UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre a hemostasia

Bianca Stocco

**Ribeirão Preto
2011**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre a hemostasia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado(a): Bianca Stocco

Orientador(a): Prof.Dra.Maria ReginaTorqueti

**Ribeirão Preto
2011**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Stocco, Bianca

Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre a hemostasia. Ribeirão Preto, 2011.

92 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Torqueti, Maria Regina

1. Hemostasia.
2. Lipídios.
3. Moléculas de adesão.
4. Contraceptivos hormonais combinados orais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Bianca Stocco

Título: Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre a hemostasia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador (a): Prof.Dra.Maria Regina Torqueti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Márcio e Solange, a
minha irmã Danielli e ao Alexandre*

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar todos os meus passos e por me proteger em todos os momentos de minha vida.

À minha mãe, Solange Baioco Stocco, por estar sempre ao meu lado oferecendo seu amor e sua amizade nos momentos de alegria e tristeza. Te amo mãe!

Ao meu pai, Márcio Stocco, por me ensinar a ser uma pessoa digna e responsável, por me fazer enxergar que tudo é possível. Obrigada pai, amo você.

A minha irmã, Danielli Stocco pela amizade, confiança e pelo carinho especial. Amo você.

Ao Alexandre Moretti Franco por fazer com que os obstáculos se tornassem mínimos através de suas palavras de incentivo. Amo você.

À minha tia Dejanira e às minhas avós, Áurea e Lúcia pela força e por acreditarem e torcerem por minha vitória e felicidade.

À Profa. Dra. Maria Regina Torqueti pela oportunidade, amizade, carinho e dedicação. Muito obrigada por confiar em meu trabalho e por seus ensinamentos no trabalho e na vida, os quais levarei para sempre.

À Marlise Montes por me ensinar tudo com muita paciência, dedicação e disposição. Agradeço também pelas palavras de conforto que amenizavam qualquer situação. Saudades de você Má.

Às técnicas Lilian Cataldi Rodrigues e Francine Bianchini por estarem sempre dispostas a ajudar e pela amizade diária.

Aos meus colegas do Laboratório de Citologia Clínica Amanda Faria, Jennifer Michiko Chauca Yokoya e Rubens Eduardo da Silva. Agradeço também aos alunos do grupo do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi: Camillo Del Cistia Andrade, Thalita Bacheli Riul, Amanda Cristina Trabuco, Bárbara Bastos, Barbara Oliveira e também aos que não fazem mais parte, Natália Koyama, Marcella Grando e Miriam Salvador pela ajuda, pela boa convivência e pelos momentos de descontração

Agradeço em especial à Helen Figueiredo Fumagalli, a qual tornou possível este trabalho acordando todas as manhãs comigo na luta por pacientes; e à Karina Alves Toledo, por seus ensinamentos e paciência, os quais foram de extrema importância para minha formação.

A todos meus amigos, especialmente a Carolina Campos, Daniele Mancini, Livia Tavares e Fernanda Rodrigues pelo incentivo, pelos momentos de descontração e amizade.

Aos professores doutores Cleni Mara Marzochi – Machado, Edson Zangiacomi Martinez, Marcelo Dias Baruffi e a todos os professores e mestres que passaram por minha vida, pelos ensinamentos e dedicação.

À Márcia Sueli Baggio e ao laboratório de hemostasia do HC- FMRP/USP

Às voluntárias que participaram deste estudo pela colaboração e confiança depositada.

Ao Dr.Silvio Antônio Franceschini, pelo auxílio e acompanhamento das pacientes

À Luisa Helena Dias Costa, Cláudia Peroni, Eleni Linjardi, Ana Paula Zueli Barião e a todos os funcionários do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da FCFRP-USP.

À acessora científica Andressa Chiarella da empresa LGC Biotecnologia.

Ao acessor científico Ricardo Willian Rufato da empresa Labpack.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP.

À comissão de pós - graduação da FCFRP-USP

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado

*"Não haverá borboletas se a vida não passar por
longas e silenciosas metamorfoses."*

Rubem Alves

RESUMO

STOCCO, B. Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre a hemostasia. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introdução: Mais de 100 milhões de mulheres no mundo fazem uso de métodos contraceptivos hormonais. Apesar de seu desejado efeito na contracepção, sua metabolização ocorre no fígado estimulando a síntese de proteínas plasmáticas, dentre elas, as que controlam os sistemas de coagulação e fibrinólise, conferindo um estado de hipercoagulabilidade em suas usuárias. A literatura aponta também alterações no metabolismo dos lipídios e carboidratos, além de modular a expressão de moléculas de adesão presentes no endotélio.

Para combater os efeitos indesejáveis destes medicamentos, baixas concentrações de estrógenos e diferentes progestágenos foram introduzidos, pois, a estes últimos é conferida a atividade anti – estrogênica destas formulações. Estudos independentes sugerem que progesteronas de terceira e quarta geração possuem atividade anti-estrogênica menor em relação as de segunda geração. **Objetivos:** avaliar a ocorrência de alterações hemostáticas, analisar o perfil lipídico e quantificar moléculas de adesão no soro ou plasma da população feminina brasileira usuária de contraceptivos orais de segunda e quarta gerações. **Materiais e Métodos:** 70 participantes distribuídas em quatro grupos a saber : grupo I (controle- 20 pacientes); grupo II (DRSP/30EE- 20 pacientes); grupo III (DRSP/20EE- 16 pacientes) e grupo IV (LNG/30EE-14 pacientes). Foram avaliados os seguintes parâmetros: TP, Fator VII, TTPA, Fator XII, Fibrinogênio, Fator 1+2, Proteína C, Proteína S, Antitrombina, D – dímeros, PAI – 1, VCAM, ICAM, E- selectina, HDL, LDL, VLDL, Colesterol total e Triglicérides. **Resultados e discussões:** grupo II promoveu diminuição em TP e Prot. S; e aumento em HDL, VLDL, Col. total e TG; grupo III diminuiu TP, TTPA, Prot.S, ICAM e VCAM ; e aumentou Fibrinogênio, D-dímeros, HDL, VLDL, Col. total e TG e grupo IV diminuiu TP, Prot.C e aumentou ICAM e VCAM. **Conclusões:** Dos medicamentos estudados apontamos que: o grupo II promoveu alterações significativas no perfil lipídico caracterizando um estado pró-trombótico, apesar de apresentar o maior aumento nos valores de HDL e poucas alterações associadas à hipercoagulabilidade; o grupo III promoveu o maior número de alterações hipercoagulantes, alterou também perfil lipídico contribuindo para um estado pró- trombótico, embora tenha apresentado proteção endotelial e o grupo IV foi o medicamento que promoveu melhor proteção endotelial, não alterou perfil lipídico e ocasionou poucas alterações associadas à hipercoagulabilidade.

Palavras - chave: 1. Hemostasia. 2. Lipídios. 3. Moléculas de adesão. 4. Contraceptivos hormonais combinados orais. 5. Progestágenos

ABSTRACT

STOCCO, B. Evaluation of the effect of hormonal contraceptives on hemostasis. 2011. 92f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introduction: More than 100 million women in the world make use of hormonal contraceptives. In spite of its desired effect on contraception, its metabolization occurs at liver, stimulating the synthesis of the plasmatic proteins, among them, the ones that control the coagulation system and fibrinolysis, conferring a hypercoagulability state in their users. The literature also points changes in the metabolism of lipids and carbohydrates, besides modulate the expression of adhesion molecules present in the endothelium. Trying to combat undesirable effects of these drugs, low concentrations of estrogen and different progestogens were introduced, because, the antiestrogenic activity of these drugs is assigned to the progesterone used. Independent papers suggest that third and fourth generation progestones have a smaller antiestrogenic activity in relation to the second generation one. **Objectives:** evaluate the occurrence of hemostatic alterations, analyze the lipid profile and quantify adhesion molecules in serum or plasma on the Brazilian female population who is user of contraceptives from second and fourth generation. **Material and Methods:** 70 participants were distributed into four groups: group I (control- 20 patients); group II (DRSP/30EE- 20 patients); group III (DRSP/20EE- 16 patients) and group IV (LNG/30EE- 14 patients). From these were assessed the following parameters: PT, Factor VII, APTT, Factor XII, Fibrinogen, Factor 1+2, Protein C, Protein S, Antithrombin, D-dimers, PAI – 1, VCAM, ICAM, E-selectin, HDL, LDL, VLDL, Total Cholesterol and Triglycerides. **Results and discussion:** group II promoted a decrease in PT and Prot.S; and an increase in HDL, VLDL, Total cholesterol and TG; group III decreased PT, APTT, Prot.S, ICAM and VCAM ; and increased Fibrinogen, D- dimers, HDL, VLDL, Total Cholesterol and TG and group IV decreased PT, Prot.C and increased ICAM and VCAM. **Conclusions:** among the drugs studied we aim that: the group II promoted significant changes in lipid profile featuring a pro- thrombotic state, in spite of presented the highest increase in the levels of HDL and few alterations associated to hypercoagulability; group III promoted the biggest number of hypercoagulability alterations, this drug also changed the lipid profile contributing to a pro-thrombotic state, although it has presented endothelial protection and the group IV it was the drug that promoted the best endothelial protection, did not change lipid profile and caused few alterations associated with hypercoagulability

Key - words: 1. Hemostasis. 2. Lipids. 3. Adhesion Molecules. 4. Combined oral contraceptives. 5. Progestins

RESUMEN

STOCCO. B. **Evaluación del efecto de los anticonceptivos hormonales sobre la hemostasia.** 2011. 92f. Tesis (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introducción: Más de 100 millones de mujeres en todo el mundo hacen uso de los anticonceptivos hormonales. A pesar de su efecto deseado sobre la anticoncepción, su metabolismo en el hígado y estimula la síntesis de las proteínas del plasma, entre ellos, los sistemas que controlan la coagulación y la fibrinólisis, que confiere un estado de hipercoagulabilidad en sus usuarios. La literatura también apunta a cambios en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, y modular la expresión de moléculas de adhesión presentes en el endotelio. Para combatir los efectos indeseables de estos medicamentos, las concentraciones bajas de estrógenos y progestinas han sido introducidas diferente, porque esta última actividad se confiere anti - estrógeno en estas formulaciones. Estudios independientes sugieren que la progesterona tercera y cuarta generación actividad antiestrogénica son inferiores a los de la segunda generación. **Objetivos:** Evaluar la incidencia de los cambios de la hemostasia, analizar el perfil lipídico y cuantificar moléculas de adhesión en suero o plasma de las mujeres usuarias de anticonceptivos orales de Brasil en la segunda y cuarta. **Materiales y métodos:** 70 participantes se dividieron en cuatro grupos: grupo I (control de 20 pacientes), grupo II (DRSP/30EE- 20 pacientes), grupo III (DRSP/20EE- 16 pacientes) y grupo IV (LNG/30EE -14 pacientes). Se evaluaron los siguientes parámetros: PT, Factor VII, APTT, factor XII, el fibrinógeno, el factor 1 +2, la proteína C, proteína S, antitrombina, D - dímero, PAI - 1, VCAM, ICAM, la E-selectina, HDL, LDL , el colesterol VLDL, total y triglicéridos. **Resultados y discusión:** Grupo II provocó una reducción de mano de obra y Prot. S, y el aumento de HDL, VLDL, Col. TG y el total del grupo III disminuyó PT, APTT, Prot.S, ICAM y VCAM, y el aumento de fibrinógeno, D-dímeros, HDL, VLDL, Col. Total de Grupo IV y los triglicéridos y disminución del TP, Prot.C y el aumento de ICAM y VCAM. **Conclusiones:** De los medicamentos estudiados señaló que: el grupo II promovió cambios significativos en el perfil lipídico con un estado protrombótico, a pesar de tener el mayor aumento en HDL y algunos cambios relacionados con la hipercoagulabilidad y el grupo III, promovió el mayor número de cambios hipercoagulabilidad, perfil lipídico alterado también contribuye a un estado protrombótico, a pesar de que tenía la protección endotelial y el grupo IV fue el fármaco que promueve una mejor protección endotelial, no alteró el perfil de lípidos y ha causado pocos cambios asociados con hipercoagulabilidad.

Palabras - clave: 1. Hemostasia. 2. Los lípidos. 3. Las moléculas de adhesión. 4. Los anticonceptivos orales combinados. 5. progestinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático da cascata de coagulação sanguínea com seus respectivos inibidores fisiológicos	5
Figura 2 - Modelo esquemático representativo do controle de geração de trombina.....	6
Figura 3 - Esquema ilustrativo do controle do sistema fibrinolítico	7
Figura 4 - Expressão de moléculas de adesão no endotélio	10
Figura 5 - Esquema representativo das funções da lipoproteína HDL	13
Figura 6 - Etapas da ativação endotelial.....	15
Figura 7 - Esquema ilustrativo da ativação e propagação da coagulação	15
Figura 8 - Trombose arterial.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparações das características das participantes entre os quatro grupos em estudo.....	27
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - <i>Box-plots</i> para a idade (a) e IMC (b)	28
Gráfico 2 - <i>Boxplot</i> da variável TP	30
Gráfico 3 - <i>Boxplot</i> da variável TTPA.....	31
Gráfico 4 - <i>Boxplot</i> da variável Fibrinogênio.....	32
Gráfico 5 - <i>Boxplot</i> da variável Fator VII.....	33
Gráfico 6 - <i>Boxplot</i> da variável Fator XII.....	34
Gráfico 7 - <i>Boxplot</i> da variável do fragmento 1+2	35
Gráfico 8 - <i>Boxplot</i> da variável Proteína C.....	37
Gráfico 9 - <i>Boxplot</i> da variável Proteína S	38
Gráfico 10 - <i>Boxplot</i> da variável antitrombina	39
Gráfico 11 - <i>Boxplot</i> da variável Dímeros – D	41
Gráfico 12 - <i>Boxplot</i> da variável PAI-1	42
Gráfico 13 - <i>Boxplot</i> da variável ICAM-1	46
Gráfico 14 - <i>Boxplot</i> da variável VCAM-1	48
Gráfico 15 - <i>Boxplot</i> da variável E- selectina.....	49
Gráfico 16 - <i>Boxplot</i> da variável HDL colesterol.....	51
Gráfico 17 - <i>Boxplot</i> da variável LDL colesterol	52
Gráfico 18 - <i>Boxplot</i> da variável VLDL colesterol	54
Gráfico 19 - <i>Boxplot</i> da variável colesterol total.....	55
Gráfico 20 - <i>Boxplot</i> da variável triglicerídeos	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Acetato de Ciproterona
APO	Apolipoproteína
CAMs	Cell Adhesion Molecules
CMA	Acetato de Clormadinona
COCs	Contraceptivos Orais Combinados
COs	Contraceptivos Orais
DRSP	Drospirenona
DSG	Desogestrel
EE	Etinilestradiol
ELAM	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule -1
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
FgDP	Fibrinogen Degradation Products
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GPIb	Glicoproteína Ib
HDL	High Density Lipoprotein
HUVEC	Human Umbelical Vein Endothelial Cell
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IL- 1 β	Interleucina – 1 Beta
IMC	Índice de Massa Corporal
LCAT	Lecithin Cholesterol Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LNG	Levonorgestrel
LPAM-1	Lymphocyte Peyer's Patch Adhesion Molecule – 1
MPA	Medroxiprogesterona

