 2002. (Anexo A)

4.2. Seleção da população

Selecionaram-se 40 mulheres no ambulatório de Planejamento Familiar da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para um estudo prospectivo caso-controle.

A seleção das pacientes, assim como a realização das etapas do experimento, teve início em fevereiro de 2003 e se encerrou em janeiro de 2004.

Todas as mulheres foram informadas a respeito da natureza do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. (Anexo B)

As voluntárias foram submetidas a anamnese, exames físico geral e ginecológico, registrando-se: idade, peso, altura, pressão arterial, antecedentes

peçoais para doença cardiovascular. O exame físico foi complementado por exames laboratoriais: glicemia de jejum, colesterol total e frações, triglicerídeos, dosagem da gonadotrofina coriônica.

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

- Desejo de entrar no protocolo de pesquisa
- Idade – 18 a 35 anos
- Vida sexual ativa
- Nenhum método anticoncepcional hormonal há pelo menos 12 meses

Adotaram-se os seguintes critérios de exclusão:

- Teste de gravidez positivo
- Antecedentes pessoais de: tromboembolismo venoso ou arterial, infarto do miocárdio, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, hepatopatias agudas ou crônicas, doenças tireoidianas
- Tabagismo
- Alterações no perfil lipídico:
 - Níveis de colesterol total acima de 240 mg/dl
 - Níveis de LDL-c acima de 160 mg/dl
 - Níveis de HDL-c abaixo de 40 mg/dl
 - Triglicerídeos acima de 150 mg/dl
- Glicemia de jejum acima de 100 mg/dl
- Obesidade (Índice de massa corpórea acima de 30)

4.3 População estudada

Das 40 mulheres selecionadas a partir dos critérios de inclusão e exclusão, 21 completaram as etapas do estudo. Entre os vários motivos para a exclusão, destacaram-se:

- Ausência em alguma das etapas da avaliação da função endotelial venosa.
- Problemas técnicos relacionados à veia do dorso da mão: dificuldades de punção, fragilidade (rompimento da veia durante o exame), vasoconstrição no exame basal.
- Interrupção do exame por ansiedade ou desejo miccional.

A população do estudo foi composta, então, de 21 mulheres saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos, avaliadas em estudo prospectivo caso-controle.

O grupo-caso constituiu-se de doze mulheres sexualmente ativas que iniciariam o uso de anticoncepcional combinado hormonal oral. A composição do AHCO empregado foi 15 µg de etinilestradiol associados a 60 µg de gestodeno, no esquema de 24 dias ininterruptos de administração, seguidos por 4 dias de pausa, durante 4 meses consecutivos.

O grupo-controle foi composto de nove mulheres sexualmente ativas sem uso de método anticoncepcional hormonal há mais de um ano, usuárias de dispositivo intra-uterino de cobre (DIU Tcu 380), pois não desejavam gestação durante o estudo. O método de anticoncepção do DIU de cobre não envolve

nenhum mecanismo hormonal ou mudanças hemodinâmicas que pudessem alterar os resultados do estudo da função endotelial (Nelson, 1998).

Nas doze mulheres do grupo-caso, a função endotelial venosa (FEV) foi estudada antes (basal) e ao final de quatro meses do uso do ACHO. O grupo-controle teve a FEV avaliada duas vezes, no mesmo intervalo.

A avaliação laboratorial constou de dosagem de glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total e frações, bem como a verificação dos parâmetros hemodinâmicos como pressão arterial e frequência cardíaca, no mesmo intervalo do estudo da função endotelial venosa. Essas avaliações foram necessárias, pois as alterações poderiam levar a mudanças no resultado da análise da função endotelial, conforme já descrito (Bedarida et al., 1993; Stepniakowski et al., 1997; Lewis et al., 1999; Grossmann et al., 2001).

4.4. Protocolo de estudo da função endotelial

O método escolhido para estudo da reatividade vascular endotélio-dependente e endotélio-independente foi a técnica de complacência venosa da veia do dorso da mão, por avaliar diretamente a função endotelial venosa e ter as características de ser pouco invasivo e ter poucas possibilidades de complicações locais e sistêmicas (Schindler et al., 2003).

4.4.1. Técnica de complacência de uma veia do dorso da mão

Realizaram-se os experimentos no Laboratório de Investigação Clínica da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em condições ambientais que estão de acordo com a orientação estabelecida para experimentos de avaliação da função endotelial venosa, conforme a padronização do método (Aellig, 1979; Aellig, 1981; Aellig, 1994a,b).

Durante a avaliação, as voluntárias permaneceram em posição supina, com um dos antebraços apoiado em suporte cômodo, em ângulo de 30° em relação à horizontal. Inseriu-se agulha 23G (*butterfly*) em veia do dorso da mão, infundindo-se solução fisiológica com bomba de infusão Harvard (Harvard Apparatus Inc. South Natick, Mass) durante 30 minutos, a 0,3 ml/min, para possibilitar a recuperação do tônus venoso local após a vasoconstrição causada pela inserção da agulha na veia.

Colocou-se transdutor capaz de detectar pequenos deslocamentos lineares (TDLV, Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ) sobre a superfície dorsal da mão, afixado firmemente à pele. O pino metálico que desliza através do transdutor teve uma de suas extremidades colocada sobre um ponto da veia a ser estudada, a menos de 1 cm da ponta da agulha utilizada para infusões de drogas. O deslocamento vertical do pino, de acordo com o grau de dilatação ou

constrição da veia, gerou um sinal no transdutor que foi amplificado e registrado em papel milimetrado (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 1- Representação esquemática do transdutor capaz de detectar pequenos deslocamentos lineares conforme a mudança do calibre da veia (Aellig, 1981)

Figura 2 - Transdutor (TDLV, Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ) e registro da vasodilatação em papel milimetrado.

Figura 3 - .Sistema de avaliação da complacência venosa de uma veia do dorso da mão.

Tomaram-se medidas do calibre da veia após insuflação de manguito de esfigmomanômetro a 40 mmHg colocado no mesmo braço. As variações no diâmetro da veia foram calculadas pela diferença percentual a partir do posicionamento do pino metálico e registro gráfico gerado antes e depois da insuflação do manguito.

O sinal do transdutor (TDLV, Shaeitz Engineering, Pennsauken, NJ), capaz de detectar pequenos deslocamentos lineares, foi calibrado e aferido periodicamente com lâminas de várias espessuras em milímetros, gerando uma escala progressiva em papel milimetrado, obtendo-se, assim, um parâmetro de funcionamento adequado do registro gráfico.

Depois da administração de soro fisiológico, procedeu-se à infusão de doses crescentes de fenilefrina a cada 7 minutos até se obter 80% de constrição em relação ao valor basal ou condição após infusão de soro fisiológico, estabelecendo uma linha de base para avaliação da resposta vascular venosa. Por razões de cálculos subseqüentes, essa dose de fenilefrina foi definida como a dose ED80 e esse grau de constrição máxima (80%) foi definido como 0% de dilatação. Os efeitos vasodilatadores examinados neste estudo foram calculados e expressos em percentagens de 0 a 100% de dilatação. Essa dose de fenilefrina foi infundida, então, continuamente, a uma taxa constante, provocando venoconstrição estável durante todo o período do estudo.

Após a pré-constrrição da veia com fenilefrina, infundiram-se drogas com bomba de infusão (Harvard Apparatus Inc. South Natick, Mass), com velocidade de 0,3 ml/min.

Infundiu-se acetilcolina (Ach) em concentrações crescentes a cada 4 minutos, construindo-se uma curva dose-resposta completa. Depois de 30 minutos para o completo desaparecimento dos efeitos da acetilcolina, doses crescentes de nitroprussiato de sódio (NPS) foram infundidas a cada 4 minutos, para construção de curva dose-resposta, sob a mesma condição de pré-constrrição usada anteriormente (ED80).

A resposta de venodilatação máxima ou Emax com as diferentes drogas foi utilizada como valor de referência para a comparação das respostas dos grupos caso e controle, entre o momento basal e o final do estudo em 4 meses.

4.4.2. Drogas usadas no estudo de complacência venosa

Fenilefrina, Cloridrato de (Winthrop Lab, New York, USA)

Acetilcolina (Divisão de Farmácia da Universidade de São Paulo, Brasil)

Nitroprussiato de Sódio (Biolab Sanus Farmacêutica Ltda, Brasil)

As drogas e doses foram utilizadas em estudos anteriores, em grande número de voluntários, sendo consideradas seguras para as pacientes (Collier e Vallance, 1990; Grossmann et al., 2001; Schindler et al., 2003).

4.4.2.1. Fenilefrina

A fenilefrina foi empregada em ambos os grupos de estudo, em doses entre 75 e 25.000 ng/ml, gerando estado de constrição de 80% em relação ao estado basal.

4.4.2.2. Acetilcolina

Utilizaram-se doses crescentes de acetilcolina (1,2 a 12.000 ng/ml) para completa curva dose-resposta de venodilatação na veia da mão pré-constrita com fenilefrina. Usou-se acetilcolina para provocar a venodilatação endotélio-dependente.

4.4.2.3. Nitroprussiato de sódio

Construiu-se curva dose-resposta com doses crescentes de NPS (156 a 3.125 ng/ml) na veia da mão pré-constrita com fenilefrina. Empregou-se o nitroprussiato de sódio para provocar venodilatação endotélio-independente, relacionada ao estímulo da camada muscular do vaso.

4.5 Análise estatística

Utilizou-se teste não paramétrico de Wilcoxon pareado para comparar a venodilatação dos grupos no momento basal e para avaliar sua variação entre o momento inicial e ao final de 4 meses. Optou-se por teste não paramétrico por se tratar de amostra pequena na qual não se puderam ter indícios de distribuição normal de dados.

Para avaliação das variações nos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos, cujas variáveis apresentam distribuição normal usou-se o teste Anova.

Considerou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Características clínicas dos grupos estudados

Com relação ao peso, altura e índice de massa corpórea (IMC) não houve diferenças significativas entre o grupo-caso e o grupo-controle. Os valores de IMC estavam dentro da faixa considerada ideal, que é de 18 a 25. Não houve alteração significativa do peso entre o momento basal e após quatro meses em ambos os grupos (Anexos C e D).

Apesar de ter sido observada pequena diferença entre a média etária nos grupos estudados, todas as mulheres tinham menos de 35 anos e assim se adequavam aos critérios de inclusão do protocolo (Anexo C). Os estudos a esse respeito indicam que a idade afeta significativamente a função endotelial a partir dos 40 anos (Taddei et al, 2006).

Os níveis médios de glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total e frações apresentaram-se dentro dos parâmetros de normalidade (NCEP-ATP III, 2001) nos dois grupos estudados. Não foram observadas alterações significantes nos diferentes momentos do estudo (Anexos C e D).

Os níveis médios de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e a frequência cardíaca (FC) mostraram-se dentro dos parâmetros de normalidade e não se detectaram mudanças significantes nesses parâmetros nos diferentes momentos do estudo, em ambos os grupos (Anexo E). Durante a

DHVT, a infusão de Ach e NPS não causou alterações em qualquer dos parâmetros.

5.2. Avaliação da resposta vasodilatadora

Verificou-se grande variabilidade de resposta à Ach intersujeitos, tanto no momento basal quanto ao final de 4 meses, em ambos os grupos do estudo (Gráficos 1 e 2, Anexos F e G).

Gráfico 1 - Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-caso em resposta à acetilcolina

Gráfico 2 - Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-controle em resposta à acetilcolina

No grupo-caso, a média de vasodilatação máxima (Emax) em resposta à acetilcolina (vasodilatação endotélio-dependente) foi de $68,08\% \pm 51,23\%$ no momento basal. Após 4 meses de uso de AHCO, a Emax se reduziu para $58,0\% \pm 34,46\%$, mas essa diminuição na vasodilatação não foi estatisticamente significativa. No grupo-controle não houve mudanças estatisticamente significantes na média de vasodilatação máxima (Emax) em resposta à acetilcolina, entre a medida no momento inicial ($59,33\% \pm 38,76\%$) e 4 meses após ($75,89\% \pm 60\%$) (Tabela 1, Gráfico 3).

Tabela 1 - Valores médios de vasodilatação máxima (Emax) em resposta à acetilcolina e resultado dos testes (Wilcoxon)

Medida	Grupo									
	Caso					Controle				
	N= 12					N= 9				
	Média	DP	Mediana	EP	<i>p</i>	Média	DP	Mediana	EP	<i>p</i>
Ach basal	68,08	51,23	62,5	14,8	0,53	59,33	38,77	54,0	12,9	0,76
Ach 4 meses	58	34,46	63,5	9,9		75,89	60,21	42,0	20,1	

Ach= acetilcolina; DP= desvio padrão; EP= Erro Padrão

Gráfico 3 - Dilatação média com uso da acetilcolina e respectivos erros padrão

Também foi observada variabilidade intersujeitos na resposta ao NPS, em ambos os grupos, nos dois momentos do estudo (Gráficos 4 e 5 Anexos H e I).

Gráfico 4 - Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-caso em resposta à nitroprussiato de sódio

Gráfico 5 - Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-controle em resposta ao nitroprussiato de sódio

No grupo-caso, a média de vasodilatação máxima (Emax) em resposta ao nitroprussiato de sódio (vasodilatação endotélio-independente) foi de 164,83 % $\pm$ 79,42 % no momento basal. Após 4 meses de uso de AHCO, a Emax se reduziu para 115,67% $\pm$ 45,44%. Essa diminuição não foi estatisticamente significativa.

No grupo-controle, não houve mudanças estatisticamente significantes na média de vasodilatação máxima (Emax) com nitroprussiato de sódio, entre a medida no momento inicial (135,56% $\pm$ 48,76 %) e 4 meses depois (130,67% $\pm$ 56,82 %, $p > 0,05$) (Tabela 2, Gráfico 6).

Tabela 2 - Valores médios de vasodilatação máxima (Emax) em resposta ao nitroprussiato de sódio e resultado dos testes (Wilcoxon)

Medida	Grupo									
	Caso					Controle				
	N= 12					N= 9				
	Média	DP	Mediana	EP	p	Média	DP	Mediana	EP	p
NPS basal	164,83	79,42	159	22,9	0,11	135,56	48,76	124	16,3	0,5
NPS 4 meses	115,67	45,44	105,5	13,1		130,67	56,83	124	18,1	

NPS= Nitroprussiato de sódio; DP= desvio padrão; EP= erro padrão

Gráfico 6 - Dilatação média com uso do nitroprussiato de sódio e respectivos erros padrão

6. Discussão

A disfunção endotelial desempenha papel fundamental na patogênese de diversas doenças cardiovasculares (Vanhoutte e Scott-Burden, 1994). Por esse motivo, a avaliação da função do endotélio tem sido investigada nos últimos anos, sob várias abordagens metodológicas e os resultados têm contribuído para o entendimento fisiopatológico de sua disfunção nos territórios arterial (Zeier et al., 1993; Landmesser et al., 2002; Boger, 2003) e venoso (Moreno et al., 1998; Chalonet et al., 1999).

Este é o primeiro estudo que avalia a função endotelial no sistema venoso pela técnica da complacência venosa em usuárias saudáveis de AHCO. A maioria dos estudos publicados sobre a influência dos esteróides sexuais no endotélio foi realizada no território arterial, em mulheres na peri ou pós-menopausa usando estrogênios naturais e não o sintético contido nos AHCO (Sudhir et al., 1996; Sorensen, 1998; Calkin et al., 2002; Hagmar et al., 2006).