µg	Microgramas
PAI-1	Inhibitor Plasminogen Type 1
PAI-2	Inhibitor Plasminogen Type 2
PON- 1	Paraoxonase 1
SHBG	Sex – Hormone Binding Globulin
t- PA	tissue Plasminogen Activator
TAFI	Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TP	Tempo de Protrombina
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada
u-PA	uroquinase Plasminogen Activator
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very Late Antigen -4
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
vWF	Von Willebrand Factor

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de gráficos	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Contraceptivos hormonais combinados orais	2
1.2 Hemostasia	4
1.2.1 Coagulação	4
1.2.2 Fibrinólise	6
1.3. Tromboembolismo	7
1.4 Moléculas de adesão	9
1.5 Lipídios	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 Gerais	18
2.2 Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Protocolo clínico	20
3.2 Avaliação da coagulação e fibrinólise	22
3.2.1 Parâmetros pró-coagulantes	22
3.2.2 Parâmetros anticoagulantes	22
3.2.3 Parâmetro marcador da coagulação	23
3.2.4 Parâmetro fibrinolítico	23
3.2.5 Parâmetro anti-fibrinolítico	23
3.3 Parâmetro moléculas de adesão	23
3.4 Parâmetros bioquímicos	24
3.5 Análises Estatísticas	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Características das participantes	27
4.2 Influências dos contraceptivos orais na hemostasia	29
4.2.1 Efeitos pró - coagulantes	29
4.2.2 Efeitos anticoagulantes	36
4.2.3 Efeito Fibrinolítico	40
4.2.4 Efeito anti – fibrinolítico	41
4.3 Moléculas de adesão	43
4.4 Perfil lipídico	50
4.5 Sumário da discussão	57
5. CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7. ANEXOS	83

1. Introdução

1.1. Contraceptivos hormonais combinados orais

Os contraceptivos orais (COs) surgiram em 1960 e foram aprovados para uso primeiramente nos Estados Unidos. Desde que foram introduzidos no mercado, aproximadamente 80% das mulheres utilizam este método como principal método de prevenção à gravidez (MARGOLIS et al. 2007). Os contraceptivos orais combinados (COCs) apresentam em sua formulação estrógeno e progesterona sintéticos, os quais serão responsáveis pela inibição da produção natural destes hormônios pelos ovários (FRYE, 2006). Dentre os mecanismos de ação destes hormônios sintéticos, podemos citar a inibição da ovulação, alteração do muco cervical e /ou modificação do endométrio para prevenir a implantação do ovo fecundado. O estrógeno contido nos COCs é responsável por suprimir a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH - *Follicle Stimulating Hormone*) inibindo a atividade ovariana e impedindo o desenvolvimento e amadurecimento do oócito. A progesterona contida nos COCs é responsável pelo espessamento do muco cervical com concomitante diminuição da motilidade do espermatozóide, também provoca mudanças no endométrio impedindo a implantação do blastocisto e suprime a ovulação (BELL et al., 1998; CHI, 1993; GRAHAM & FRASER, 1982).

Diferentes progesteronas foram desenvolvidas para uso em COCs, enquanto que o estrógeno não sofreu muitas modificações. A maioria dos COCs contém em sua formulação etinilestradiol (EE) (DUSTERBERG et al. 1996; HUBER et al. 2000; SITRUK-WARE, 2006; SPONA et al. 1997). O primeiro contraceptivo oral, “*Evanoid*”, continha 150µg de estrógeno (mestranol) e 9.85mg de progestágeno (norethindrona), (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE 2008). Melhoramentos na fórmula do Evanoid foram realizados no que se refere à dose, ao tipo de hormônio e à sincronização dos hormônios. Atualmente os COCs são classificados em gerações de acordo com a dose de estrógeno e o tipo de progesterona utilizado. A progesterona norethindrona, pertencente à primeira geração dos COCs (ou simplesmente “estranos”), continha de 2 a 5 vezes mais estrógeno e 10 vezes mais progesterona em relação às gerações atuais (PETITTI, 2003). A segunda geração conhecida por “gonanes”, são as progesteronas mais potentes em inibir a ovulação, e, portanto, permitem o uso de uma dose menor deste medicamento. Exemplos desta geração de progestágenos incluem o levonorgestrel e a noretisterona. O levonorgestrel é uma das progesteronas com maior efeito androgênico (HAMMOND, RABE & WAGNER, 2001). As pílulas de terceira geração também são conhecidas por progestágenos gonanes, como

desogestrel, gestodeno e norgestimato, as quais foram desenvolvidas para reduzir os efeitos colaterais. As progesteronas de terceira geração são seletivas, pois possuem um efeito androgênico menor. Muito recentemente, surgiram as pílulas com progestágenos de quarta geração, como por exemplo, a Drospirenona, uma aldosterona com efeitos antiandrogênicos e diuréticos (KRATTENMACHER, 2000), e o Dienogest, outro progestágeno de quarta geração com ação antiandrogênica parcial (GUIDA et al., 2010).

A drospirenona (DRSP) é uma progesterona com ação anti - mineralocorticóide derivada da spiro lactona (ELGER et al., 2003; KRATTENMACHER, 2000; FUHRMANN et al., 1996) é rapidamente absorvida após ingestão oral e atinge seu pico plasmático após uma ou duas horas de ingestão. Devido a sua ação anti - mineralocorticóide esta progesterona controla o aumento nos níveis de angiotensinogênio provocado pelo etinilestradiol (EE) quando ambas moléculas estão presentes em um mesmo contraceptivo (OELKERS, 2005). Drospirenona também exerce um efeito antiandrogênico, o qual embora menor que o efeito antiandrogênico proporcionado pelo acetato de ciproterona, é suficiente para ser usado em mulheres com acne, pois, quando combinada com etinilestradiol proporciona um aumento na globulina ligante de hormônios sexuais (SHBG) (MISHELL, 2008; RAPKIN & WINER, 2007).

O Dienogest é uma progesterona derivada da 19-nortestosterona e metabolizada por aromatização e hidroxilação (SITRUK-WARE, 2008). Não se liga a SHBG (*Sex – Hormone Binding Globulin*) entretanto os níveis séricos desta progesterona se mantêm altos enquanto os níveis de testosterona se mantêm baixos (TEICHMANN, 2003).

A “pílula” foi desenvolvida para ser cíclica, ou seja, com tratamento a ser desenvolvido num ciclo de 28 dias. Assim, durante três semanas administram-se doses fixas de hormônio contendo estrógeno e progesterona seguidas de uma semana de placebo. Esta sincronização também sofreu algumas mudanças: enquanto a pílula monofásica contém doses fixas de hormônio administradas durante três semanas, nas pílulas trifásicas a dose de progesterona aumenta a cada semana, mimetizando o ciclo menstrual natural da mulher (ANDERSON; GIBSONS & PORTMAN, 2006).

Os contraceptivos combinados orais são amplamente utilizados e bem aceitos como forma de contracepção. COCs possuem alta eficácia quando utilizados corretamente, e são muito bem tolerados pela maioria das mulheres (TRUSSEL, 2004). Apesar de seu desejado efeito nos órgãos reprodutivos, seus componentes hormonais possuem vários efeitos metabólicos, incluindo mudanças no metabolismo dos lipídios e carboidratos, além de variações hemostáticas (CONRAD, 1999). Avanços nas pesquisas relacionadas à trombose

proporcionaram um melhor entendimento da relação entre os múltiplos efeitos dos contraceptivos nos parâmetros hemostáticos e o risco de desenvolvimento de trombose. Isto se deve as mudanças nos parâmetros pró - coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticos ocasionadas durante o uso do medicamento (TCHAIKOYSKI & ROSING, 2010).

1.2 Hemostasia

Sob condições fisiológicas, a hemostasia foi designada para manter a circulação sanguínea em um estado fluído, mas também age com o propósito de reparação da integridade endotelial através da rápida formação do coágulo frente a uma lesão vascular (DAVIE; FUJIKAWA & KISIEL, 1991). Uma vez formado o coágulo, o sistema de fibrinólise é ativado para promover a dissolução da fibrina e restabelecer a fluidez dentro do vaso (FRANCO, 2001).

1.2.1 Coagulação

No modelo clássico da coagulação, descrito em 1964 por Macfarlane (MACFARLEANE, 1964) e por Davie e Ratnoff (DAVIE AND RATNOOF, 1964), a coagulação é definida como uma cascata proteolítica que pode ser ativada por duas vias enzimáticas distintas e denominadas didadicamente via extrínseca e via intrínseca.

A via extrínseca da coagulação é iniciada pelo fator tecidual (TF - *tissue factor*), uma proteína transmembrana exposta na parede do vaso lesado, que se liga ao fator VIIa da coagulação. O complexo formado pelo fator VIIa e TF ativa o fator X.

A via intrínseca (que possui todos os fatores necessários para formação do coágulo no plasma sanguíneo) é ativada quando o sangue faz contato com uma superfície negativamente ionizada (aniônica) como vidro, metal, dextran sulfato e ácido gálico (SILVERBERG & DIEHL, 1987; SILVERBERG, 1989; KLUFT, 1978; VAN DER GRAFF et al., 1982). Essa interação resulta na ativação do chamado sistema de contato, o qual é formado pelos zimógenos fator XII, fator XI e pré-caliceína, além de um cofator não enzimático, o cininogênio de alto peso molecular. O fator XII se liga á superfície aniônica e se torna ativo (FXIIa). O FXIIa se propaga até a ativação do fator X (MARTIJN et al., 2009). Embora as duas vias possam ser ativadas independentemente, elas culminam para uma via final comum representada pelo complexo FVa-FXa. Este complexo catalisa a conversão da protrombina em

trombina, a qual cliva o fibrinogênio em fibrina, ativa as plaquetas e finalmente induz a formação do coágulo (MACKMAN, 2009; TAMURA et al., 2009).

Para impedir a coagulação excessiva, as proteínas anticoagulantes controlam a formação da trombina.

Os anticoagulantes naturais que também colaboram com a regulação da cascata de coagulação, como o complexo proteína C/ S e a antitrombina, agem diretamente na ação e na geração da trombina (DI NISIO; MIDDELDORP & BULLER, 2005). A característica principal da via da proteína C reside na habilidade desta via em responder à presença de trombina. Quando a concentração de trombina aumenta, a trombina se liga a trombomodulina, levando à ativação da proteína C. A ativação da proteína C aumenta aproximadamente vinte vezes, *in vivo*, quando a proteína C se liga ao receptor de proteína C da célula endotelial (EPCR- *Endothelial Protein C Receptor*), pois este receptor ajuda na ‘apresentação’ da proteína C ao complexo trombina-trombomodulina (TAYLOR et al., 2001).

Figura 1. Modelo esquemático da cascata de coagulação sanguínea com seus respectivos inibidores fisiológicos (Proteína C ativada, Proteína S, Antitrombina e TFPI) (BREITENSTEIN, TANNER & LÜSCHER. **Circulation Journal**, 2010).

A ligação da trombina-trombomodulina também é responsável por inibir competitivamente a ligação do fibrinogênio, diminuindo a geração da fibrina e promovendo um efeito anticoagulante. A formação do complexo trombina-trombomodulina resulta na ativação do inibidor da fibrinólise ativado por trombina (TAFI-*thrombin activatable*

fibrinolysis inhibitor) e, na ativação da via anticoagulante da proteína C. A proteína C ativada se liga a proteína S e inativa os fatores Va e VIIIa da coagulação (ESMON et al., 2005).

Para ajudar a conter a cascata da coagulação, o inibidor da via do fator tecidual (TFPI - *Tissue factor pathway inhibitor*) é ativado, o qual atua através da formação de um complexo quaternário com o Fator Xa, inibindo o complexo TF-FVIIa (BROZE, GIRARD & NOVOTNY, 1990).

Figura 2. Modelo esquemático representativo do controle de geração de trombina (DI NISIO, MIDDELDORP & BULLER, 2005)

1.2.2 Fibrinólise

Fibrinólise é o processo proteolítico no qual plasmina é gerada com a função de degradar o polímero de fibrina durante a remoção do coágulo sanguíneo. Plasmina é gerada via ativação do zimógeno plasminogênio pelo ativador de plasminogênio tecidual tPA (tPA- *tissue plasminogen activator*) ou pelo ativador de plasminogênio do tipo urinário uPA (uPA- *uroquinase plasminogen activator*) (VAN ZONNEVELD, VEERMAN & PANNEKOEK, 1986).

O t-PA é uma serino-protease liberada pelo endotélio vascular que funciona como um ativador chave de fibrinólise quando há depósito de fibrina dentro do vaso. A u-PA é uma serino protease liberada pelas células epiteliais dos ductos excretórios com a finalidade de manter a luz dos ductos livres dos depósitos de fibrina, permitindo assim o fluxo dos fluidos secretados. Entretanto, ela também é liberada pelo endotélio vascular e pelos macrófagos

(RAPAPORT, 1987). Ambos ativadores de plasminogênio podem ser inibidos por inibidores de serino proteases, como PAI-1 (PAI-1 *inhibitor plasminogen type 1*), PAI-2 (PAI-2 *inhibitor plasminogen type 2*) e neuroserpina (VAN ZONNEVELD, VEERMAN & PANNEKOEK, 1986).

Uma importante via de regulação de geração de plasmina se dá através do complexo trombina/trombomodulina, que apesar de ativar a fibrinólise através da proteína C ativada, também ativa um inibidor dessa via denominado inibidor da fibrinólise ativado por trombina TAFI (TAFI *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*).

Um dos fragmentos formados com a degradação da fibrina são os D-Dímeros, também chamados de produtos de degradação da fibrina (FgDP- *Fibrinogen degradation products*) (KNOWLSON et al, 2010).

Figura 3. Esquema ilustrativo do controle do sistema fibrinolítico (FRANCO , 2001).

Assim, sob condições fisiológicas, o sistema hemostático é balanceado por uma inter-relação de proteínas pró-coagulantes, anticoagulantes e do sistema fibrinolítico presentes no plasma (ROSING et al., 2001).

1.3 Tromboembolismo

Tromboembolismo venoso é um termo utilizado tanto para caracterizar trombose em veias profundas como para embolismo pulmonar. Geralmente se desenvolve nas veias da perna e o coágulo inicialmente formado é composto por células vermelhas e fibrina (MACKMAN, 2008; EPPIHIMER & SCHAUB, 2000).

A formação do coágulo obstrutivo que define a trombose venosa é produto final de um balanço inadequado entre os fatores pró- coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticos (ROSENDAAL,2005).

Trombose venosa é uma doença grave que afeta um em cada 1000 indivíduos anualmente (DAHLBACK, 2008). Em 1856, Virchow discutiu três categorias distintas de fatores que contribuem para o tromboembolismo venoso e embolismo pulmonar, incluindo alterações na coagulabilidade sanguínea, mudanças na constituição da parede do vaso e estase (VIRCHOW, 1856). Os fatores circunstanciais que aumentam o risco de trombose incluem a idade, imobilização, cirurgia, gravidez, contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e condições inflamatórias (DAHLBACK, 2008).