O presente estudo foi motivado pelo fato dos AHCO contendo progestogênios de terceira geração estarem associados a maior risco de TEV do que aqueles com progestogênios de segunda geração (Jick et al., 1995; WHO, 1995a,b), não havendo explicação biológica plausível para tal. Deve-se lembrar que o tromboembolismo venoso tem fisiopatologia complexa e que não depende apenas do aumento ou diminuição de fatores de coagulação circulantes e, sim, da integridade funcional do endotélio, considerado o principal

elemento regulador da hemostasia (Gross e Aird, 2000; Brotman et al., 2004). Como existem evidências de que os esteróides sexuais sintéticos podem diferir dos naturais na ação sobre as células endoteliais (Peek et al., 1995; Subakir et al., 1995; Sudhir et al., 1996), um dos mecanismos ligados à elevação do risco de TEV entre as usuárias de AHCO poderia ser a disfunção endotelial.

Nossos resultados, após o uso de AHCO por 4 meses demonstraram haver redução na venodilatação endotélio-dependente e independente, porém, sem atingir significância estatística; um dos motivos foi a grande variabilidade intersujeitos observada nas respostas de vasodilatação, principalmente à acetilcolina. Alguns casos apresentaram resposta vasodilatadora abaixo de 60% no exame basal. A análise da literatura mostra que houve também grande variabilidade intersujeitos ou má resposta à Ach em outros estudos que utilizaram a DHVT para avaliar o endotélio venoso em várias condições fisiopatológicas (Vallance et al., 1989; Collier e Vallance, 1990; Blackman et al., 2000; Plentz et al., 2006). Não se sabe, até o momento, qual o motivo dessa variabilidade e da diferença de resposta entre indivíduos. Grossmann et al (2001) tentaram correlacionar a variabilidade de resposta à Ach a diferenças genéticas que pudessem alterar os níveis da eNOS ou da subunidade da proteína G do receptor muscarínico, importante para essa resposta. Não se encontrou associação entre essas diferenças genéticas e a variabilidade de resposta a Ach inter-indivíduos.

Como a técnica exige venoconstrição estável e a dose para atingí-la varia de pessoa para pessoa, poder-se-ia pensar que as diferentes doses de fenilefrina utilizadas poderiam ter influenciado os resultados de venodilatação. Schindler et al. (2003) demonstraram que, apesar da variabilidade de resposta à fenilefrina, a técnica tem boa reprodutibilidade, mas não que essa variação tenha influência nos resultados da venodilatação e na resposta à acetilcolina.

Deve-se ressaltar que a maioria dos estudos que avaliaram a variabilidade das diferentes drogas empregadas no endotélio venoso para padronização e definição da reprodutibilidade da DHVT foi conduzida em homens jovens, com a finalidade de evitar possíveis interferências da idade e dos hormônios sexuais no endotélio (Aellig, 1981; Schindler et al., 2003).

Sabe-se que as variações dos esteróides sexuais endógenos podem causar alterações na reatividade vascular, porém, a maioria dos estudos a respeito foi realizada no território arterial (Hashimoto et al., 1995; Williams et al., 2001). Walters e Shields (1977) demonstraram significativa variação do tônus vascular dependendo da fase do ciclo em que a reatividade venosa foi avaliada em mulheres em idade fértil, sendo as diferenças atribuídas à ação vasodilatadora do estrogênio. Essas variações relacionadas ao ciclo menstrual na função endotelial venosa podem ter levado nossos resultados a apresentarem maior variabilidade que a média da literatura e, conseqüentemente, maior desvio padrão, limitando o nível de significância estatística. Apesar de termos padronizado o estudo na 1ª fase do ciclo (7ª dia) em todas as pacientes (Anexos J e L), sabe-se que os níveis de estrogênio têm

grande variabilidade inter e intra-indivíduos, ainda que medidos no mesmo dia do ciclo, principalmente em pacientes com menos de 40 anos de idade (Ferrel et al., 2005).

Este é o primeiro estudo que empregou a DHVT em mulheres na menacme. Até o momento, há uma única pesquisa que a utilizou em mulheres, porém na pós-menopausa (Ceballos et al., 2000). Nesse estudo houve menor variabilidade e desvio padrão na resposta aos vasodilatadores no momento basal, o que sugere que o prévio *status* hormonal influiria na variabilidade de resposta vasodilatadora, conforme observado em nossos resultados.

Sabe-se que tanto a musculatura lisa do vaso quanto o endotélio têm receptores estrogênicos, os quais por estímulo da NO sintetase, levam à vasodilatação (Thompson e Khalil, 2003). Receptores de estrogênio, de progesterona e testosterona são expressos no endotélio e no músculo liso vascular (Thompson e Khalil, 2003), sendo descritos os subtipos de receptores estrogênicos α e β dentre outras variantes (Mendelsohn, 2002; Wynne e Khalil, 2003; Orshal e Khalil, 2004). Os progestogênios podem ter efeitos diretos ou modificar os efeitos do estrogênio sobre a reatividade vascular.

Os efeitos vasculares dos hormônios sexuais aparentam ter mecanismos predominantemente endotélio-dependentes (Khalil, 2005), e o estrogênio endógeno causa inibição aguda da contração vascular (Crews e Khalil, 1999; Thompson e Khalil, 2003; Orshal e Khalil, 2004) e potencializa a vasodilatação

endotélio-dependente em mulheres na pós-menopausa (Gilligan et al., 1994). Os esteróides sexuais também podem ter efeitos diretos no músculo liso vascular implicando em mecanismos endotélio-independentes (Khalil, 2005).

Demonstrou-se que os hormônios sexuais também modificam o tônus vascular por alterarem a síntese, liberação e bioatividade de vários fatores vasodilatadores, como NO, PGI-2 e fator hiperpolarizante derivado do endotélio, assim como de fatores vasoconstritores, como a endotelina-1 e o tromboxano (Orshal e Khalil, 2004).

Não se sabe qual o efeito dos estrogênios sintéticos sobre o vaso, já que a maioria dos estudos de função endotelial *in vivo* e *in vitro* utilizou estrogênios naturais (Sudhir et al., 1996; Somjen et al., 1998; Dubey et al., 2000; Calkin et al., 2002).

Há poucos trabalhos publicados sobre os efeitos dos anticoncepcionais orais na função endotelial. As técnicas empregadas foram as mais diversas: dosagens sanguíneas de marcadores de atividade fibrinolítica do endotélio (Merki-Feld et al., 2002; Hoetzer et al., 2003), estudos com células endoteliais *in vitro* (Herkert et al., 2000), avaliações de reatividade vascular no território arterial com pletismografia (John et al., 2000) e ressonância magnética (Sorensen et al., 2002). Devido a essa variedade de técnicas, aos diferentes desenhos dos estudos e às diferenças entre o endotélio arterial e o venoso, os resultados dessas pesquisas não são comparáveis entre si e nem com os nossos resultados.

Dentre estes estudos destacam-se o de John et al. (2000) e o de Viridis et al. (2003), que, assim como o nosso, utilizaram metodologia direta de avaliação da função endotelial, mas no território arterial. Em ambas as pesquisas não se observaram alterações significantes nas respostas vasodilatadoras endotélio-dependente e endotélio-independente nas usuárias de AHCO. Contudo, no estudo de John et al. (2000), quando se infundiu um inibidor da produção de óxido nítrico, a N-monometil L-arginina (L-NMMA), houve redução significativa da vasodilatação nas usuárias de AHCO, indicando que a produção e a liberação de NO, por algum motivo, estava elevada nestas pacientes. Esse aumento pode representar um mecanismo compensatório para manter o tônus vascular e para contrabalançar efeitos vasoconstritores induzidos pelos contraceptivos, que ainda não são completamente compreendidos (Zeiger et al., 1993; Boger et al., 1997).