Coincidentemente, logo após o surgimento dos contraceptivos orais (1960), foi descoberto o primeiro caso de embolia pulmonar (1961) em uma enfermeira que estava sob tratamento para endometriose (JORDAN, 1961). Em 1998 o Comitê da Organização Mundial da Saúde, e outros, concluíram que as usuárias de contraceptivos hormonais orais possuem risco de três a seis vezes maior de desenvolver trombose em relação as que não fazem uso do medicamento (WHO, 1998; VAN HYLCKAMA et al.,2009). Neste último estudo foi ainda demonstrado que os COCs de terceira geração aumentam 2 vezes o risco de desenvolver trombose em relação aos de segunda geração e, os que contêm acetato de ciproterona e drospirenona aumentam seis vezes a chance de desenvolver trombose em relação ao grupo controle. Também foi demonstrado que o risco de desenvolvimento de trombose está associado com a dose de estrógeno e o tempo de uso do medicamento. Contraceptivos contendo 20µg de estradiol demonstraram uma diminuição no risco de trombose comparado com os que contêm 50µg de estradiol e ficou comprovado também que o risco é maior nos três primeiros meses de uso. O estrógeno induz a síntese de proteínas hepáticas como fatores da coagulação e fibrinólise (LINDBERG et al., 1989; TOY et al., 1979 ; WIEGRATZ et al., 2004).

Um estudo realizado por Middelorp e colaboradores (MIDDELDORP et al.,2000) demonstrou que os níveis de protrombina, fatorVII e fator V estavam significativamente mais elevados em usuárias de contraceptivos de terceira geração em relação as que faziam uso de contraceptivo de segunda geração, o que está moderadamente associado à trombose (POORT et al.,1996; KRAAIJENHAGEN et al., 2000;. BANK et al.,2005). O uso de contraceptivos hormonais também reduz os níveis plasmáticos de proteína S, um cofator para ativação da proteína C (TANS et al., 2000). Mudanças no sistema de fibrinólise sugerem que a atividade fibrinolítica do inibidor da fibrinólise ativado por trombina (TAFI) está aumentada

em mulheres que fazem uso de contraceptivos orais. A elevação nos níveis de TAFI está associada ao risco de desenvolvimento de trombose (VAN TILBURG, ROSENDAAL & BERTINA, 2000).

Inicialmente acreditava-se que o estrógeno era o único responsável pelo desenvolvimento de trombose em usuárias de contraceptivos combinados orais. Mas a partir de 1990, com o aumento na incidência de trombose induzida por contraceptivos contendo a mesma dose de estrógeno e diferentes progestágenos, foi possível observar que o efeito hipercoagulante do contraceptivo não é estritamente dependente da dose de estrógeno, mas da “estrogenicidade total” da formulação (ODLIND et al., 2002 ;KEMMEREN et al., 2004).

Progesteronas capazes de diminuir a estrogenicidade da formulação são mais eficientes em contrabalancear os efeitos trombóticos do estrógeno.

Tendo em vista que, pelo menos 10 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 100 milhões de pessoas no mundo fazem uso de contraceptivos combinados orais (GOLDHABER, 2010), e que o risco de desenvolvimento de trombose venosa aparece aumentado em 3 a cada 4 usuárias do contraceptivo (KEMMEREN, ALGRA & GROBBE⁶⁷, 2001; PETITTI, 2003), se faz necessário um estudo minucioso sobre os efeitos destes medicamentos na hemostasia, principalmente em relação aos contraceptivos de quarta geração que foram recentemente lançados no mercado. Efeitos colaterais induzidos pelo uso do medicamento, principalmente trombose, devem ser levados em consideração no momento da escolha da formulação que mais se adapta às necessidades e ao histórico da paciente.

1.4 Moléculas de adesão

Dentre as mais importantes moléculas de adesão estão dois membros da família das selectinas, E- selectina e P - selectina, assim como as moléculas de adesão intercelular (ICAM- *intercellular adhesion molecule*), e moléculas de adesão vascular (VCAM - *vascular cell adhesion molecule*) (LEY, 1996). Selectinas são glicoproteínas transmembrana com domínios extracelulares homólogos que induzem o rolamento dos leucócitos e que interagem a carboidratos (HUO & LEY, 2001). P-selectina (CD62P) está localizada no interior dos grânulos de Weibel- Palade das células endoteliais e nos grânulos alfa das plaquetas. Esta selectina pode ser rapidamente translocada para a superfície das células em resposta a um estímulo pró-inflamatório (TEDDER et al., 1995). E-selectina (CD62E) é sintetizada e

exportada para a superfície endotelial em situações inflamatórias (BEVILACQUA et al., 1987).

As integrinas também são mediadores de adesão e transmigração de leucócitos para a parede vascular. As moléculas de adesão intercelular, ICAM, são expressas em baixos níveis, ao passo que as moléculas de adesão vascular, VCAM, são expressas constitutivamente por células endoteliais ativadas e por células dendríticas foliculares (COLLINS et al., 2000).

A avaliação do papel das moléculas de adesão demonstra existir uma interação muito próxima entre inflamação e o sistema de coagulação, além de uma cooperação bidirecional entre estes mecanismos propostos (ESMON, 2005; LEVI & VAN DER POOL, 2005). Altos índices de expressão das moléculas de adesão têm sido descritos em doenças como diabetes (JILMA et al., 1996 ; KIRK et al., 1997), aterosclerose (IKEDA et al., 1994), e desordens trombóticas (CHONG et al., 1994).

O evento inicial da aterosclerose é o dano ao endotélio, que pode ser causado por vários fatores como lipoproteínas oxidadas, hipertensão e tabagismo. O LDL (LDL- *low density lipoprotein*) oxidado estimula a produção de moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão, como ICAM-1, VCAM-1, E e P selectinas, que atraem os monócitos para adesão ao endotélio e diferenciação em macrófagos, que fagocitam e digerem o LDL oxidado. O LDL oxidado não digerido pelos macrófagos é acumulado intracelularmente por este tipo celular transformando-os em células espumosas (BAYNES & DOMINICZAK , 2000; LUSIS, 2000 ; COLACURCI et al., 2005).

Figura 4. Expressão de moléculas de adesão no endotélio e formação de células espumosas (ROCHA & LIBBY, Nature Reviews Cardiology, 2009).

O acúmulo de LDL no interior das células espumosas culmina na morte destas e como consequência a liberação dos lipídios formadores de “placas” na parede do vaso (BAYNES & DOMINICZAK, 2000; LUSIS, 2000; COLACURCI et al., 2005). O crescimento destas placas pode resultar no crescimento de uma capa fibrosa propensa a fissuras, rupturas ou erosão, culminando em manifestações clínicas de doenças cardiovasculares incluindo angina e infarto do miocárdio. A ruptura da placa aterosclerótica é geralmente acompanhada por adesão plaquetária, levando a formação de trombos vasculares que podem resultar em oclusão parcial ou completa (LIBBY, 2008). Podemos assim dizer que, os fatores hemostáticos se encontram envolvidos desde as fases iniciais do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, contribuem para a progressão do espessamento da placa e podem conduzir a consequências deletérias na presença de um quadro de hipercoagulabilidade (STEGNAR et al., 2004).

A forma solúvel dessas moléculas de adesão celular (CAMs-*cell adhesion molecules*) encontradas no plasma são consideradas marcadores para aterosclerose e doença cardiovascular (HWANG et al., 1997; RIDKER et al., 1998). O estrógeno, presente na Terapia de Reposição hormonal (TRH) e nos contraceptivos hormonais combinados orais, aumenta a liberação de moléculas anti-aterogênicas derivadas do endotélio como óxido nítrico (CAULIN-GLASER et al., 1997) e reduzem a expressão de moléculas de adesão envolvidas nas interações endotélio-leucócitos induzidas por citocinas, indicando seu importante papel anti-aterogênico através da regulação da função das células endoteliais (DE CATERINA et al., 1995). Segundo Farzati e colaboradores a redução nos níveis de expressão das moléculas de adesão solúveis V-CAM-1, ICAM-1, P-selectina e E-selectina podem promover uma proteção direta contra aterosclerose. Ainda, neste estudo foi observado que a TRH, a longo prazo, pode diminuir a expressão das moléculas de adesão E-selectina e P-selectina, reduzindo desta maneira a adesão dos leucócitos ao endotélio. Esta informação reforça a hipótese de que a TRH pode reduzir o risco de aterosclerose através de mudanças endoteliais benéficas (FARZATI et al., 2002). Apesar destes efeitos benéficos conferidos pelo estrógeno, estudos sugerem que a progesterona sintética pode contrariar este efeito favorável do estrógeno, causando um aumento nos níveis destas moléculas de adesão (MIYAGWA et al., 1997). O impacto dos contraceptivos orais nos níveis das moléculas de adesão ainda é controverso. Alguns trabalhos reportam que o uso de contraceptivos pode aumentar (TATSUMI et al., 2002), reduzir (HEMELLAR et al., 2005; SEEGER et al., 2002) ou não alterar a expressão destas moléculas (KERNOHAN et al., 2004). Diante disto, este trabalho possui como um de seus objetivos quantificar moléculas de adesão no plasma de pacientes

que fazem uso de contraceptivos combinados orais contendo progesteronas de segunda e terceira geração.

1.5 Lipídios

Os lipídios são compostos altamente energéticos que desempenham diversas funções biológicas. Além de compor a membrana biológica, também atuam como co-fatores enzimáticos, transportam elétrons, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares.

Podemos dividir os lipídios em ácidos graxos, triglicerídeos e colesterol. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas que quando oxidadas fornecem energia. Os triglicerídeos são constituídos de moléculas de ácidos graxos e glicerol. O colesterol é formado a partir da acetil Coenzima A em uma série de complexas reações, sendo um importante constituinte de membranas celulares, precursor de hormônios esteróides e vitamina D (NELSON & COX, 2000).

O colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos e os fosfolipídios precisam ser transportados do fígado, local onde são sintetizados, ou do intestino, local onde são absorvidos, para os tecidos onde serão armazenados e consumidos. Esse transporte é realizado pelas lipoproteínas plasmáticas. As Lipoproteínas são constituídas por uma camada externa de fosfolípides, apolipoproteínas e colesterol solúvel e por um núcleo interno que transporta colesterol esterificado (não solúvel) e triglicerídeos (LUND-KATZ & PHILLIPS, 2010).

As quatro principais classes de lipoproteínas são: quilomícrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL- *Very Low Density lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL- *Low Density Lipoprotein*) e lipoproteína de alta densidade (HDL- *High Density Lipoprotein*). Os quilomícrons são partículas grandes produzidas pelo intestino, ricas em triglicerídeos e pobres em colesterol livre e fosfolípides. São responsáveis pelo transporte de ácidos graxos obtidos na dieta para os tecidos onde serão armazenados e consumidos (BACHORIK, RIFKIND & KWITEROVICH, 1999).

Em uma dieta rica em ácidos graxos ou carboidratos, estes serão convertidos em triglicerídeos no fígado e unidos a apolipoproteínas específicas (apoB-100, apoC-II, apoE) para formar as partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). As partículas de VLDL são ricas em triglicerídeos e partem do fígado para o tecido adiposo, onde a apoC-II ativa a lipase protéica provocando a liberação de ácidos graxos. Quando a VLDL perde os triglicerídeos converte-se em lipoproteína de baixa densidade (LDL). A LDL transporta o

colesterol para os tecidos que possuem receptores de superfície específicos para apoB-100, sua principal apolipoproteína (NELSON & COX, 2000).

A HDL contém altos níveis de moléculas antioxidantes, como PON1(PON 1-*paraoxonase-1*) e LCAT (LCAT-*lecithin-cholesterol acyltransferase*). Aproximadamente 40-60% da molécula de HDL é composta por lípides como colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos e triglicérides. As proteínas do HDL incluem apo A-I (aproximadamente 70%), apo A-II (20%), e outras lipoproteínas e enzimas (10%). A Apo B não está presente no HDL; pelo contrário, a única apolipoproteína associada ao LDL é a Apo B (LUND-KATZ & PHILLIPS, 2010). O HDL transporta o colesterol dos tecidos periféricos até o fígado onde ele pode ser convertido em ácido biliar e excretado pela bile (STECK & LANGE, 2010).

Estudos epidemiológicos realizados nas últimas cinco décadas têm demonstrado que os níveis de HDL colesterol estão inversamente relacionados com os eventos clínicos que predispõe aterosclerose, enquanto os níveis de LDL colesterol estão diretamente relacionados ao acontecimento deste evento (GORDON et al., 1977; LEWINGTON et al., 2007; DI ANGELANTONIO et al., 2009; WAN DER STEEG et al., 2008).

O HDL protege contra doenças cardiovasculares através da regulação do efluxo de colesterol dos tecidos e modulação da inflamação. Também pode remover o colesterol dos macrófagos, o qual acredita-se ser um dos mecanismos pelos quais esta molécula pode proteger contra aterosclerose (BALDÁN, BOJANIC & EDWARDS, 2009; YVAN-CHARVET, WANG & TALL, 2010)

Outras propriedades incluem seus efeitos antioxidantes e vasoprotetores (NAVAB et al., 2011).

Figura 5. Esquema representativo das inúmeras funções da lipoproteína HDL. (NAVAB, M., et al. Nature Reviews Cardiology.2011).

Mulheres na premenopausa possuem um perfil lipídico plasmático menos próaterogênico do que os homens. Especificamente, as mulheres possuem um nível mais elevado de HDL colesterol e um nível menor de LDL, VLDL colesterol e triglicerídeo total plasmático do que homens na mesma faixa etária. Essas diferenças nas concentrações de lipídios e lipoproteínas plasmáticas encontradas entre homens e mulheres ocorrem devido ao efeito cardioprotetor conferido pelo hormônio feminino estrógeno (ABBOT et al., 1983; MAGKOS & MITTENDORFER, 2009; COUILLARD et al., 1999; HORTON et al., 2002).

O estrógeno reduz a lipase triglicerídea hepática, a qual degrada HDL, estimulando a produção de HDL colesterol e da apolipoproteína A-I (KNOPP, ZHU & BONET, 1994). Estes efeitos resultam em um decréscimo nos níveis de colesterol total e de LDL colesterol e aumento dos níveis de HDL colesterol (WRITING GROUP FOR PEPI TRIAL, 1995).

A diminuição nos níveis de LDL colesterol e o aumento no HDL colesterol podem proporcionar um ambiente antitrombótico. Isso ocorre pois moléculas de LDL oxidadas em grandes concentrações são capazes de ativar o endotélio. A ativação endotelial leva a expressão de moléculas como fibronectina, ICAM-1, P-selectina, E-selectina, integrina $\alpha\beta_3$ e fator de Von Willebrand (vWF- *Von Willebrand factor*) na superfície endotelial, o que promove adesão e ativação plaquetária. A adesão plaquetária é conduzida principalmente pela interação entre o vWF e o colágeno exposto no endotélio (colágeno tipo I e tipo III). A ligação do vWF ao colágeno permite a interação entre o vWF com receptores glicoprotéicos das plaquetas (complexo plaquetário GPIb/IX/V) (BADIMON, STOREY & VILAHUR, 2011).

Uma vez ativadas, as plaquetas mudam sua conformação expondo uma superfície pró-coagulante e liberando seus grânulos, os quais contêm proteínas de adesão (fibronectina, fibrinogênio, vitronectina e P-selectina), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas), quimiocinas, citocinas e fatores de coagulação (fator V, fator XI, inibidor de plasminogênio tipo I, plasminogênio e proteína S). A estrutura dimérica do fibrinogênio permite a interação entre duas plaquetas ao mesmo tempo, favorecendo a agregação plaquetária (PARISE, SMYTH & COLLIER, 2005).

Figura 6. Etapas da ativação endotelial (adesão, ativação e agregação plaquetária) decorrente do acúmulo de LDL oxidada (BADIMON, STOREY & VILAHUR. Thrombosis and Haemostasis, 2011).