Viridis et al. (2003), apesar de não terem encontrado alterações significantes na função endotelial, por observarem mudanças desfavoráveis no perfil lipídico nas usuárias de AHCO, especulam que efeitos adversos decorrentes do aumento nos níveis de lipídeos seriam contrabalançados com um possível efeito vasodilatador do etinilestradiol. Tal hipótese implica no efeito neutro do componente gestodeno, porém, dados sobre a influência dos progestogênios na função endotelial são ainda inconsistentes. Em alguns estudos, o efeito favorável do estrogênio na função endotelial não foi alterado por eles, embora outros investigadores tenham observado que os

progestogênios reduzem ou neutralizam os efeitos do estrogênio no endotélio (Sorensen et al., 2002; Honisett et al., 2003). Pesquisa com o uso isolado de acetato de medroxiprogesterona em mulheres jovens mostrou piora da vasodilatação endotélio-dependente durante a hiperemia reativa (Sorensen et al., 2002). Em contraste, em mulheres na pós-menopausa com deficiência estrogênica já estabelecida, nem a progesterona micronizada, ou o progestagênio sintético afetam adversamente a reatividade vascular (Glusa et al., 1997; Honisett et al., 2003). Assim, o efeito desses esteróides sexuais na função endotelial permanece sem esclarecimento .

Essas investigações avaliaram o endotélio arterial, cuja disfunção está mais associada ao desenvolvimento de aterosclerose, trombose arterial e hipertensão. Como eventos tromboembólicos relacionados ao uso de AHCO são predominantemente encontrados na circulação venosa e as veias têm diferentes respostas a agentes vasoativos quando comparadas com as artérias (D'Orleans-Juste et al., 1989; Miller et al., 1989), faz-se necessário um esclarecimento sobre os efeitos dos esteróides sexuais usados na anticoncepção hormonal oral no sistema venoso.

Além de nosso estudo, não há pesquisas sobre a função endotelial venosa com uso de AHCO *in vivo*. Herkert et al (2000) realizaram investigação *in vitro* para determinar se os esteróides sexuais utilizados nos contraceptivos orais, como levonorgestrel, gestodeno, 3-keto-desogestrel, acetato de clormadinona e etinilestradiol, afetariam o tônus de veias isoladas. Todos esses

hormônios causaram relaxamentos nas veias jugulares pré-constritas de coelhas, sendo os resultados dependentes das concentrações hormonais. Posteriormente, esses mesmos autores fizeram experimentos com levonorgestrel, demonstrando que o mecanismo responsável pelo relaxamento não era endotélio-dependente, mas se devia à ação direta no músculo liso vascular. Esse relaxamento do vaso progestogênio-induzido pode ter relevância fisiopatológica, pois contribui com as mudanças do tônus venoso para o desenvolvimento de eventos tromboembólicos. Se os progestogênios podem intensificar a vasodilatação causada pelo etinilestradiol em veias, poderiam provocar pronunciada redução da velocidade do fluxo sanguíneo, resultando em maior estase e maior contato das plaquetas com a parede do vaso (Tangelder et al., 1988).

Em síntese, o estudo da influência da anticoncepção combinada hormonal oral na disfunção endotelial está apenas em seu início.

Nossa pesquisa foi a primeira a estudar a função endotelial venosa em humanos, com avaliação direta da reatividade vascular venosa, endotélio-dependente e independente, em usuárias de AHCO na menacme. Deve-se ressaltar que a vasodilatação NO-dependente é um mecanismo importante, mas não o único componente da função endotelial. Este pode não ser o único mecanismo pelo qual os AHCO aumentam o tromboembolismo venoso. O endotélio intacto também exerce efeitos antitrombóticos e antiinflamatórios, que

não são explorados ou detectados diretamente pela avaliação da vasodilatação NO-dependente.

Nosso objetivo foi investigar se a disfunção endotelial venosa era um dos possíveis mecanismos do aumento da incidência de tromboembolismo venoso em usuárias de AHCO. Os resultados não demonstraram haver redução estatisticamente significativa na venodilatação endotélio-dependente e independente. Porém, deve-se ressaltar que, como estudo piloto, mostrou diferenças que provavelmente não tenham atingido significância estatística em razão do tamanho da amostra e da grande variabilidade intersujeito de nossos resultados. Por isso, são necessárias mais pesquisas com maior número de mulheres.

7. Conclusão

Nosso estudo não mostrou mudanças significantes na função endotelial venosa em mulheres saudáveis utilizando um anticoncepcional hormonal combinado oral por 4 meses em relação a não usuárias, avaliada pela técnica da complascência venosa de uma veia do dorso da mão.

Anexo A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.11.02, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 525/02, intitulado: "Estudo da função endotelial durante o ciclo menstrual e após a introdução de diversos métodos anticoncepcionais", apresentado pelo Departamento de CARDIO-PNEUMOLOGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Responsável: DRA. FERNANDA MARIANO CONSOLINI-COLOMBO

Responsável: DRA. CASIMIRA ROCHA GILVÃO GONDIM

CAPPesq, 20 de Novembro de 2002.

PROF. DR. JORGE WAINZ FILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Observação: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido nº 102, de 10.10.1996, bem como o termo 1-1.

Anexo B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ? F ?

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL :.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ? F ?

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Estudo Da Função Endotelial durante o Ciclo Menstrual, a após a Introdução de Diversos Métodos Anticoncepcionais Hormonais

2. PESQUISADOR: Cassiana Rosa Galvão Giribela

CARGO/FUNÇÃO: .Pós graduando da Clínica Ginecológica e Obstétrica- HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 97361

UNIDADE DO HCFMUSP: . Clínica Ginecológica e Obstétrica-

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	?	RISCO MÍNIMO	x?	RISCO MÉDIO	?
		RISCO BAIXO	?	RISCO MAIOR	?

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : fevereiro de 2003 a janeiro de 2004

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa. Uma alteração no funcionamento dos vasos sanguíneos, pode levar ao surgimento no futuro de doenças como pressão alta, e aterosclerose. Está sendo pesquisado no mundo todo se os anticoncepcionais alteram o funcionamento dos vasos. O senhor vai ser submetido a um exame que procura avaliar se houve alteração no funcionamento dos seus vasos sanguíneos após o início do uso do seu anticoncepcional.

2.Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;

A) Avaliação clínica e laboratorial (exames de sangue) , a senhora fará exames de sangue, para ver se têm alguma doença que não saiba como, colesterol alta, diabetes, anemia, hormônios femininos (aqueles que fazem com que a menstruação venha todo mês), e teste de gravidez.

B) Exame para avaliar o vaso : Durante o exame o senhor ficará deitado numa maca e serão colocados adesivos no torax para registrar batimentos cardíacos e um aparelho para medir a pressão arterial colocado na perna. No lado direito será feita uma limpeza no dorso da mão com produtos que mata micróbios. Neste lado então será pega uma veia da mão com agulha pequena e ficará ligada a um soro e posteriormente pelo qual será colocado o medicamento dentro da veia . E na mão ficará colocado um aparelho que vai registrar o movimento desta veia.

3.Desconfortos e riscos esperados; Avaliação do vaso: Os riscos de pegar um vaso de sangue (veia)da mão são pequenos, pois serão feitos sempre por um rprofissional muito treinado na técnica. Pode ocorrer bem pouco de inchaço e roxo local, ou ficar um pouco dolorido. Existem pomadas que podem auxiliar caso isso ocorra.

4 Benefícios que poderão ser obtidos : a senhora realizará exames de sangue importantes para saber se têm várias doenças como colesterol alto e diabetes, e saberá se o anticoncepcional que está usando está afetando o funcionamento de seus vasos sanguíneos.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
 4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
2. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
-

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Fernanda M. Consolim –Colombo

Cassiana Rosa Galvão Giribela

Unidade de Hipertensão- INCOR- HC FMUSP

Av dr Eneas Carvalho Aguiar, 44

Telefone: 30695084

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 19 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo C. Descrição de características clínicas e valores dos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos estudados no momento basal, com respectivas médias e desvios padrão.