Além da ativação da via extrínseca da coagulação pelo fator tecidual presente na placa aterosclerótica e no endotélio, a disfunção endotelial e ativação plaquetária provocadas pelos altos níveis de LDL também promovem a cascata da coagulação e a subsequente formação de fibrina. As plaquetas ativadas externalizam fosfatidilserina, a qual, juntamente com o vWF é responsável pela ativação do fator IX a, o qual se liga ao seu cofator VIIIa, formando o complexo (IXa-VIIIa). Este complexo ativa o FX, formando o complexo protrombinase Xa-Va, o qual converte a protrombina em trombina levando a ativação da via intrínseca da coagulação (DAHLBACK, 2008).

Figura 7. Esquema ilustrativo da ativação e propagação da coagulação (Extraído de DAHLBACK. Blood. 2008; Ilustrado por Marie Dauenheimer).

Como vimos o estrógeno desempenha um papel cardioprotetor importante aumentando a concentração plasmática de HDL, mas por outro lado, a progesterona pode exercer uma influência adversa no metabolismo dos lipídios. Isto se deve em partes a sua habilidade em contrabalancear os efeitos benéficos do estrógeno nos níveis de LDL e HDL colesterol (HEDON, 1990; KRAUSS & BURKMAN, 1992; GASPARD, 1987; BURKMAN, 1993).

Progesteronas administradas sozinhas ou combinadas com estrógeno podem reduzir a concentração plasmática de triglicerídeos, assim como também podem diminuir a concentração plasmática de HDL colesterol em mulheres na pré e pós menopausa (GODSLAND, 2001; CROOK, 1998; WALSH & SACKS, 1993; WOLFE & HUFF, 1989; WOLFE & HUFF, 1995; WOLFE et al., 2000; DUVILLARD et al., 2010). O efeito hipotriglicêmico da progesterona é mediado pelo aumento do *clearance* plasmático realizado pela VLDL rica em triglicerídeos e pela VLDL Apo B-100, ao passo que, a diminuição do HDL está possivelmente associado com uma diminuição na produção da apolipoproteína A-I da HDL (LAMON – FAVA et al., 2006).

Progestágenos androgênicos, derivados da testosterona, são os que possuem maior interferência nas alterações benéficas do estrógeno sobre o perfil lipídico, pois promovem uma reversão no aumento do HDL devido a um aumento na atividade das lipases hepáticas (CROOCK et al., 1992).

Diante destas informações, outro enfoque deste trabalho foi quantificar as lipoproteínas HDL, LDL, VLDL, assim como os níveis de colesterol total e triglicérides no soro de mulheres usuárias de contraceptivos combinados orais contendo progesteronas de segunda e quarta geração.

2. Objetivos

2.1 Gerais

Avaliar os efeitos de três formulações de contraceptivos hormonais orais contendo 3000µg Drospirenona combinada com 30 e 20µg Etinilestradiol e 150µg Levonorgestrel combinado com 30µg de Etinilestradiol nos parâmetros hemostáticos, lipídicos e na concentração plasmática de moléculas de adesão e compará-los com um grupo controle constituído por pacientes não usuárias de COC.

2.2 Específicos

Avaliar o efeito de três formulações diferentes de contraceptivos hormonais sobre:

a) Avaliação da hemostasia dos quatro grupos de pacientes:

- fatores pró-coagulantes: tempo de protrombina (TP); tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA); concentração plasmática de fibrinogênio; atividade dos fatores VII e XII;
- fatores anticoagulantes: atividade da anti-trombina; concentração plasmática das proteínas C e S;
- marcador da coagulação: concentração plasmática do fator 1+2 (F1+2);
- degradação de fibrina: concentração de D-dímeros;
- fator anti-fibrinolítico: PAI-1

b) avaliação da concentração plasmática de moléculas de adesão dos quatro grupos de pacientes

- níveis plasmáticos das moléculas de adesão: VCAM, ICAM e E - selectina

c) avaliação do perfil lipídico dos quatro grupos de pacientes:

- quantificação sérica de colesterol total, LDL, HDL, VLDL e triglicérides

3. Materiais e Métodos

3.1 Protocolo clínico

Participaram deste estudo 70 mulheres voluntárias saudáveis, discentes da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto e usuárias do setor de Ginecologia e Obstetrícia da Unidade Básica de Saúde Cuiabá – Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP). O presente projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (anexo 1) e do Secretário de Saúde de Ribeirão Preto, possibilitando a coleta na Unidade Básica de Saúde do Cuiabá (anexo2). As amostras de sangue foram obtidas das voluntárias após terem tomado conhecimento e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo3) para participarem da pesquisa e respondido a um questionário (anexo 4).

Os grupos foram estabelecidos de acordo com o uso ou não de contraceptivos e o componente hormonal da formulação. As 80 voluntárias foram divididas em quatro grupos, de 20 mulheres/grupo, sendo um grupo controle, que não faz uso de contracepção hormonal, e os outros três grupos fazendo uso de formulações distintas de contraceptivo, a saber:

- Grupo I: controle, não faz uso de contraceptivo hormonal;
- Grupo II: contraceptivo oral de dose diária, 3000µg drospirenona (DRSP) + 30µg etinilestradiol (EE) / comprimido – Yasmin e Elani Ciclo ®
- Grupo III: contraceptivo oral de dose diária, 3000µg drospirenona (DRSP) + 20µg de etinilestradiol (EE) / comprimido – Yaz®
- Grupo IV: contraceptivo oral de dose diária, 150µg levonorgestrel (LNG) + 30µg etinilestradiol (EE) / comprimido – Ciclo 21, Nociclin, Gestrelan, Nordette, Ciclofemme, Microvlar®

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados:

- Idade entre 18 e 30 anos;
- Índice de massa corporal $\leq 30\text{kg/m}^2$.
- Hábitos de vida e dieta saudáveis
- Não fumantes;
- Ausência de gravidez ou uso de contraceptivo hormonal por pelo menos 6 meses;
- Para o grupo controle: não estar fazendo uso de contraceptivo hormonal há mais de 6 meses;

- Interrupção do uso de medicamentos antiinflamatórios e/ou drogas que influenciam na coagulação pelo menos 15 dias antes das coletas de sangue;

Dessa forma, foi possível avaliarmos os efeitos das três formulações distintas de contraceptivos acima apresentados, comparando diferentes dosagens do estrógeno com o mesmo tipo de progesterona (Grupo II e Grupo III) e diferentes tipos de progesterona com a mesma dosagem de estrógeno (Grupo II e Grupo IV).

Foram coletadas amostras de sangue das voluntárias sempre pela manhã (entre 8 e 10 horas) por pessoa treinada para tal função. As voluntárias se apresentaram com jejum alimentar de 8 horas e estando fora do período menstrual no dia da coleta.

As amostras de sangue venoso foram obtidas por punção venosa na região da fossa cubital com o uso de escalpe e agulha calibre 23 G. Foi coletado um total de 24mL de sangue das voluntárias. Cada amostra de sangue será distribuída da seguinte maneira:

- a) 8mL de sangue em tubo contendo anticoagulante Alséver para os testes de quimioluminescência dos neutrófilos;
- b) 8mL de sangue em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro para as dosagens do perfil lipídico
- c) 8mL de sangue em tubo com o anticoagulante citrato de sódio para obtenção de plasma e realização dos testes de hemostasia e determinação das moléculas de adesão.

As amostras apresentadas no item a) foram analisadas em um outro projeto de pesquisa.

A distribuição do material coletado foi obedecida segundo a ordem apresentada acima, reservando-se a amostra do item c) para as avaliações da hemostasia e moléculas de adesão. Através deste procedimento evitamos trabalhar com o material biológico no qual a cascata da coagulação-fibrinólise estivesse ativada. As amostras de sangue venoso foram dispensadas em tubo de polietileno contendo anticoagulante citrato de sódio (10mM) e centrifugadas sob refrigeração por 25 minutos à 3000g para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. O plasma foi alíquotado em tubos de polietileno e armazenado à -70°C por um período máximo de seis meses. Para a realização das análises as amostras foram descongeladas rapidamente à 37°C em banho-maria.

3.2 Avaliação da coagulação e fibrinólise

As determinações dos parâmetros hemostáticos das voluntárias foram realizadas concomitantemente para minimizar a interferência das variações interensaios na comparação dos resultados.

3.2.1 Parâmetros pró-coagulantes

- a. Determinação do Tempo de Protrombina (TP) através do *kit* Triniclot PT Excel S (Trinity Biotech - Irlanda).
- b. Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) através do *kit* Triniclot APTT S (Trinity Biotech -Irlanda)
- c. Determinação da concentração plasmática de fibrinogênio, pelo método de Clauss, com o uso do *kit* Triniclot Fibrinogen (Trinity Biotech-Irlanda)
- d. Determinação das atividades dos fatores VII e XII através de plasmas deficientes em fatores, utilizando os reagentes Factor VII Deficient Plasma e Factor XII Deficient Plasma, respectivamente (Trinity Biotech-Irlanda).

As determinações citadas foram realizadas empregando o equipamento Coagulômetro STart DIAGNOSTICA STAGO, sistema aberto, automatizado para testes de coagulação com detecção foto-ótica do coágulo. O controle de qualidade destes testes foi feito através da utilização de plasma controle normal Verify 1 e de referência Verify Reference (BioMerieux-EUA).

3.2.2 Parâmetros anticoagulantes

- a. Determinação da atividade da antitrombina por método cromogênico, através do *kit* Berichrom Antitrombina III (Siemens-Alemanha) no equipamento BCS®XP system alocado da empresa Labpack.
- b. Determinação das concentrações plasmáticas de proteína C e proteína S total através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), com o uso dos *kits* Protein C e Protein S, respectivamente (Helena Laboratories).

Estas determinações foram realizadas empregando-se o equipamento μ Quant da Biotek.

3.2.3 Parâmetro marcador da coagulação

A determinação das concentrações plasmáticas do fator 1+2 (F1+2) foi feita por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se o *kit* Enzygnost® F1+2 micro (Siemens-Alemanha). A leitura do resultado foi realizada em equipamento μ Quant da Biotek.

3.2.4 Parâmetro fibrinolítico

A determinação de D-dímeros foi feita por meio de ensaio turbidimétrico que utiliza partículas de látex revestidas de anticorpo monoclonal anti D-dímeros. Tais partículas se agregam na presença de D-dímeros resultando em maior turbidez da amostra. Esta determinação foi realizada com o uso do *kit* e do equipamento VIDAS® D-Dimer Exclusion (BioMérieux França).

3.2.5 Parâmetro anti-fibrinolítico

A atividade de PAI-1 foi determinada por método cromogênico, através do *kit* Berichrom PAI-1 (Siemens - Alemanha) no aparelho BCS®XP system alocado da empresa Labpack.

3.3 Parâmetro moléculas de adesão

Os níveis plasmáticos das moléculas de adesão (VCAM, ICAM e E - selectina) foram determinados através de kit de ELISA comercialmente disponível (R & D Systems Quantikine, Minneapolis, MN), nas amostras coletadas com o anticoagulante citrato de sódio e armazenadas a - 70° C até as dosagens, realizadas no μ Quant da Biotek.

3.4 Parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos dosados através do soro, em aparelho automatizado BT 3000 plus Wiener Lab® foram:

- Colesterol total, HDL colesterol e triglicerídeos através de reação enzimática pelo método de Trinder utilizando o *Kit* Wiener lab (Rosario- Argentina).

Os níveis de LDL colesterol foram calculados pela fórmula de Friedewald: [LDL-colesterol] = [colesterol total] – [HDL colesterol] - [triglicerídeos] /5.

Os níveis de VLDL-colesterol foram calculados pela fórmula: [VLDL] = [triglicerídeos] /5 (BACHORIK, 1999).

3.5 Análises Estatísticas

Considerando que o experimento não seguiu um esquema tradicional de aleatorização, foram comparadas as médias e as variâncias populacionais das variáveis idade e IMC entre os quatro grupos de voluntárias. Primeiro, utilizou-se o teste de Levene para a comparação entre as variâncias. Quando detectadas diferenças entre as variâncias, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de WELCH, 1947 para a comparação entre as médias populacionais. Caso contrário, utilizou-se a ANOVA tradicional. Para a comparação das frequências de prática de exercício físico e histórico familiar de trombose entre os grupos, utilizou-se o teste exato de Fisher.

Para a comparação das médias populacionais das variáveis associadas aos parâmetros pró-coagulantes, marcador da coagulação, anticoagulantes, fibrinolítico e antifibrinolítico, entre os quatro grupos de voluntárias, foi utilizada uma análise de covariância (ANCOVA) (HUITEMA, 1980), que considerou ajustes por possíveis efeitos de interferência da idade, IMC, prática de exercícios físicos e histórico familiar de trombose. A ANCOVA considera um modelo de regressão linear, com o pressuposto de que os resíduos possuem distribuição normal com média igual a zero e variância constante. Para a verificação do pressuposto de normalidade dos resíduos, foram utilizadas ferramentas gráficas, como o gráfico de probabilidades normais (*quantile-quantile plots*). Nas situações onde a normalidade dos resíduos não foi atingida, aplicou-se uma transformação em logaritmos (BLAND & ALTMAN, 1996) na variável dependente do modelo e realizou-se outro ajuste com nova verificação do

pressuposto. Para as comparações múltiplas entre os grupos, utilizou-se o teste de Bonferroni (BLAND & ALTMAN, 1995).

Para auxiliar a descrição dos dados segundo os grupos, foram construídos *box-plots* (WILLIAMSON et al., 1989) para variáveis de interesse, onde as diferenças entre grupos classificadas como significativas pelo teste de Bonferroni foram representadas por linhas horizontais na parte superior das figuras.

Para as análises onde não foi possível assumir uma distribuição normal (parâmetros bioquímicos) utilizamos o teste não paramétrico de Kruskal Wallis (CONOVER, 1980).

Em todas as análises, foi utilizado o procedimento PROC GLM do programa SAS versão 9, e considerou-se um nível de significância de 5%.

Todas as análises estatísticas deste projeto foram realizadas pela equipe do Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez (FMRP-USP).

ADENDO: os valores individuais obtidos com a quantificação correspondente a cada parâmetro avaliado neste estudo encontram-se disponíveis para visualização no anexo 5.

4. Resultados e Discussão

4.1 Características das participantes

Foram coletadas amostras de sangue de 70 pacientes. As pacientes pertencentes aos grupos controle, II e III foram recrutadas no Sistema Integrado de Saúde da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto, ao passo que as pacientes do grupo IV são pacientes da rotina do setor de Ginecologia e Obstetrícia da Unidade Básica de Saúde Cuiabá – Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP).

Desta forma o grupo I (controle) possui 20 participantes, o grupo II (EE 30µg /DRSP 3000µg) possui 20 participantes, o grupo III (EE 20µg/DRSP 3000µg) 16 participantes e o grupo IV (EE 30µg/LNG 150µg) 16 participantes, sendo duas delas excluídas do estudo.

Na tabela abaixo (tabela 1) podemos observar a média da idade, IMC, frequência da prática de exercícios físicos e histórico familiar de trombose das participantes.

Tabela 1 – Comparações das características das participantes ($n = 70$) entre os quatro grupos em estudo.

Variável	Controles ($n = 20$)	Grupo II ($n = 20$)	Grupo III ($n = 16$)	Grupo IV ($n = 14$)	Valor p
Idade (anos) média(dp)	26,3 (2,5)	24,5 (2,7)	24,2 (3,4)	26,9 (5,1)	<0,01 ^(a) 0,07 ^(b)
IMC (kg/m ²) média(dp)	22,4 (2,9)	22,7 (2,8)	21,7 (2,3)	23,7 (3,3)	0,47 ^(a) 0,29 ^(c)
Exercícios físicos n (%)	6 (30%)	10 (50%)	4 (25%)	1 (7%)	0,06 ^(d)
Histórico familiar de trombose n (%)	7 (35%)	6 (30%)	5 (31%)	4 (29%)	1,00 ^(d)

(a) Comparação entre variâncias populacionais, teste de Levene.