Medida	Grupo				
	Caso		Controle		
	N = 12		N = 9		
	Média	DP	Média	DP	p
Idade (anos)	24,77	4,11	30	7,91	0,032*
Peso (kg)	58,38	6,30	59,67	4,61	0,393
Altura (m)	1,59	0,04	1,60	0,06	0,556
IMC (kg/ m ²)	23,07	3,11	23,33	2,20	0,512
Glicemia jejum (mg/dl)	82,38	8,93	87,11	5,62	0,357
Colesterol total (mg/dl)	165,69	29,90	166,11	37,71	0,939
LDL-c (mg/dl)	93,46	23,29	96,60	12,63	0,859
HDL-c (mg/dl)	55,08	13,18	53,38	24,32	0,938
Triglicerídeos (mg/dl)	85,62	25,12	82,44	31,24	0,854
Pressão arterial sistólica (mmHg)	108	4,3	111,8	3,35	0,756
Pressão arterial diastólica (mmHg)	72,5	3,44	73	2,06	0,632
Frequência cardíaca (bpm)	73,2	1,36	69,8	1,69	0,733

HDL-c Lipoproteína de alta densidade; LDL-c Lipoproteína de baixa densidade ($p < 0,05$, estatisticamente significativa)

Anexo D. Comparação entre condição basal e após 4 meses, das características clínicas e valores dos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos estudados, com respectivas médias e desvios padrão

	Grupo						
Medida	Caso			Controle			
	Média	DP	N	Média	DP	N	<i>p</i>
Peso basal	58,38	6,30	12	59,67	4,61	9	0,383
Peso após 4 meses	58,98	6,17	12	59,87	4,61	9	
IMC basal	23,07	3,11	12	23,33	2,20	9	0,556
IMC após 4 meses	23,31	3,06	12	23,42	2,24	9	
Glicemia basal	82,38	8,93	12	87,11	5,62	9	0,858
Glicemia após 4 meses	83,77	19,34	12	86,89	4,51	9	
Colesterol basal	165,69	29,90	12	166,11	37,71	9	0,551
Colesterol após 4 meses	166,85	28,95	12	168,56	34,80	9	
LDL basal	93,46	23,29	12	96,60	12,63	9	0,854
LDL após 4 meses	92,92	21,41	12	91,89	10,83	9	
HDL basal	55,08	13,18	12	53,38	24,32	9	0,785
HDL após 4 meses	53,54	10,85	12	54,00	24,04	9	
Triglicerídeos basal	85,62	25,12	12	82,44	31,24	9	0,753
Triglicerídeos após 4 meses	83,77	42,13	12	82,67	30,05	9	

HDL-c Lipoproteína de alta densidade; LDL-c Lipoproteína de baixa densidade; ($p < 0,05$, estatisticamente significativa)

Anexo E. Parâmetros hemodinâmicos dos grupos-controle e caso na condição basal e após 4 meses com respectivas médias de desvio padrão

	Grupo controle (n= 9)		Grupo caso (n=12)		
	basal	Após 4 meses	basal	Após 4 meses	<i>p</i>
PAS (mmHg)	111,8±3,35	111,47±3,41	108±4,3	108±4,18	0,638
PAD (mmHg)	73±2,06	73,07±1,85	72,5±3,44	72,60±3,14	0,769
PP (mmHg)	38,8±2,04	38,40±2,31	35,5±2,51	35,40±2,49	0,876
FC (bpm)	69,8±1,69	69,93±1,66	73,2±1,36	73,40±1,30	0,698

PAS= pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica; PP= pressão de pulso; FC frequência cardíaca

Anexo F. Valores da vasodilatação máxima (Emax) do grupo-caso em resposta à acetilcolina

	Ach basal	Ach após 4 meses
Caso 1	108	66
Caso 2	56	28
Caso 3	90	111
Caso 4	52	36
Caso 5	54	27
Caso 6	5	119
Caso 7	14	62
Caso 8	200	67
Caso 9	71	40
Caso 10	73	0
Caso 11	69	65
Caso 12	25	75

Ach=acetilcolina

Anexo G. Vasodilatação máxima (Emax) do grupo-controle em resposta à acetilcolina

	Ach basal	Ach após 4 meses
Controle 1	86	40
Controle 2	54	32
Controle 3	16	24
Controle 4	148	142
Controle 5	56	80
Controle 6	43	32
Controle 7	47	42
Controle 8	58	91
Controle 9	26	200

Ach= Acetilcolina

Anexo H. Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-controle em resposta ao nitroprussiato de sódio

	NPS basal	NPS após 4 meses
Controle 1	129	129
Controle 2	149	126
Controle 3	124	124
Controle 4	116	116
Controle 5	105	105
Controle 6	116	157
Controle 7	84	63
Controle 8	142	91
Controle 9	255	265

NPS= nitroprussiato de sódio

Anexo I. Variação da vasodilatação máxima (Emax) intersujeitos do grupo-caso em resposta ao nitroprussiato de sódio

	NPS basal	NPS após 4 meses
Caso 1	113	74
Caso 2	186	135
Caso 3	300	140
Caso 4	183	206
Caso 5	106	71
Caso 6	168	185
Caso 7	84	131
Caso 8	265	78
Caso 9	271	93
Caso 10	150	64
Caso 11	89	106
Caso 12	63	105

NPS= nitroprussiato de sódio

Anexo J. Valores de estradiol (pg/ml) na fase folicular média e no período de uso do ACHO (7º dia do ciclo menstrual), no grupo-caso.

	basal	pós pilula
Caso 1	141	12
caso 2	40,4	11
Caso 3	89	13
Caso 4	86,9	7
Caso 5	35,2	25
Caso 6	145	15
Caso 7	36	13
Caso 8	116	9
Caso 9	125	21
Caso 10	130	30
Caso 12	119	13
Média	96,68	15,36
Desvio Padrão	42,26	7,04

Anexo L. Valores de estradiol (pg/ml) na fase folicular média (7º dia do ciclo menstrual), no grupo-controle

	basal	4 meses após
controle 1	85	60
controle 2	130	90
controle 3	112	50
controle 4	40	110
controle 5	105	95
controle 6	90	45
controle 7	45	107
controle 8	126	89
controle 9	65	95
Média	88,66	82,33
Desvio padrão	33,09	24,33

REFERÊNCIAS

Aellig WH. Use of a linear variable differential transformer to measure compliance of human hand veins in situ proceedings. *Br J Clin Pharmacol.* 1979;8:395P.

Aellig WH. A new technique for recording compliance of human hand veins. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;11:237-43.

Aellig WH. Clinical pharmacology, physiology and pathophysiology of superficial veins--2. *Br J Clin Pharmacol.* 1994a;38:289-305.

Aellig WH. Clinical pharmacology, physiology and pathophysiology of superficial veins--1. *Br J Clin Pharmacol.* 1994b;38:181-96.

Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU. Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ Res.* 1998;82:195-203.

Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 1994;343:1199-206.

Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol.* 1995;268:F885-98.

Barritt DW, Jordan SC. Clinical features of pulmonary embolism. *Lancet.* 1961;1:729-32.

Bedarida GV, Bushell E, Haefeli WE, Blaschke TF, Hoffman BB. Responsiveness to bradykinin in veins of hypercholesterolemic humans. *Circulation.* 1993;88:2754-61.

Blackman DJ, Morris-Thurgood JA, Atherton JJ, Ellis GR, Anderson RA, Cockcroft JR, Frenneaux MP. Endothelium-derived nitric oxide contributes to the regulation of venous tone in humans. *Circulation.* 2000;101:165-70.

Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet.* 1995;346:1593-6.

Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation.* 1997;95:2068-74.

Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res.* 2003;59:824-33.

Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 1997;77:408-23.

Boyce J, Fawcett JW, Noall EW. Coronary thrombosis and Conovide. *Lancet.* 1963;1:111.

Brody SA, Turkes A, Goldzieher JW. Pharmacokinetics of three bioequivalent norethindrone/mestranol-50 micrograms and three norethindrone/ethinyl estradiol-35 micrograms OC formulations: are "low-dose" pills really lower? *Contraception.* 1989;40:269-84.

Broeders MA, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS, oude Egbrink MG. Endogenous nitric oxide protects against thromboembolism in venules but not in arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:139-45.

Broeders MA, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS, Egbrink MG. Endogenous nitric oxide and prostaglandins synergistically counteract thromboembolism in arterioles but not in venules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:163-9.

Brotman DJ, Deitcher SR, Lip GY, Matzdorff AC. Virchow's triad revisited. *South Med J*. 2004;97:213-4.

Burkman RT, Collins JA, Shulman LP, Williams JK. Current perspectives on oral contraceptive use. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185:S4-12.

Calkin AC, Sudhir K, Honisett S, Williams MR, Dawood T, Komesaroff PA. Rapid potentiation of endothelium-dependent vasodilation by estradiol in postmenopausal women is mediated via cyclooxygenase 2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:5072-5.

Cambria RA, Lowell RC, Gloviczki P, Miller VM. Chronic changes in blood flow alter endothelium-dependent responses in autogenous vein grafts in dogs. *J Vasc Surg*. 1994;20:765-73.

Ceballos C, Ribes C, Amado JA, Perez J, Garcia Unzueta MT, de Berrazueta JR. Venous endothelial function in postmenopausal women who are receiving long-term estrogen and progestagen therapy. *Fertil Steril*. 2000;74:268-73.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-5.

Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:325-33.

Chalon S, Moreno H, Jr., Hoffman BB, Blaschke TF. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves venous endothelial dysfunction in chronic smokers. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65:295-303.

Chung I, Lip GY. Virchow's triad revisited: blood constituents. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:449-54.

Collier JG, Nachev C, Robinson BF. Effect of catecholamines and other vasoactive substances on superficial hand veins in man. *Clin Sci.* 1972;43:455-67.

Collier J, Vallance P. Biphasic response to acetylcholine in human veins in vivo: the role of the endothelium. *Clin Sci (Lond).* 1990;78:101-4.

Conard J. Biological coagulation findings in third-generation oral contraceptives. *Hum Reprod Update.* 1999;5:672-80.

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita

J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-65.

Crews JK, Khalil RA. Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26:707-15.

D'Orleans-Juste P, Finet M, de Nucci G, Vane JR. Pharmacology of endothelin-1 in isolated vessels: effect of nicardipine, methylene blue, hemoglobin, and gossypol. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13 Suppl 5:S19-22; discussion S45.

de Sousa MG, Yugar-Toledo JC, Rubira M, Ferreira-Melo SE, Plentz R, Barbieri D, Consolim-Colombo F, Irigoyen MC, Moreno H, Jr. Ascorbic acid improves impaired venous and arterial endothelium-dependent dilation in smokers. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26:447-52.

Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Rosselli M, Keller PJ, Jackson EK. Estradiol inhibits smooth muscle cell growth in part by activating the cAMP-adenosine pathway. *Hypertension*. 2000;35:262-6.

Ernst E. Oral contraceptives, fibrinogen and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 1992;93:1-5.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001;285:2486-97.

Farmer RD, Lawrenson RA, Todd JC, Williams TJ, MacRae K. Oral contraceptives and venous thromboembolic disease. Analyses of the UK General Practice Research Database and the UK Mediplus database. *Hum Reprod Update*. 1999;5:688-706.

Ferrell RJ, O'Connor KA, Rodriguez G, Gorrindo T, Holman DJ, Brindle E, Miller RC, Schechter DE, Korshalla L, Simon JA, Mansfield PK, Wood JW, Weinstein M. Monitoring reproductive aging in a 5-year prospective study: aggregate and individual changes in steroid hormones and menstrual cycle lengths with age. *Menopause*. 2005;12:567-77.

Fotherby K, Caldwell AD. New progestogens in oral contraception. *Contraception*. 1994;49:1-32.

Fukuto JM, Chaudhuri G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35:165-94.

Gaylis H, Kraner MV. Oral contraceptives and venous thrombosis. *S Afr Med J*. 1962;36:1080-1.

Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon RO, 3rd. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*. 1994;90:786-91.

Glusa E, Graser T, Wagner S, Oettel M. Mechanisms of relaxation of rat aorta in response to progesterone and synthetic progestins. *Maturitas*. 1997;28:181-91.

Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26:463-78.

Grossmann M, Abiose A, Tangphao O, Blaschke TF, Hoffman BB. Morphine-induced venodilation in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60:554-60.

Grossman M, Dobrev D, Kirch W. Amiodarone causes endothelium-dependent vasodilation in human hand veins in vivo. *Clin Pharmacol Ther*. 1998;64:302-11.

Grossmann M, Dobrev D, Himmel HM, Kirch W. Local venous response to N-desethylamiodarone in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;67:22-31.

Grossmann M, Dobrev D, Siffert W, Kirch W. Heterogeneity in hand veins responses to acetylcholine is not associated with polymorphisms in the G-protein beta3-subunit (C825T) and endothelial nitric oxide synthase (G894T) genes but with serum low density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics*. 2001;11:307-16.

Hagmar M, Eriksson MJ, Lindholm C, Schenck-Gustafsson K, Hirschberg AL. Endothelial function in post-menopausal former elite athletes. *Clin J Sport Med*. 2006;16:247-52.

Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*. 1995;92:3431-5.

He GW. Endothelial function related to vascular tone in cardiac surgery. *Heart Lung Circ*. 2005;14:13-8.

Herkert O, Kuhl H, Busse R, Schini-Kerth VB. The progestin levonorgestrel induces endothelium-independent relaxation of rabbit jugular vein via inhibition of calcium entry and protein kinase C: role of cyclic AMP. *Br J Pharmacol*. 2000;130:1911-8.

Hoetzer GL, Stauffer BL, Greiner JJ, Casas Y, Smith DT, DeSouza CA. Influence of oral contraceptive use on endothelial t-PA release in healthy premenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:E90-5.

Honisett SY, Pang B, Stojanovska L, Sudhir K, Komesaroff PA. Progesterone does not influence vascular function in postmenopausal women. *J Hypertens.* 2003;21:1145-9.

Inman WH, Vessey MP, Westerholm B, Engelund A. Thromboembolic disease and the steroidal content of oral contraceptives. A report to the Committee on Safety of Drugs. *Br Med J.* 1970;2:203-9.

Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myers MW, Vasilakis C. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet.* 1995;346:1589-93.

Jick H, Kaye JA, Vasilakis-Scaramozza C, Jick SS. Risk of venous thromboembolism among users of third generation oral contraceptives compared with users of oral contraceptives with levonorgestrel before and after 1995: cohort and case-control analysis. *Bmj.* 2000;321:1190-5.

Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-9.

John S, Jacobi J, Schlaich MP, Delles C, Schmieder RE. Effects of oral contraceptives on vascular endothelium in premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:28-33.

Kanellaki-Kyparissi M, Kouzi-Koliakou K, Marinov G, Knyazev V. Histological study of arterial and venous grafts before their use in aortocoronary bypass surgery. *Hellenic J Cardiol*. 2005;46:21-30.

Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990;66:1561-75.

Khalil RA. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension*. 2005;46:249-54.

Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet*. 1993;342:1503-6.

Kuvin JT, Patel AR, Karas RH. Need for standardization of noninvasive assessment of vascular endothelial function. *Am Heart J*. 2001;141:327-8.