(b) Comparação entre médias populacionais, ANOVA de Welch.

(c) Comparação entre médias populacionais, ANOVA.

(d) Comparação entre proporções, teste exato de Fisher.

Na Tabela 1, observa-se evidência de que a idade das voluntárias tem médias aproximadas entre as populações de interesse ($p=0,07$), mas variâncias diferentes ($p<0,01$). Observa-se uma maior dispersão da idade no Grupo IV, o que é evidente no gráfico1 (painel (a)).

Gráfico 1 – *Box-plots* para a idade (a) e IMC (b) das pacientes, em relação aos grupos.

É possível notar que as pacientes dos grupos II(DRSP/30EE) e III(DRSP/20EE) possuem uma média de idade bem próxima (24,5 e 24,2 respectivamente), o mesmo acontece para as pacientes dos grupos I (controle) e IV(LNG/30EE) (26,3 e 26,9 respectivamente).

Apesar das pacientes com a menor média de idade pertencerem ao grupo III, concluímos que as pacientes mais jovens e também as mais velhas encontram-se no grupo IV devido à maior variância encontrada.

Coincidentemente, também foi encontrado no grupo IV uma média maior no índice de massa corporal (23,7) e um valor menor deste parâmetro (21,7) nas pacientes do Grupo III.

Com relação à frequência na prática de exercícios físicos, o questionário respondido pelas pacientes aponta que 50% das voluntárias do grupo II praticam exercício pelo menos 3 vezes por semana. É interessante notar que embora as pacientes do grupo III possuam o menor IMC dentre os grupos somente 25% das participantes praticam atividades físicas. Desta forma podemos sugerir que neste estudo a variável idade possui maior influência no IMC do que a prática de exercícios físicos. Somente 7% das voluntárias do grupo IV praticam atividades físicas, o que também está associado a um maior IMC. Ressaltamos que variáveis como, idade, índice de massa corporal e prática de exercícios físicos estão mais acentuados nas pacientes do grupo IV.

A avaliação da variável referente ao histórico familiar de trombose demonstrou que as pacientes do grupo I possuem uma maior incidência de desordens trombóticas na família

(7%), ao passo que as pacientes do grupo IV relataram uma menor incidência desta variável (4%), apesar dos dados anteriormente citados.

4.2 Influências dos contraceptivos orais na hemostasia

4.2.1 Efeitos pró - coagulantes

Os parâmetros hemostáticos pró - coagulantes analisados foram: Tempo de Protrombina (TP); Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA); atividades dos fatores VII e XII; concentração plasmática de Fibrinogênio e marcador da geração de Trombina através dos níveis do Fator 1+2.

No modelo clássico da coagulação, descrito em 1964 por Macfarlane (MACFARLEANE, 1964) e por Davie e Ratnoff (DAVIE & RATNOOF, 1964), a coagulação é definida como uma cascata proteolítica que pode ser ativada por duas vias enzimáticas distintas e denominadas via extrínseca e via intrínseca.

O TP avalia a via extrínseca da coagulação (ou seja, fatores II, V, VII, X). A literatura aponta que o encurtamento desta prova favorece o estado pró-trombótico (VALERIE, 2009).

Na avaliação do Tempo de Protrombina (Gráfico 2) verificamos que as pacientes do grupo I (controle) possuem uma média de valor em segundos de TP significativamente maior (14,7) em relação às pacientes dos grupos II (DRSP/ 30EE; 12,6), III (DRSP/ 20EE; 12,2) e IV (LNG/ 30EE; 13,5), onde os valores encontrados para o Grupo IV são os que mais se aproximam aos do grupo I. Segundo instruções do fabricante (*Trinity Biotech - EUA*) o intervalo de referência foi definido em 12 a 18 segundos. Desta forma, apesar de todos os valores se encontrarem no intervalo de referência, notamos que as pacientes do Grupo III possuem o mais baixo valor de TP e as pacientes do Grupo IV o mais alto valor dentre os grupos de contraceptivos analisados. O decaimento nos valores de TP nos grupos II e III neste estudo estão de acordo com resultados publicados por KLUFT et al., 2006, o qual relatou uma diminuição para os valores de TP nos três grupos estudados em seu trabalho (DRSP/30EE; DRSP/20EE; DSG (desogestrel) /30EE) em relação ao grupo controle.

O resultado encontrado para o grupo IV reafirma a condição de ser este o contraceptivo mais seguro durante décadas (TEICHMANN & CORBIN, 1998; VAN HYLCKAMA et al., 2009). Van Hylckama e colaboradores analisaram recentemente a ocorrência de trombose em usuárias de contraceptivos de segunda, terceira e quarta geração e

encontraram uma menor incidência de trombose venosa profunda nas pacientes que faziam uso do contraceptivo de segunda geração.

Gráfico 2: *Boxplot* da variável TP das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 12 a 18 segundos.

O TTPA avalia a efetividade da via intrínseca da coagulação (Fatores XII, XI, IX e VIII) (VALERIE, 2009). Pesquisas têm associado o encurtamento do TTPA com o risco de ocorrência de trombose venosa (REDDY, HALL & MACKINTOSH, 1999; TRIPODI & MANNUCCI, 2006; BOBROW, 2005; SAULS et al., 2007; TRIPODI et al., 2004).

Na avaliação do TTPA (Gráfico 3) apesar de todas as médias dos valores encontrarem-se visualmente diminuídos nos três grupos de contraceptivos aqui estudados, em relação ao grupo I (controle) diferenças significativas foram encontradas somente na comparação do Grupo I com o Grupo III (DRSP/ 20EE). Para o grupo I foi encontrada uma média de valores de 31,5 e para o grupo III 29,2. O intervalo de referência estabelecido pelo fabricante (*Trinity Biotech - EUA*) é de 25 a 34 segundos. Apesar de ambos os valores se encontrarem dentro da faixa de referência, este decaimento significativo do TTPA do grupo III em relação ao grupo controle também foi demonstrado anteriormente por KLUFT et al., 2006, os quais também

encontraram uma diminuição nos valores de TTPA para os grupos estudados em seu trabalho (DRSP/30EE; DRSP/20EE; DSG/30EE) em relação ao grupo controle. MACHADO et al., 2010 também demonstraram um encurtamento do TTPA para DRSP/30EE em comparação com as pacientes não tratadas.

Gráfico 3: *Boxplot* da variável TTPA das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 25 a 34 segundos.

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática sintetizada exclusivamente pelo fígado. Os níveis plasmáticos de fibrinogênio estão diretamente relacionados ao risco cardiovascular, pois quando elevados aumentam a formação de trombos pela alteração cinética da cascata da coagulação, resultando em um aumento da formação de fibrina, aumento da agregação plaquetária e da viscosidade sanguínea. (CHANDLER et al., 2002; FRISHMAN., 1998; KANNEL, 2005; LIP, 1995).

Todos os grupos de contraceptivos analisados apresentaram um aumento na concentração plasmática de fibrinogênio em relação ao grupo I (controle), atentando para o grupo IV(LNG/30EE), o qual apresentou a menor média (290.6) dentre os três grupos de contraceptivos aqui estudados. Contudo, diferenças significativas foram observadas somente

entre as concentrações plasmáticas de fibrinogênio dos grupos I e III (DRSP/ 20EE) (Gráfico 4). Para o grupo I foi encontrada uma média de concentração de 254,5mg/dl, ao passo que para o grupo III verifica-se uma média de 302,6 mg/dl. Este aumento na concentração plasmática de fibrinogênio para o grupo III está de acordo com resultados publicados em estudo anterior por KLIPPING & MARR, 2005, os quais demonstraram um aumento na concentração plasmática de fibrinogênio em pacientes tratadas com DRSP/20EE em relação às pacientes não tratadas. As concentrações plasmáticas de fibrinogênio consideradas normais são de 175 a 400 mg/dl segundo instruções do fabricante (*Trinity Biotech-EUA*)

Gráfico 4: *Boxplot* da variável Fibrinogênio das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 175 a 400 mg/dl.

A via extrínseca da coagulação é iniciada pelo Fator tecidual (TF). Depois que a parede do vaso sanguíneo sofre uma injúria, o Fator Tecidual é exposto na superfície do endotélio lesado. A interação do Fator tecidual com o Fator VII do plasma ativa a cascata da coagulação, formando a trombina através da ativação de uma série de proenzimas (DI NISIO, MIDDELDORP, & BÜLLER, 2005).

Fator tecidual serve de cofator para a enzima FVIIa; o complexo TF-FVIIa ativa eficientemente o fator IX e o fator X (DAHLBACK., 2008). Um estudo recente demonstrou que os Contraceptivos (DSG/20EE, LNG/30EE ,CMA (acetato de clormadinona) /20EE) aumentam os níveis plasmáticos de fibrinogênio, protrombina, fatores da coagulação VII,VIII e X (WINKLER ,RÖHMB & HÖSCHENB., 2010), favorecendo o estado de hipercoagulabilidade.

Em nosso estudo (Gráfico 5) embora não tenham sido encontradas diferenças significativas na porcentagem de atividade do Fator VII entre os grupos, notamos que o grupo I (controle) e o grupo IV (LNG/30EE) possuem uma média de porcentagem de ativação com valores próximos, 120.1 e 133.4, respectivamente; já nos grupos II e III deste estudo (DRSP/30EE, DRSP/20EE) notamos um aumento na média de porcentagem de ativação do Fator VII, 150.3 e 150.2 respectivamente. Nossos resultados apontam novamente que o grupo IV também na análise do fator VII possui uma menor alteração, o que implica em um menor efeito procoagulante em relação aos demais contraceptivos aqui avaliados. FERREIRA et al ,2001 também encontraram um aumento na porcentagem de ativação Fator VII em pacientes tratadas por 6 meses com contraceptivo contendo DSG/30EE e KLIPPING & MARR., 2005, também encontraram um aumento deste parâmetro para DRSP/20EE e DSG/20EE em relação as pacientes não tratadas.

Gráfico 5: *Boxplot* da variável Fator VII das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 50 a 150%.

A ativação do fator XII resulta na ativação da coagulação pela via intrínseca. O etinilestradiol (EE) presente nos contraceptivos induz alterações significativas no sistema de coagulação, culminando com aumento da geração de trombina. Ocasionalmente também um aumento dos fatores de coagulação (fibrinogênio, VII, VIII, IX, X, XII e XIII) e redução dos inibidores naturais da coagulação (proteína S e antitrombina), produzindo um efeito pró-coagulante leve (MAMMEN, 2000; ROSENDAAL, 2005). Em nosso estudo (Gráfico 6) não foram encontradas alterações significativas para porcentagem de atividade do Fator XII. Contudo, é possível visualizar um aumento na porcentagem de ativação dos grupos II (DRSP/30EE, 106.8), III (DRSP/20EE, 107.9) e IV (EE 30/ LNG, 102.8) em relação ao grupo I (controle, 88.7), onde os valores encontrados para o grupo IV estão mais próximos aos valores do grupo controle em comparação com os outros dois grupos estudados. FERREIRA et al., 2001 encontraram um aumento na porcentagem de atividade do Fator XII em mulheres tratadas com contraceptivo de terceira geração contendo DSG/20EE em relação as não tratadas.

Gráfico 6: *Boxplot* da variável Fator XII das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 50 a 150%.

Como a concentração de trombina circulante é de difícil quantificação, o Fator 1+2, por ser mais estável, é frequentemente usado como marcador da conversão da protrombina em trombina sendo assim um indicador do estado de hipercoagulabilidade (BECKER, 2005; NORRIS, 2003).

O fragmento de protrombina 1+2 é liberado quando o Fator X ativo cliva a protrombina em trombina, refletindo a geração da trombina *in vivo*. Em nossas análises (Gráfico 7) não foram encontrados resultados significativos referentes à concentração do fator 1+2 entre os grupos estudados. Contudo, nota-se um aumento mais pronunciado na concentração plasmática do Fator 1+2 no grupo IV (LNG/30EE; 171.7) em relação aos grupos I (controle) (125), II (DRSP/30EE; 127.7) e III (DRSP/20EE; 129.5). Estudos anteriormente publicados também demonstraram um aumento do Fator 1+2 em pacientes que fazem uso de LNG/30EE. ENDRIKAT et al., 2002 demonstraram um aumento deste parâmetro para usuárias de LNG/20EE e LNG/30EE no 13º mês de uso do medicamento em comparação com as pacientes não tratadas. WINKLER, RÖHMB & HÖSCHENB 2010, também demonstraram um aumento deste parâmetro para LNG/30EE.

Gráfico 7: *Boxplot da variável do fragmento 1+2 das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 69 a 229 pmol/L.*

4.2.2 Efeitos anticoagulantes

Os parâmetros anticoagulantes analisados foram: concentração plasmática das proteínas C e S total e determinação da atividade da antitrombina.

É de extrema importância que, uma vez iniciada a coagulação no local onde ocorreu uma injúria ao endotélio vascular, existam mecanismos anticoagulantes com a finalidade de reduzir o avanço da coagulação normalizando a hemostasia. Numerosos processos biológicos mediados pela trombina promovem a anticoagulação (ESMON, 2003).

Os anticoagulantes naturais que colaboram com a regulação da cascata de coagulação, como o complexo proteína C/ S e a antitrombina, agem diretamente na ação e na geração da trombina (DINISIO, MIDDELDORP & BULLER, 2005).

A via anticoagulante da Proteína C atua como sistema principal no controle da trombose, limitando processos inflamatórios e diminuindo potencialmente a apoptose de células endoteliais em resposta a citocinas inflamatórias e isquemia. Estudos clínicos revelam que deficiências da proteína C levam a trombose microvascular. (ESMON, 2003).

Como o intervalo de referência especificado pelo fabricante (*Helena laboratories*) evidencia uma concentração plasmática de Proteína C total de 72 a 160%. Em todos os grupos analisados neste estudo os valores correspondentes as médias da concentração da Proteína C estão dentro dos valores de referência. Contudo, é possível notar (Gráfico 8) uma diferença significativa na concentração de Proteína C do Grupo IV (LNG/30EE), a qual encontra-se diminuída (93,6%) em relação aos outros grupos (111.3% ;118.1% ;106.4%). Este resultado encontrado para o grupo IV favorece o estado de coagulação, pois a anti coagulação pela Proteína S está diminuída. Este achado contraria resultados encontrados por outros autores (ODLIND et al., 2002; KEMMEREN et al., 2004) e até mesmo neste trabalho, os quais sugerem que a progesterona de segunda geração é mais potente em contrabalancear o efeito pró-coagulante ocasionado pelo estrógeno. Diferente de nossas análises, WINKLER, RÖHMB & HÖSCHENB, 2010 demonstraram um aumento na concentração plasmática de proteína C em pacientes que fazem uso do contraceptivo contendo LNG/30EE. KLUFT et al., 2006 também relataram um aumento na concentração plasmática de proteína C em pacientes que fizeram uso dos contraceptivos contendo DRSP/30EE e DRSP/20EE.

Gráfico 8: *Boxplot* da variável Proteína C das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 72 a 160%.

Em 1984, os primeiros casos de trombose em pacientes com deficiências na concentração de proteína S foram descritos por COMP & ESMON, 1984; COMP et al., 1984 e SCHWARZ et al., 1984.

Com relação à dosagem da concentração plasmática de proteína S (Gráfico 9), podemos notar que nos grupos II(DRSP/30EE) e III(DRSP/20EE) a concentração da proteína S está diminuída (114,7 e 103,2 respectivamente) em relação aos grupos I (controle) e IV (LNG/30EE) (145 e 140,3); o intervalo de referência informado pelo fabricante para estas dosagens é de 60-150%. ENDRIKAT et al., 2002 não encontraram alterações significativas nas dosagens deste anticoagulante em pacientes que fazem uso de LNG 100µg/20EE em comparação com LNG150µg/30EE. KLIPPING et al., 2005 também encontraram valores diminuídos de Proteína S para DRSP/20EE. MACHADO et al., 2010, encontraram uma pequena diminuição não significativa deste parâmetro para DRSP/30EE.

Gráfico 9: *Boxplot* da variável Proteína S das pacientes em relação ao grupo. Valor de referência: 60 a 150%.

A literatura aponta a presença de deficiência da Antitrombina em uma família com muitos membros acometidos de trombose venosa (EGEBERG, 1965). Antitrombina é uma serpina multifuncional, a qual inibe todas as enzimas essenciais para acontecimento da via da coagulação. A antitrombina sozinha é um inibidor lento, mas o heparan sulfato da família das glicosaminoglicanas presente no endotélio intacto estimula sua atividade inibitória. (LINDAHL, 2007)

A dosagem da antitrombina permite o diagnóstico da deficiência hereditária ou adquirida da antitrombina, o que representa um risco elevado de trombose (COLVIN, 2004; HOFFMAN, 2003; STEGNAR et al., 2004).

As deficiências adquiridas da antitrombina ocorrem frequentemente, como consequência do consumo de anticoagulantes orais após operações de maior dimensão, ou como consequência de coagulação intravascular disseminada (CID) nos casos de sepse, lesões hepáticas parenquimais e contraceptivos contendo estrógeno (HATHAWAY, 1991; PETITTI, 2003; SPEROFF & DE CHERNEY, 1993; FRANCO & REISTMA, 2001).

Em nossas dosagens (Gráfico 10) não foram encontradas diferenças significativas para as dosagens da porcentagem de atividade da antitrombina no plasma das pacientes dos quatro grupos avaliados. Contudo, é possível notar que os grupos I (controle) e IV (LNG/30EE) apresentam uma média de valores muito próximos para a ativação da antitrombina, 94 e 95.5, respectivamente; ao passo que os grupos II (DRSP/30EE) e III (DRSP/20EE) demonstram uma diminuição na ativação deste anticoagulante, 89.8 e 91.4, respectivamente. Os valores de referência recomendados pelo fabricante (Berichrom Antitrombina III- SIEMENS-Alemanha) são 75 a 125%. Diferente de nossos resultados, WINKLER, RÖHMB & HÖSCHENB, 2010 e ENDRIKAT et al., 2002, encontraram uma pequena diminuição na porcentagem de atividade da antitrombina para LNG/30EE em comparação com as pacientes não tratadas. KLIPPING et al., 2005 relataram diminuição da atividade da antitrombina para DRSP/20EE. MACHADO et al., 2010 encontraram uma diminuição não significativa para DRSP/30EE.

Gráfico 10: *Boxplot* da variável antitrombina das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 75 a 125%.

4.2.3 Efeito Fibrinolítico

O sistema de fibrinólise é ativado para promover a dissolução da fibrina e restabelecer a fluidez dentro do vaso (FRANCO, 2001).

A dosagem da concentração plasmática de D- dímeros (Gráfico 11) foi o parâmetro utilizado para análise da fibrinólise. O *kit* utilizado (Vidas D-dimer exclusion) é um teste quantitativo automatizado no sistema VIDAS, que permite a determinação imunoenzimática dos produtos de degradação da fibrina (FbDP) no plasma humano (BIOMERIEUX VIDAS FRANCE 2010). D-dímeros são produtos da quebra de ligação cruzada da fibrina e são dependentes da geração de fibrina e da fibrinólise, tornando-se assim, o melhor marcador de *turnover* de fibrina. Entre todos os marcadores dos estados trombóticos, os D- dímeros são os únicos que certificam realmente a presença da fibrina estabilizada (BOUCHEIX, 1983).

Segundo instruções do fabricante (Biomeriëux VIDAS France) o valor de referência para concentração plasmática de D-dímeros é de até 0,5µg /mL. Como mostra o gráfico 11, todas as médias dos valores de nossas pacientes estão dentro da normalidade, mas é possível notar um aumento significativo na concentração plasmática de D-dímeros nas pacientes do grupo III (DRSP/20EE; 0,38) em relação às pacientes do grupo I (controle; 0,22), o que está de acordo com resultados publicados por KLIPPING & MARR, 2005, os quais relataram um aumento mais pronunciado para DRSP/20EE em comparação com o contraceptivo de terceira geração contendo DSG/20EE. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas na concentração de D-dímeros nas nossas pacientes dos grupos II (DRSP/30EE) e IV(LNG/30EE), nota-se que estes grupos apresentaram valores iguais entre si (0.27) quando comparados ao grupo I (0.22). MEIJERS et al, 2000 também relataram um aumento na concentração plasmática de D-dímeros com o uso de LNG/30EE em relação ao grupo controle, ao passo que , WINKLER, RÖHMB & HÖSCHENB , 2010, encontraram uma diminuição deste parâmetro em pacientes que faziam uso deste mesmo medicamento. ENDRIKAT et al., 2002 também não encontraram diferenças significativas na concentração de D-dímeros em pacientes que fazem uso de LNG/30EE .MACHADO et al., 2010 também não encontraram alterações significativas em mulheres fazendo uso de contraceptivo contendo DRSP/30EE.

Gráfico 11: *Boxplot* da variável Dímeros - D das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: até 0,5µg/mL.

4.2.4 Efeito anti – fibrinolítico

A fibrinólise também é rigorosamente controlada e dois inibidores específicos são importantes: o inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 PAI-1 que inibe o t-PA e o u-PA; e a alfa-2-antiplasmina que inibe a plasmina. O PAI-1 encontra-se em uma concentração plasmática muito baixa, sendo liberado em grandes quantidades quando as plaquetas são ativadas. Deficiências de PAI-1 são associadas com tendências hemorrágicas, e os níveis elevados aumentam o risco de trombose (BLOOM, 1994).

Em nossas análises realizamos a dosagem da concentração plasmática de PAI-1 (Gráfico 12) no plasma das pacientes através do Kit Berichrom PAI Siemens, onde o PAI-1 adicionado à amostra inativa u-PA. Logo após, a atividade residual da uroquinase é determinada através da conversão do plasminogênio em plasmina (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS, Germany).

Apesar de todas as médias para a concentração plasmática de PAI-1 encontrarem-se dentro do valor de referência informado pelo fabricante (0,3 a 3,5U/mL), notamos que nossas

pacientes do grupo II, que fizeram uso do contraceptivo contendo DRSP/30EE, apresentaram uma diminuição significativa (1,77) nos níveis de PAI-1 em relação aos outros 3 grupos analisados (2.61,2.38,2.75), o que não está relacionado com a hipercoagulabilidade. KLUFT et al., 2006 também encontraram uma diminuição na concentração do PAI – 1 em usuárias deste mesmo contraceptivo. Já MACHADO et al., 2010 não encontraram alterações significativas para este parâmetro. No grupo IV(LNG/30EE) encontramos uma média de concentração de PAI-1 aumentada (2.75) em relação aos outros 3 grupos analisados, mas que só se apresenta significativa quando comparada ao grupo II (1.77).

Diferente de nossas análises, MEIJERS et al., 2000 e WINKLER,RÖHMB & HÖSCHENB , 2010 relataram uma diminuição na concentração plasmática de LNG/30EE. Para usuárias de DRSP/20EE, KIPPLING & MARR, 2005 encontraram uma diminuição na concentração do PAI-1 em relação as pacientes controle,o que está de acordo com nossos resultados,os quais demonstram uma diminuição (2.38),não significativa, para o valor de PAI-1 em comparação as pacientes do grupo controle (2.61).

Gráfico 12: *Boxplot* da variável PAI-1 das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 0,3 a 3,5 U/mL.

4.3 Moléculas de adesão

Muitos estudos têm demonstrado a relação entre o uso de contraceptivos combinados orais e o desenvolvimento de trombose arterial e venosa (WHO, 1995a; WHO, 1995b; KHADER et al., 2003). Dentre os três principais fatores que contribuem para o acontecimento da trombose descritos no início de 1856 por Virchow (VIRCHOW, 1856), a estase sanguínea e a hipercoagulabilidade são os principais fatores etiopatogênicos que levam ao desenvolvimento da trombose venosa, ao passo que, a disfunção endotelial é o principal evento determinante para o desenvolvimento de trombose arterial. A disfunção endotelial é caracterizada pela incapacidade do endotélio em regular suas principais funções (tônus muscular, hemostasia, adesão celular, balanço eletrolítico, etc), o que contribui para a formação da placa aterosclerótica (BORISSOFF et al, 2009).

O primeiro passo para o desenvolvimento da trombose arterial é o espessamento e a ruptura da placa aterosclerótica, a qual se desenvolve através do acúmulo de lipídios e de células espumosas (MACKMAN, 2008).

O espessamento destas placas resulta lentamente na obstrução do vaso afetado até que ocorra oclusão aguda devido à formação de trombos ou coágulos sanguíneos. Além da obstrução do vaso, outro mecanismo envolvendo o fator tecidual pode contribuir para formação do trombo.

O fator tecidual, responsável por ativar a via extrínseca da coagulação está presente em altas concentrações na placa aterosclerótica e no endotélio. A injúria endotelial ocasionada pelo rompimento da placa aterosclerótica culmina na exposição de grandes quantidades de fator tecidual, o qual ativa a coagulação, culminando na formação do trombo (BREITENSTEIN; TANNER & LÜSCHER, 2010; OWENS & MACKMAN, 2010).

Quando os monócitos são atraídos para o local de inflamação por moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, E e P selectinas), este acontecimento estimula a síntese de fator tecidual, o que contribui para a hipercoagulação via ativação do fator tecidual após injúria provocada pelo rompimento da placa aterosclerótica (ESMON, 2005).

Figura 8. Trombose arterial: o evento inicial da aterosclerose é o rompimento da placa aterosclerótica formada pelo acúmulo de lipídios e de células espumosas. A grande quantidade de fator tecidual (*TF-tissue factor*) existente no endotélio, nas células espumosas e nos lipídios favorece a ativação da coagulação com o rompimento da placa aterosclerótica (OWENS & MACKMAN, **Thrombosis and Haemostasis**,2010).

Como vimos neste trabalho e em estudos anteriormente publicados (WHO, 1998; MIDDELORP et al., 2000 ; KEMMEREN, ALGRA & GROBBE, 2001; PETITTI, 2003; VAN HYLCKAMA et al., 2009) o estrógeno presente nos contraceptivos combinados orais (etinilestradiol) é responsável por favorecer a hipercoagulação, aumentando as chances de desenvolvimento de trombose venosa por proporcionar um aumento dos fatores coagulantes e uma diminuição na anticoagulação e fibrinólise (TCHAIKOYSKI & ROSING, 2010).

Com o intuito de diminuir a incidência de trombose venosa, a concentração de estrógeno presente nos contraceptivos diminuiu ($< 50 \mu\text{g}$) desde o surgimento do primeiro medicamento em 1960 (*Evanoid*). De fato, essa progressiva diminuição na concentração do estrógeno contribuiu para diminuir a incidência de trombose venosa (GERSTMAN; PIPER & TOMITA, et al, 1991).

Diferentemente da relação diretamente proporcional existente entre o uso de contraceptivos e a trombose venosa, em usuárias de contraceptivos hormonais com baixa dose de estrogênio ($< 50 \mu\text{g}$) observa-se um aumento na incidência de trombose arterial (ESHRE, 2006). O efeito do estrógeno nas lipoproteínas (THE WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL, 1995), o efeito vasodilatador que este hormônio confere ao endotélio devido a um aumento na liberação de óxido nítrico (PAULO et al, 2009; GUETTA et al., 1997) a

potenciação da fibrinólise (KOH, MCDONALD & CANNON., 1999) e a redução da expressão de moléculas de adesão(ICAM-1, VCAM-1, E e P selectinas) envolvidas nas interações endotélio-leucócitos (DE CATERINA et al. ,1995) estão dentre os mecanismos pelos quais o estrógeno consegue diminuir o risco de trombose arterial. Entretanto, estudos sugerem que a progesterona sintética pode contrariar este efeito favorável do estrógeno, causando um aumento nos níveis destas moléculas de adesão (MIYAGWA et al., 1997). Os níveis destas moléculas de adesão presentes no soro e no plasma de pacientes podem refletir o grau de inflamação e ativação do endotélio (BILGIR et al., 2009) sendo consideradas, em sua forma solúvel, marcadores para aterosclerose e doença cardiovascular (HWANG et al., 1997 ; RIDKER et al., 1998).

Neste trabalho nós avaliamos a concentração plasmática de três moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) no plasma de mulheres que fazem uso dos contraceptivos contendo EE 30µg /DRSP 3mg, EE 20µg/DRSP 3mg e EE 30µg/LNG 0,15mg.

ICAM-1 também conhecido como CD54, é uma glicoproteína transmembrana que desempenha um papel fundamental na migração e ativação de leucócitos. Esta molécula está envolvida com a firme adesão de leucócitos à superfície de células endoteliais através da interação com integrinas CD11a /CD18 ou CD11b/CD18 presente em leucócitos (REILLY et al., 1995; MILLER et al., 1995. ICAM-1 promove angiogênese e funciona como um indicador de dano ou ativação celular no endotélio (BILGIR et al., 2009).

Em nossas análises (Gráfico 13), apesar de todas as quantificações plasmáticas de ICAM encontrarem-se dentro do valor de referência (90 a 350 ng/ml) estipulado pelo fabricante (R&D systems, Minneapolis, USA), podemos notar que os grupos II (DRSP/30EE), III (DRSP/20EE) e IV (LNG/30EE) possuem valores diminuídos em relação ao grupo I (controle). Essa diminuição nos níveis destes marcadores inflamatórios enaltece o caráter protetor conferido ao endotélio pelo estrógeno presente nos contraceptivos. Apesar desta visível diminuição, resultados significativos só foram encontrados nas comparações referentes ao grupo I x grupo III e no grupo I x grupo IV. Dentre as alterações estatisticamente significativas encontradas, no grupo IV observamos a menor quantificação (95,99 ng/ml) plasmática de ICAM-1, o que sugere ser este o contraceptivo com melhor ação protetora sobre o endotélio em comparação com os outros medicamentos avaliados neste estudo. SEEGER et al., 2002 também observaram uma diminuição nos níveis desta molécula 6 meses após o início do tratamento de pacientes com duas formulações de contraceptivos contendo LNG 0,1mg/ 20µg EE ou LNG 0,15mg/ 30µg EE, mas os níveis de ICAM-1 no soro destes dois grupos de pacientes decaiu para os mesmos valores observados no pré-tratamento

após 12 meses de uso do medicamento. BILGIR et al, 2009 encontraram uma diminuição nos níveis desta molécula em um estudo feito com mulheres saudáveis portadoras da síndrome de ovário policístico e tratadas com contraceptivo contendo 35µg EE/ acetato de ciproterona(ACP) 2mg + metilformina. YEBOAH et al., 2008 também observaram uma diminuição nos níveis desta molécula em um estudo realizado com 309 mulheres na pós menopausa e portadoras de doença coronariana arterial,divididas em dois grupos tratados com 0,625 mg EE ou EE/ 2,5mg medroxiprogesterona (MPA). Diferentemente de nossos resultados, FARZATI et al, 2002 não encontraram alterações significativas nos níveis de ICAM-1 entre os 3 grupos analisados em seu estudo (mulheres menopausa sem uso de Terapia de Reposição Hormonal, mulheres na menopausa fazendo uso de 17-β estradiol transdérmico/ acetato de megestrol oral como Terapia de Reposição hormonal e mulheres em idade fértil).