Kuvin JT, Karas RH. Clinical utility of endothelial function testing: ready for prime time? *Circulation*. 2003;107:3243-7.

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine -oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002;106:3073-8.

Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci*. 2002;17:251-5.

Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP. Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine is impaired in hypertriglyceridemic humans with normal levels of plasma LDL cholesterol. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:805-12.

Lin PH, Johnson CK, Pullium JK, Bush RL, Conklin BS, Chen C, Lumsden AB. L-arginine improves endothelial vasoreactivity and reduces thrombogenicity after thrombolysis in experimental deep venous thrombosis. *J Vasc Surg*. 2003;38:1396-403.

Lowe GD. Virchow's triad revisited: abnormal flow. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:455-7.

Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesser L, Yang ZH, Turina M, Gradel E, Weber E, et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med*. 1988;319:462-7.

Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol*. 2002;90:3F-6F.

Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*. 1993;4:953-61.

Merki-Feld GS, Imthurn B, Keller PJ. Effects of two oral contraceptives on plasma levels of nitric oxide, homocysteine, and lipid metabolism. *Metabolism*. 2002;51:1216-21.

Middeldorp S, Meijers JC, van den Ende AE, van Enk A, Bouma BN, Tans G, Rosing J, Prins MH, Buller HR. Effects on coagulation of levonorgestrel- and desogestrel-containing low dose oral contraceptives: a cross-over study. *Thromb Haemost*. 2000;84:4-8.

Miller VM, Komori K, Burnett JC, Jr., Vanhoutte PM. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am J Physiol.* 1989;257:H1127-31.

Moreno H, Jr., Chalon S, Urae A, Tangphao O, Abiose AK, Hoffman BB, Blaschke TF. Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. *Am J Physiol.* 1998;275:H1040-5.

Nelson AL. Intrauterine device practice guidelines: medical conditions. *Contraception.* 1998;58:59S-63S; quiz 72S.

Olivieri O, Friso S, Manzato F, Guella A, Bernardi F, Lunghi B, Girelli D, Azzini M, Brocco G, Russo C, et al. Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *Br J Haematol.* 1995;91:465-70.

Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:R233-49.

Osterud B, Robertsen R, Asvang GB, Thijssen F. Resistance to activated protein C is reduced in women using oral contraceptives. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994;5:853-4.

Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C, or protein S deficiency. A cooperative, retrospective study. *Gesellschaft fur*

Thrombose- und Hamostaseforschung (GTH) Study Group on Natural Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:742-8.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-6.

Panza JA, Casino PR, Badar DM, Quyyumi AA. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation.* 1993;87:1475-81.

Pawlak R, Chabielska E, Golatowski J, Azzadin A, Buczek W. Nitric oxide and prostacyclin are involved in antithrombotic action of captopril in venous thrombosis in rats. *Thromb Haemost.* 1998;79:1208-12.

Peek MJ, Markham R, Fraser IS. The effects of natural and synthetic sex steroids on human decidual endothelial cell proliferation. *Hum Reprod.* 1995;10:2238-43.

Plentz RD, Irigoyen MC, Muller AS, Casarini DE, Rubira MC, Moreno Junior H, Mady C, Ianni BM, Krieger EM, Consolim-Colombo F. [Venous endothelial

dysfunction in Chagas' disease patients without heart failure]. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86:466-71.

Poulter NR. Risk of fatal pulmonary embolism with oral contraceptives. *Lancet.* 2000;355:2088.

Quehenberger P, Loner U, Kapiotis S, Handler S, Schneider B, Huber J, Speiser W. Increased levels of activated factor VII and decreased plasma protein S activity and circulating thrombomodulin during use of oral contraceptives. *Thromb Haemost.* 1996;76:729-34.

Radomski MW, Moncada S. The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol.* 1993;344:251-64.

Re F, Zanetti A, Sironi M, Polentarutti N, Lanfranccone L, Dejana E, Colotta F. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1994;127:537-46.

Records Unit and Research Advisory Service of the Royal College of General Practitioners. Oral contraception and thrombo-embolic disease. *J R Coll Gen Pract.* 1967;13:267-79.

Repo H, Harlan JM. Mechanisms and consequences of phagocyte adhesion to endothelium. *Ann Med*. 1999;31:156-65.

Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Programme. Oral contraceptives and venous thromboembolic disease, surgically confirmed gallbladder disease, and breast tumours. *Lancet* 1973;1:1399-404.

Rodgers GM. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *Faseb J*. 1988;2:116-23.

Rodriguez-Plaza LG, Alfieri AB, Cubeddu LX. Urinary excretion of nitric oxide metabolites in runners, sedentary individuals and patients with coronary artery disease: effects of 42 km marathon, 15 km race and a cardiac rehabilitation program. *J Cardiovasc Risk*. 1997;4:367-72.

Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med*. 1999;340:1555-64.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*. 1995;85:1504-8.

Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:112-23.

Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1371-80.

Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, Christella M, Thomassen LG, Nicolaes GA, Meijers JC, Bouma BN, Buller HR, Prins MH, Tans G. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study. *Lancet*. 1999;354:2036-40.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986;250:H822-7.

Rubenfire M, Rajagopalan S, Mosca L. Carotid artery vasoreactivity in response to sympathetic stress correlates with coronary disease risk and is independent of wall thickness. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2192-7.

Sartwell PE, Masi AT, Arthes FG, Greene GR, Smith HE. Thromboembolism and oral contraceptives: an epidemiologic case-control study. *Am J Epidemiol*. 1969;90:365-80.

Schindler C, Grossmann M, Dobrev D, Francke K, Ravens U, Kirch W. Reproducibility of dorsal hand vein responses to phenylephrine and prostaglandin F2 alpha using the dorsal hand vein compliance method. *J Clin Pharmacol*. 2003;43:228-36.

Seidel CL, LaRochelle J. Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels. *Circ Res*. 1987;60:626-30.

Somjen D, Kohen F, Jaffe A, Amir-Zaltsman Y, Knoll E, Stern N. Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells. *Hypertension*. 1998;32:39-45.

Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74:247-53.

Sorensen KE, Dorup I, Hermann AP, Mosekilde L. Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function. *Circulation*. 1998;97:1234-8.

Sorensen MB, Collins P, Ong PJ, Webb CM, Hayward CS, Asbury EA, Gatehouse PD, Elkington AG, Yang GZ, Kubba A, Pennell DJ. Long-term use of

contraceptive depot medroxyprogesterone acetate in young women impairs arterial endothelial function assessed by cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2002;106:1646-51.

Spitzer WO, Lewis MA, Heinemann LA, Thorogood M, MacRae KD. Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *Bmj*. 1996;312:83-8.

Stanczyk FZ, Roy S. Metabolism of levonorgestrel, norethindrone, and structurally related contraceptive steroids. *Contraception*. 1990;42:67-96.

Stanczyk FZ. Pharmacokinetics of the new progestogens and influence of gestodene and desogestrel on ethinylestradiol metabolism. *Contraception*. 1997;55:273-82.

Stepniakowski KT, Lu G, Davda RK, Egan BM. Fatty acids augment endothelium-dependent dilation in hand veins by a cyclooxygenase-dependent mechanism. *Hypertension*. 1997;30:1634-9.

Stolley PD, Tonascia JA, Tockman MS, Sartwell PE, Rutledge AH, Jacobs MP. Thrombosis with low-estrogen oral contraceptives. *Am J Epidemiol*. 1975;102:197-208.

Subakir SB, Hadisaputra W, Siregar B, Irawati D, Santoso DI, Cornain S, Affandi B. Reduced endothelial cell migratory signal production by endometrial explants from women using Norplant contraception. *Hum Reprod.* 1995;10:2579-83.

Sudhir K, Jennings GL, Funder JW, Komesaroff PA. Estrogen enhances basal nitric oxide release in the forearm vasculature in perimenopausal women. *Hypertension.* 1996;28:330-4.