Gráfico 13: *Boxplot* da variável ICAM-1 das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 90 a 350 ng/ml.

VCAM-1 está envolvida com a adesão de monócitos e com o rolamento de linfócitos no endotélio. *Clusters* de VCAM-1 têm sido observados nos passos que direcionam a

diapedese (BARREIRO et al., 2002; CARMAN & SPRINGER., 2004). As células conhecidas por expressar VCAM-1 são os neurônios (BIRDSALL, et al., 1992), as células endoteliais (SANO et al., 1995), fibroblastos (MENG et al., 1995) e macrófagos (VAN OOSTEN et al., 1995).

Funcionalmente, VCAM-1 liga-se as integrinas VLA-4 e LPAM-1; estas integrinas são expressas por uma variedade de células. A integrina VLA-4 é encontrada em todos os leucócitos, com exceção dos neutrófilos (ROTT et al., 1996).

Em nossas análises (Gráfico 14), apesar de todas as médias obtidas com a quantificação plasmática da molécula VCAM-1 encontrarem-se visivelmente diminuídas nos grupos II (DRSP/30EE), III (DRSP/20EE) e IV (LNG/30EE) em comparação com o grupo I (controle), alterações estatisticamente significativas só foram observadas nas comparações que envolvem grupo I x grupo III e grupo I x grupo IV. Todos os valores quantificados encontram-se dentro do valor de referência (300-990ng/ml) estipulado pelo fabricante (R&D systems, Minneapolis, USA). Desta forma, como observado perante a quantificação da molécula ICAM-1, o menor valor para os níveis de VCAM-1 também foi observado no grupo IV (352,58ng/ml). Este achado sugere que o contraceptivo de segunda geração contendo (LNG/30EE) é, dentre os medicamentos avaliados neste estudo, o mais efetivo em conferir proteção endotelial.

CICINELLI et al., 2006 observaram uma diminuição nos níveis plasmáticos desta molécula em mulheres saudáveis na pós menopausa tratadas com tibolona após 6 a 12 meses de tratamento em comparação com o grupo placebo. Após 13 meses de tratamento, os níveis de VCAM-1 retornaram aos seus valores basais. YEBOAH et al, 2008 também observaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de VCAM-1 em mulheres na pós menopausa e portadoras de doença coronariana arterial 20 meses após início de tratamento com 0,625 mg EE ou EE/ 2,5mg medroxiprogesterona (MPA). BILGIR et al., 2009 também encontraram uma diminuição nos níveis de VCAM em mulheres saudáveis portadoras de síndrome do ovário policístico tratadas com contendo 35µg EE/ acetato de ciproterona (ACP) 2mg + metilformina. SEEGER et al., 2002 observaram uma diminuição nos níveis de VCAM-1 em mulheres tratadas com contraceptivo contendo LNG 0,1mg/ 20µg EE ou LNG 0,15mg/ 30µg EE após 3,6 e 12 meses de tratamento. Já FARZATI et al., 2002 encontraram um aumento em pacientes em idade fértil em comparação com mulheres fazendo terapia de reposição hormonal com 17β-estradiol transdérmico/ acetato de nomegestrol oral.

Gráfico 14: *Boxplot* da variável VCAM-1 das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 300 a 990 ng/ml.

E-selectina, também conhecida como ELAM-1 (*ELAM-1 Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1*) ou CD62E, é uma glicoproteína transmembrana tipo 1 expressa somente em células endoteliais e somente após ativação por citocinas inflamatórias (IL-1 β ou TNF- α) ou endotoxinas. A superfície celular da E-selectina é mediadora do *rolling* dos leucócitos ao endotélio, uma etapa essencial no extravasamento de leucócitos para o local da inflamação (BEVILACQUA & NELSON., 1993; KANSAS, 1996).

A família das selectinas (P-selectina, E-selectina e L-selectina) têm sido observadas na patogênese de diversas doenças inflamatórias. Altos níveis de E-selectina foram observados em doenças como diabetes (JILMA et al., 1996; KIRK et al., 1997), aterosclerose (IKEDA et al., 1994) e desordens trombóticas (CHONG et al., 1994).

Em nossas análises (Gráfico 15) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para quantificação de E-selectina entre os grupos. Contudo, podemos notar uma visível alteração, onde os grupos II(DRSP/30EE) e III(DRSP/20EE) possuem valores diminuídos em relação aos grupos I (controle) e IV(LNG/30EE), atentando para o fato de que a média referente à concentração plasmática de E-selectina é maior no grupo IV em relação ao

grupo I. Diferente deste resultado ANDRADE; SILVA & TORQUETI TOLOI, 2011, encontraram uma diminuição na concentração de E-selectina na superfície celular e no sobrenadante de cultura de células HUVEC (*Human Umbelical Vein Endothelial Cells*) após 24 horas de tratamento com os fitoestrógenos genisteína, formometina, biocanina A e daidzeína. BILGIR et al, 2009 também não encontraram alterações significativas nos níveis de E-selectina em pacientes tratadas com 35µg EE/ acetato de ciproterona (ACP) 2mg + metilformina. FARZATI et al, 2002 encontraram um aumento na concentração desta molécula em pacientes na menopausa sem Terapia de Reposição hormonal em comparação com mulheres na idade fértil. Diferentemente de nossas análises, SEEGER et al, 2002 encontraram níveis diminuídos de E-selectina em pacientes saudáveis tratadas com contraceptivo oral contendo LNG 0,1mg/ 20µg EE ou LNG 0,15mg/ 30µg EE. HEMELAAR et al, 2005 também encontraram uma diminuição nos níveis desta molécula em pacientes na pós menopausa, esterectomizadas, tratadas com 1mg EE/25µg de gestodeno.

Gráfico 15: *Boxplot* da variável E- selectina das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: 13 a 52 ng/ml.

4.4 Perfil lipídico

A regulação cinética dos lipídios realizada pelos hormônios sexuais é amplamente conhecida. Essa regulação é responsável pelo dimorfismo sexual encontrado no perfil lipídico (WANG, MAGKOS & MITTENDORFER, 2011).

Doenças cardiovasculares são relativamente menos prevalentes em mulheres na pré menopausa comparado com a incidência desta em mulheres na pós menopausa e homens. Na menopausa a proteção hormonal conferida pelo estrógeno diminui ou desaparece, contribuindo para o aumento do risco de doenças cardiovasculares (MENDELSON & KARAS, 1999; NABULSI et al., 1993).

Os mecanismos protetores atribuídos ao estrógeno ocorrem devido a sua ação antioxidante (RIFICI & KHACHADURIAN, 1992; SACK, RADER & CANNON, 1994), melhoramentos no perfil lipídico (HONG et al., 1992) e proteção direta do tecido vascular (MIKKOLA et al., 1995).

No perfil lipídico, como já descrito anteriormente, o estrógeno reduz as concentrações de LDL colesterol e aumenta as concentrações de HDL colesterol (ABBOT et al., 1983; MAGKOS & MITTENDORFER, 2009; COUILLARD et al., 1999; HORTON et al., 2002).

Em nossas análises (Gráfico 16), todos os valores encontrados para concentração mediana de HDL colesterol no soro destas pacientes estão ligeiramente abaixo do valor caracterizado como desejável (> 65 mg/dl) pelo fabricante (Wiener lab, Rosario - Argentina). Apesar dessa ligeira diminuição podemos notar que os grupos II(DRSP/30EE) e III(DRSP/20EE) apresentaram concentrações significativamente maiores (64,5 e 61, respectivamente) em relação ao grupo I (controle, 48). Este aumento pode ser atribuído ao hormônio estrógeno presente nestes contraceptivos, visto que o contraceptivo do grupo II, o qual demonstrou um aumento mais pronunciado nos níveis de HDL, possui uma concentração estrogênica maior (30 μ g) que o contraceptivo do grupo III (20 μ g). Esse nível de HDL encontrado para o grupo II pode estar relacionado também com a prática de exercícios físicos, visto que o grupo II apresentou a maior porcentagem (50%) referente a este parâmetro dentre os grupos avaliados.

Um estudo randomizado realizado por YILDIZHAN et al, 2009 analisou 160 mulheres hispânicas e saudáveis, as quais foram divididas em dois grupo sob prescrição de contraceptivo hormonal contendo 30 μ g EE combinado com 3000 μ g de drospirenona ou 75 μ g de gestodeno por 12 meses. Neste estudo os níveis de HDL colesterol aumentaram em ambos os grupos em comparação com os níveis basais. Entretanto estes níveis voltaram ao normal após o sexto mês de tratamento.

Um outro estudo realizado por MACHADO et al., 2010 também encontrou um aumento significativo no níveis de HDL colesterol. Neste trabalho 78 mulheres brasileiras saudáveis foram divididas em dois grupos de estudo, o primeiro grupo recebeu contraceptivo contendo DRSP/30EE durante 168 dias ininterruptos e o segundo grupo recebeu a mesma formulação por 6 ciclos de 28 dias com um intervalo de 7 dias livre de hormônios.

KLIPPING & MARR, 2005 realizaram um estudo com mulheres saudáveis em idade fértil, as quais foram randomizadas com duas formulações de contraceptivos contendo 20µg de etinilestradiol combinado com 3000µg de drospirenona ou 150 µg de gestodeno. Neste estudo observou se um aumento nos níveis de HDL no sétimo mês em ambos os tratamentos. Contudo, este aumento foi mais pronunciado para o grupo que recebeu DRSP/20EE do que no grupo que recebeu GSD. Em nosso estudo não foram encontradas alterações significativas para o grupo IV(LNG/30EE), embora visualmente possamos notar um aumento nos níveis de HDL colesterol em relação ao grupo I. Diferentemente de nossas análises, um estudo realizado com 48 mulheres por ENDRIKAT et al, 2002 encontrou uma diminuição nos níveis de HDL em pacientes tratadas por 13 meses com LNG 100/20EE e LNG150/30EE.

Gráfico 16: *Boxplot* da variável HDL colesterol das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: > 65 mg/dl.

Como vimos, o aumento da concentração de LDL colesterol aumenta o risco de desenvolvimento de DCV. Isto ocorre, pois, esta molécula em excesso causa alterações prejudiciais no endotélio que culminam na ativação da coagulação, podendo também exacerbar respostas inflamatórias.

Em nossas análises (Gráfico 17) todos os valores encontrados referente as concentrações medianas de LDL colesterol estão dentro do valor de referência (< 130 mg/dl) estipulado pelo fabricante (Wiener lab, Rosario - Argentina). Neste parâmetro, nossos dados não produziram alterações significativas, mas visualmente, os grupos II (DRSP/30EE), III (DRSP/20EE) e IV (LNG/30EE) apresentaram um aumento (103.9; 100.9 e 98.7, respectivamente) nos níveis desta molécula em comparação ao grupo I (controle; 94.16). Diferentemente de nosso resultado, onde o estrógeno presente nos contraceptivos não demonstrou provocar um efeito favorável nos níveis de LDL, um estudo publicado por TANEEPANICHSKUL & PHUPONG, 2007 demonstrou uma diminuição significativa nos níveis de LDL após tratamento com contraceptivo contendo DRSP combinada com 20 ou 30µg de EE durante 6 meses. ENDRIKAT et al., 2002 também demonstraram uma aumento nos níveis de LDL em pacientes tratadas por 13 meses com LNG 100/20EE e LNG150/30EE.

Gráfico 17: *Boxplot* da variável LDL colesterol das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: < 130 mg/dl.

Mulheres na pré menopausa possuem níveis de VLDL colesterol diminuídos em comparação aos homens da mesma idade (HORTON et al., 2002). Isso acontece devido à produção acelerada de VLDL colesterol em mulheres, a qual contribui para aumentar o *clearance* plasmático das partículas de VLDL e LDL. Outro fator que contribui para este perfil é a secreção da apolipoproteína B-100 pela VLDL, que é menor em mulheres do que em homens, consequentemente as mulheres possuem poucas moléculas de VLDL ricas em triglicerídeos comparado aos homens (MAGKOS et al., 2007).

O estrógeno é capaz de aumentar a concentração plasmática de VLDL. Este efeito hipertriglicêmico das preparações orais contendo estrógeno ocorre devido a um aumento na secreção hepática de partículas de VLDL ricas em triglicerídeos (SOARES et al., 2009; NEW et al., 1997).

Apesar deste aumento nas partículas de VLDL causado pelo estrógeno, no geral, o hormônio quase não altera a concentração e o *clearance* das partículas de VLDL, pois estas são convertidas rapidamente em IDL, para posteriormente formarem o LDL (CAMPOS et al., 1997; WALSH et al., 2001).

Em nossas análises (Gráfico 18), todos os valores medianos encontrados para concentrações sérica de VLDL estão dentro dos valores de referência (< 40 mg/dl) estipulado pelo fabricante (Wiener lab, Rosario - Argentina).

Nos grupos II(DRSP/30EE) e III(DRSP/20EE) observa-se um aumento significativo (23.9 e 24.2, respectivamente) em relação ao grupo I (controle, 13).

Um estudo realizado por RIOS et al., 2008 demonstrou um aumento não significativo nos níveis de VLDL em um estudo realizado com 47 mulheres na pós menopausa. As pacientes foram divididas em dois grupos, os quais receberam 40 mg de isoflavona ou placebo durante 6 meses.

Diferente de nossos resultados, HELLGREN et al, 2009 não encontraram alterações significativas nos níveis de VLDL em um estudo realizado com 184 mulheres saudáveis na pós menopausa, as quais foram divididas em dois grupos que receberam TRH contendo 2000µg de EE combinada com 500µg de trimegestona ou 10.000µg de didrogestona . CALLEJON et al, 2009 observaram uma diminuição não significativa nos níveis de VLDL em um estudo realizado com trinta mulheres na pós menopausa, as quais receberam TRH composta de gel transdérmico de estradiol (1000µg/dia) combinado com 5000µg de acetato de medroxiprogesterona oral por dia durante 12 dias/mês por 6 meses.

Gráfico 18: *Boxplot* da variável VLDL colesterol das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: < 40 mg/dl.

Em nossas análises (Gráfico 19), todos os valores encontrados para as concentrações medianas de colesterol total no soro das pacientes estão dentre dos limites desejáveis (< 200 mg/dl) estipulados pelo fabricante (Wiener lab, Rosario- Argentina). Contudo, podemos notar que nas pacientes do grupo II(DRSP/30EE) e III(DRSP/20EE) encontramos um aumento significativo (193 e 187, respectivamente) na concentração sérica de colesterol comparado com o grupo I (controle, 161.5).