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation.* 2003a;108:2041-8.

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003b;108:1917-23.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Versari D, Salvetti A. Endothelium, aging, and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8:84-9.

Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS. Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol.* 1988;254:H1059-64.

Tanis BC, Rosendaal FR. Venous and arterial thrombosis during oral contraceptive use: risks and risk factors. *Semin Vasc Med.* 2003;3:69-84.

Tans G, Curvers J, Middeldorp S, Thomassen MC, Meijers JC, Prins MH, Bouma BN, Buller HR, Rosing J. A randomized cross-over study on the effects of levonorgestrel- and desogestrel-containing oral contraceptives on the anticoagulant pathways. *Thromb Haemost.* 2000;84:15-21.

Thom S, Hughes A, Martin G, Sever PS. Endothelium-dependent relaxation in isolated human arteries and veins. *Clin Sci (Lond).* 1987;73:547-52.

Thompson J, Khalil RA. Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:1-15.

Thorogood M. Oral contraceptives and myocardial infarction: new evidence leaves unanswered questions. *Thromb Haemost.* 1997;78:334-8.

Todd J, Lawrenson R, Farmer RD, Williams TJ, Leydon GM. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: A re-analysis of the MediPlus database. *Hum Reprod.* 1999;14:1500-5.

Vallance P, Collier J, Moncada S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res.* 1989;23:1053-7.

Vallance P. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res.* 2000;45:143-7.

Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet.* 1994;344:1453-7.

Vandenbroucke JP, Rosing J, Bloemenkamp KW, Middeldorp S, Helmerhorst FM, Bouma BN, Rosendaal FR. Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001;344:1527-35.

Vanhoutte PM, Scott-Burden T. The endothelium in health and disease. *Tex Heart Inst J.* 1994;21:62-7.

Vessey MP, Doll R. Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. *Br Med J.* 1968;2:199-205.

Vessey MP, Doll R. Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. A further report. *Br Med J.* 1969;2:651-7.

Virdis A, Pinto S, Versari D, Salvetti G, Bernini G, Fruzzetti F, Genazzani AR, Taddei S, Salvetti A. Effect of oral contraceptives on endothelial function in the peripheral microcirculation of healthy women. *J Hypertens*. 2003;21:2275-80.

Walters WA, Shields L. Venous distensibility during the menstrual cycle. *Br J Obstet Gynaecol*. 1977;84:697-700.

Willerson JT, Igo SR, Yao SK, Ober JC, Macris MP, Ferguson JJ. Localized administration of sodium nitroprusside enhances its protection against platelet aggregation in stenosed and injured coronary arteries. *Tex Heart Inst J*. 1996;23:1-8.

Williams MR, Westerman RA, Kingwell BA, Paige J, Blombery PA, Sudhir K, Komesaroff PA. Variations in endothelial function and arterial compliance during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:5389-95.

World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. *Lancet*. 1995a;346:1582-8.

World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet*. 1995b;346:1575-82

Wynne FL, Khalil RA. Testosterone and coronary vascular tone: implications in coronary artery disease. *J Endocrinol Invest*. 2003;26:181-6.

Yao SK, Ober JC, Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Golino P, Buja LM, Willerson JT. Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation*. 1992;86:1302-9.

Zeicher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*. 1993;92:652-62.

Apêndice

Iniciais dos nomes, RGHC, idade, medidas antropométricas dos indivíduos dos grupos estudados.

Nome	RGHC	n caso	idade	Peso basal	Altura	IMC basal	Peso 4° mês	IMC 4° mês
MNS	13524180b	caso 1	30,00	60,90	1,55	25,35	61,50	25,60
JAS	3363167g	caso 2	18,00	61,00	1,60	23,83	62,00	24,22
JP	2950074i	caso 3	23,00	63,00	1,61	24,30	63,50	24,50
IRDS	3064525j	caso 4	30,00	74,00	1,53	31,61	73,50	31,40
APV	3140487c	caso 5	27,00	52,00	1,52	22,51	52,60	22,77
FFL	13458578e	caso 6	20,00	52,00	1,60	20,31	53,00	20,70
KPMD	13458579d	caso 7	28,00	57,00	1,66	20,69	56,00	20,32
MJSF	13459331e	caso 8	23,00	52,00	1,60	20,31	51,50	20,12
HTGA	5143268a	caso 9	23,00	58,00	1,64	21,56	58,70	21,82
GBS	13459709a	caso 10	19,00	63,00	1,60	24,61	64,00	25,00
ADH	13461060j	caso 11	25,00	52,00	1,60	20,31	53,40	20,86
EAO	3251320h	caso 12	28,00	55,00	1,60	21,48	56,00	21,88

Grupo Caso

Nome	RGHC	n controle	idade	Peso basal	Altura	IMC basal	peso 4° mês	IMC 4° mês
ESPB	13447585E	controle 1	33	67	1,58	26,84	68	27,24
ASC	3078308F	controle 2	35	64	1,59	25,32	63	24,92
IPB	13461066D	controle 3	32	58	1,57	23,53	59	23,73
ISF	13487034F	controle 4	35	60	1,68	21,26	61	23,53
RGGC	13458577F	controle 5	27	61	1,72	20,74	61	20,74
VAD	13440087C	controle 6	35	61	1,58	24,44	62	24,84
MJO	13480094A	controle 7	25	54	1,60	21,09	53	20,70
GOS	3250126D	controle 8	20	60	1,55	24,97	59	24,56
ST	3299143I	controle 9	28	52	1,54	21,93	53	22,35

Grupo Controle

Apêndice.

Valores dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos dos grupos estudados no momento basal, e no 4º mês.

n caso	Glicemia basal	Colesterol basal	LDL basal	HDL basal	Triglicerídeos basal
caso 1	79	164	98	43	88
caso 2	103	155	81	57	86
caso 3	87	134	74	52	78
caso 4	78	207	97	66	81
caso 5	85	156	93	39	118
caso 6	91	166	104	53	79
caso 7	80	190	107	63	99
caso 8	90	204	106	88	85
caso 9	82	149	74	62	66
caso 10	73	95	44	43	89
caso 11	70	179	109	59	84
caso 12	73	180	116	47	86

Grupo caso; momento basal

n caso	Glicemia 4º mês	Colesterol 4º mês	LDL 4º mês	HDL 4º mês	Triglicerídeos 4º mês
caso 1	87	160	101	42	83
caso 2	95	161	83	55	87
caso 3	138	140	70	59	55
caso 4	79	226	120	75	156
caso 5	68	157	80	39	85
caso 6	77	165	95	50	100
caso 7	75	176	93	62	105
caso 8	78	166	89	60	56
caso 9	82	173	88	60	87
caso 10	101	102	46	40	45
caso 11	70	179	105	54	100
caso 12	63	201	128	60	64

Grupo caso; 4º mês

Apêndice.

Valores dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos dos grupos estudados no momento basal, e no 4º mês.

? controle	Glicemia basal	Colesterol basal	HDL basal	LDL basal	Triglicerídeos basal
controle 1	81	151	55	91	44
controle 2	83	193	73	109	53
controle 3	92	125	40	95	99
controle 4	82	175	47	91	67
controle 5	96	98	46	94	90
controle 6	92	223	54	117	150
controle 7	82	160	52	95	83
controle 8	85	189	56	92	90
controle 9	91	181	57	85	66

Grupo controle; momento basal

? controle	Glicemia 4º mês	Colesterol 4º mês	HDL 4º mês	LDL 4º mês	Triglicerídeos 4º mês
controle 1	85	160	53	93	47
controle 2	82	185	61	108	50
controle 3	85	140	43	87	97
controle 4	81	180	69	88	70
controle 5	94	95	47	67	93
controle 6	91	215	53	120	147
controle 7	85	165	54	97	86
controle 8	87	192	52	81	87
controle 9	92	185	54	86	67

Grupo controle; 4º mês