Quando analisamos as frações que compõe o colesterol total (HDL, LDL e VLDL colesterol) de cada grupo, notamos que a diferença nos níveis de LDLcolesterol entre o grupo II e o grupo III é pequena (103.9 e 100.9 , respectivamente). Mas a diferença nos níveis de HDL colesterol entre estes dois grupos é relativamente significativa (64.5 e 61, respectivamente), o que contribui para o aumento do colesterol total no grupo II. Podemos sugerir, desta forma, que o grupo II, apesar de apresentar níveis de colesterol total ligeiramente mais elevados, possui um perfil lipídico benéfico em relação ao grupo III, devido às variações do HDL colesterol.

MACHADO et al., 2010 encontraram um aumento não significativo nos níveis de colesterol total num grupo com DRSP/30EE.

KLIPPING & MARR, 2005 realizaram um estudo com duas formulações de contraceptivos contendo 20µg de etinilestradiol combinado com 3000µg de drospirenona ou 150 µg de gestodeno onde não observaram mudanças significativas nos níveis de Colesterol total.

CALLEJON et al, 2009 não observaram alterações significativas nos níveis de colesterol total em um estudo realizado com trinta mulheres na pós menopausa, as quais receberam TRH composta de gel transdérmico de estradiol (1000µg/dia) combinado com 5000µg de acetato de medroxiprogesterona oral por dia durante 12 dias/mês por 6 meses.

Gráfico19: *Boxplot* da variável colesterol total das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: < 200 mg/dl.

Em uma dieta rica em ácidos graxos ou carboidratos, estes serão convertidos em triglicerídeos no fígado e unidos a apolipoproteínas específicas (apoB-100, apoC-II, apoE) para formar as partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (BACHORIK, RIFKIND & KWITEROVICH, 1999; NELSON & COX, 2000).

As progesteronas são capazes de diminuir a concentração de triglicerídeos. Este efeito é mediado por um aumento no *clearance* plasmático de partículas de VLDL rica em triglicerídeo e VLDL rica em apolipoproteína B100. (WOLFE & HUFF, 1993). Apesar deste efeito hipotriglicêmico da progesterona, o estrógeno possui característica hipertriglicêmica devido a um aumento na secreção hepática de partículas de VLDL ricas em triglicerídeos (SOARES et al., 2009; NEW et al., 1997).

Em nossas análises (Gráfico 20), todos os valores encontrados para concentrações medianas de triglicerídeos estão dentro dos valores de referência (<150 mg/dl) estipulado pelo fabricante (Wiener lab, Rosario- Argentina). Podemos notar um aumento significativo na concentração de triglicerídeos nos grupos II(DRSP/30EE) e III(DRSP/20EE) (119.5 e 121, respectivamente) em relação ao grupo I (controle, 65). Como vimos, a lipoproteína VLDL é a responsável por transportar os triglicerídeos de fígado para o tecido adiposo. Diante disso, é interessante notar que o grupo III apresentou a maior concentração de triglicerídeos e VLDL.

Um estudo randomizado realizado por YILDIZHAN et al, 2009 contendo 30µg EE combinado com 3000µg de drospirenona ou 75µg de gestodeno observaram um aumento nos valores de triglicerídeos em ambos os grupos. Entretanto, esses valores voltaram aos valores basais encontrados para cada paciente após 6 meses de uso do contraceptivo.

Um estudo realizado por BERENSON, RAHMAN & WILKINSON, 2009 analisou 703 mulheres as quais foram divididas em três grupos: usuárias de acetato de medroxiprogesterona injetável (DMPA), usuárias de contraceptivo oral contendo DSG 150µg / EE20µg e usuárias de método contraceptivo não hormonal. As pacientes que fizeram uso de DMPA apresentaram uma concentração maior de triglicerídeos em comparação com as que não fizeram uso de método contraceptivo hormonal nos primeiros meses de estudo. Após 3 anos foi observado um aumento nos níveis de triglicerídeos nas usuárias do contraceptivo hormonal oral, mas este aumento foi mais pronunciado nos 6 primeiros meses de uso.

Em nossas análises não encontramos alterações significativas para o grupo IV (LNG/30EE), mas podemos notar um aumento (93,5) nos níveis de triglicerídeos em relação ao grupo I (65). ENDRIKAT et al., 2002 também observaram um aumento nos níveis de triglicerídeos em pacientes tratadas por 13 meses com LNG 100/20EE e LNG150/30EE.

Gráfico 20: *Boxplot* da variável triglicerídeos das pacientes em relação aos grupos. Valor de referência: < 150 mg/dl.

4.5 Sumário da discussão

Inicialmente, o estrógeno contido nos contraceptivos era considerado o único responsável pelos efeitos pró-trombóticos da contracepção hormonal. De fato, uma progressiva diminuição na dose de estrógeno reduziu estes efeitos colaterais (GERSTMAN, PIPER, TOMITA, et al., 1991).

Por outro lado, para diminuir a dose do estrógeno, mudanças na estrutura química do componente progestágeno foram necessárias, o que ocasionou o surgimento das progesteronas de terceira e quarta geração (SKOUBY & PETERSEN., 1991)

Devido a um aumento na incidência de trombose induzida por contraceptivos contendo a mesma dose de estrógeno e diferentes progestágenos, foi possível observar que o efeito hipercoagulante do contraceptivo não é estritamente dependente da dose de estrógeno, mas da “estrogenicidade total” da formulação estroprogestiva. A estrogenicidade aumenta com o aumento da dose de estrógeno, mas diminui com o aumento da atividade anti-estrogênica da progesterona.

Estudos independentes sugerem que progesteronas de terceira e quarta geração possuem atividade anti-estrogênica menor em relação a de segunda geração, e portanto, são menos potentes em contrabalancear os efeitos pró-trombóticos causados pelo estrógeno (ODLIND et al. ,2002; KEMMEREN et al. ,2004).

Neste trabalho as alterações provocadas na hemostasia foram mais acentuadas nas pacientes que fazem uso do contraceptivo de quarta geração contendo (EE 20µg/DRSP), onde é possível notar mudanças significativas em três parâmetros coagulantes (TP, TTPA e fibrinogênio), um anticoagulante (Proteína S) e no fibrinolítico (D-dímeros), todas favorecendo um estado de hipercoagulação. O contraceptivo, também de quarta geração contendo EE30 µg / DRSP provocou alterações favorecendo hipercoagulabilidade em um parâmetro anticoagulante (Proteína S) e em um parâmetro coagulante (TP). E o contraceptivo de segunda geração contendo EE 30µg/LNG foi o que ocasionou alterações em um parâmetro anticoagulante (Proteína C) e em um parâmetro coagulante (TP).

Com base nestes achados, quando comparamos o contraceptivo de segunda geração contendo LNG/30EE com o de quarta geração DRSP/20EE, verificamos que apesar de o contraceptivo de quarta geração conter uma dose menor de estrógeno que o de segunda geração, essa variação na dosagem é muito pequena e, portanto, parece não influenciar nas alterações hipercoagulantes. Contudo é importante notar que estes dois contraceptivos possuem diferentes progestágenos, o que evidencia o fato de que a progesterona de quarta geração possui uma atividade antiestrogênica menor que o progestágeno de segunda geração, como discutido anteriormente por outros autores (ODLIND et al. ,2002; KEMMEREN et al. ,2004), o que nos permite sugerir, com base nesta comparação, que o levonorgestrel continua sendo a opção mais segura em evitar os efeitos pró-trombóticos associados ao estrógeno.

Quando comparamos os contraceptivos LNG/30EE vs DRSP/30EE, ambos possuem a mesma concentração de etinilestradiol, mas, por possuírem progestágenos diferentes, era esperado que a progesterona de quarta geração drospirenona apresentasse um maior número de alterações associadas a hipercoagulabilidade do que a progesterona de segunda geração levonorgestrel. Porém, os resultados obtidos neste estudo, com relação a esta comparação, não demonstraram uma variação significativa no número de alterações hemostáticas. Contudo esta comparação não nos permite concluir que o progestágeno levonorgestrel, neste caso, possui maior potencial antiestrogênico e, consequentemente, é o mais indicado para evitar os efeitos pró- trombóticos associados ao estrógeno frente aos medicamentos avaliados.

Já no que se diz respeito à comparação dos contraceptivos DRSP/20EE vs DRSP/30EE, ambos possuem o mesmo progestágeno mas diferentes concentrações de

etinilestradiol, logo neste caso, a intenção foi avaliar a influência da dose de estrógeno no desenvolvimento de desordens trombóticas. Curiosamente, em nossas análises, observamos que o contraceptivo com menor dose de estrógeno provocou um maior número de alterações hipercoagulantes (TP, TTPA, fibrinogênio, Proteína S e D-dímeros). Esse fato nos permite concluir que, como demonstrado por LIDEGAARD, EDSTRÖM & KREINER, 2002 e WHO.,1995, a diminuição na dose de etinilestradiol (estrógeno) de 50 µg para 30-40 µg, provocou uma diminuição no risco de desenvolvimento de trombose. Contudo, não há evidências que o risco de trombose tenha diminuído com o uso de contraceptivos contendo 20 µg de estrógeno, para esta conclusão outros estudos devem ser realizados.

Em relação à quantificação das moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) no plasma das pacientes, a diminuição significativa encontrada para os grupos III (DRSP/20EE) e IV (LNG/30EE) em relação ao grupo I (controle) na quantificação das moléculas ICAM-1 e VCAM-1, sugerem que estes contraceptivos podem conferir proteção ao endotélio prevenindo estas pacientes do desenvolvimento de desordens trombóticas e da aterosclerose. Nesta análise o contraceptivo de segunda geração (grupo IV) promoveu uma diminuição acentuada nestes marcadores solúveis de desordens trombóticas.

Na quantificação da molécula E-selectina apesar de não observarmos achados significativos, é possível notar que o grupo IV possui uma concentração elevada nos níveis desta molécula em relação aos outros grupos avaliados neste trabalho. Este fato pode contribuir para o desenvolvimento de desordens trombóticas e pode estar relacionado com o tipo de progestágeno utilizado, podendo ser responsável por aumentar a concentração plasmática de moléculas de adesão (MIYAGWA et al., 1997; TATSUMI et al., 2002), negativamente o efeito protetor conferido ao endotélio pelo estrógeno. Entretanto, para discutirmos a verdadeira relação existente entre a progesterona e os níveis plasmáticos de moléculas de adesão serão necessários outros estudos, visto que não encontramos dados na literatura para discutirmos e compararmos com os resultados obtidos neste estudo. Este nosso estudo é pioneiro na avaliação da concentração plasmática de moléculas de adesão em mulheres brasileiras em idade fértil e usuárias de contraceptivos hormonais orais combinados de quarta geração.

Com relação à quantificação sérica das lipoproteínas HDL, VLDL e LDL; do colesterol total e do triglicérides encontramos nos grupos II (DRSP/30EE) e III (DRSP/20EE) um aumento significativo da HDL e comparação com o grupo I. O grupo II apresentou a maior alteração neste parâmetro, o que pode estar relacionado com a maior frequência na prática de exercícios físicos comparação aos outros grupos estudados. O grupo IV

(LNG/30EE) que apresentou a menor alteração na quantificação do HDL, pode atribuir este resultado ao fato de que, progestágenos androgênicos, derivados da testosterona, são os que possuem maior interferência nas alterações benéficas do estrógeno sobre o perfil lipídico, pois promovem uma reversão no aumento do HDL devido a um aumento na atividade das lipases hepáticas (CROOCK et al., 1992). Também encontramos um aumento na concentração de VLDL, Colesterol total e triglicérides nos grupos II e III em relação ao grupo I. O aumento ocorrido nestes parâmetros pode contribuir para o acontecimento de desordens trombóticas via acúmulo da LDL oxidada.

5. Conclusões

- Nas usuárias do contraceptivo oral contendo 20µg de EE e 3000 µg de drospirenona encontramos alterações favoráveis à hipercoagulabilidade nos parâmetros hemostáticos TP, TTPA, fibrinogênio, Proteína S e Dímeros-D.
- Nas usuárias do contraceptivo oral contendo 30µg de EE e 3000 µg de drospirenona encontramos alterações favoráveis à hipercoagulabilidade nos parâmetros hemostáticos TP e Proteína S.
- Nas usuárias do contraceptivo oral contendo 30µg de EE e 150 µg de levonorgestrel encontramos alterações favoráveis à hipercoagulabilidade nos parâmetros hemostáticos TP e Proteína C.
- Os grupos que fazem uso das formulações contendo 20µg de EE combinado com 3000 µg de drospirenona e 30µg de EE combinado com 150 µg de levonorgestrel apresentaram uma diminuição nos níveis plasmáticos das moléculas de adesão ICAM e VCAM em relação ao grupo controle.
- Nenhum grupo apresentou alterações estatisticamente significativas na quantificação plasmática da molécula de adesão E-selectina.
- Nas usuárias do contraceptivo oral contendo 20 e 30µg de EE combinado com 3000µg de drospirenona encontramos um aumento significativo nos níveis de HDL, VLDL, colesterol total e triglicerídeos em comparação com o grupo controle.

6. Referências Bibliográficas

ABBOTT, R.D.; GARRISON, R.J.; WILSON, P.W.; EPSTEIN, F.H.; CASTELLI, W.P.; FEINLEIB, M.; LARUE, C. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. The Framingham study. **Arteriosclerosis**. v. 3,p.260– 272. 1983.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Hormonal Contraception: Recent Advances and Controversies. **Fertility and Sterility**. v. 90,p.103–13. 2008.

ANDERSON, F.D.; GIBBONS, W.; PORTMAN, D. Safety and efficacy of an extended-regimen oral contraceptive utilizing continuous low-dose ethinyl estradiol. **Contraception**. v.73, p.229 –34. 2006.

ANDRADE, C.M.; SILVA, M.F.S. & TORQUETI –TOLOI, M.R. Effects of phytoestrogens derived from soybean on the adhesion molecules expression on HUVEC. Aceito para publicação em **Climateric**, 2011.

BACHORIK, P.S.; RIFKIND, B.M.; KWITEROVICH, P.O. Lipídeos e dislipoproteinemias. In: HENRY, J.B. Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais. 19 ed. São Paulo: **Manole**. cap.10, p.208-36. 1999.

BADIMON, L.; STOREY, R.F. & VILAHUR, G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**. v.105(1), p.34–S42, 2011.

BALDÁN, A.; BOJANIC, D. D. & EDWARDS, P. A. The ABCs of sterol transport. **Journal of Lipid Research**. v. 50, p. 80–S85. 2009.

BANK, I.; LIBOUREL, E.J.; MIDDELDORP, S.; HAMULYÁK, K.; VAN PAMPUS, E.C.; KOOPMAN, M.M.; PRINS, M.H.; VAN DER MEER, J.; BÜLLER, H.R. Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v.3(1), p.79-84. 2005.

BARREIRO, O.; YANEZ-MO, M.; SERRADOR, J.M.; MONTROYA, M.C.; VICENTE-MANZANARES, M.; TEJEDOR, R.; FURTHMAYR, H.; SANCHEZ-MADRID, F. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. **Journal of Cell Biology**. v.157, p.1233–45. 2002.

BAYNES, J.; DOMINICZACK, M. Lipídios e lipoproteínas. **Bioquímica médica**. 1.ed. São Paulo: Manole. cap.17, p.201-217. 2000.

BECKER, R.C. Understanding the dynamic of thrombin in cardiovascular disease: pathobiology and biochemistry for the clinician. **American Heart Journal**. v.149, p.2-8. 2005.

BELL, S.; WISE, L.; COOPER-DOYLE, S.; NORSIGIAN, J. Birth control. In: The Boston Women's Health Book Collective, eds. Our bodies, ourselves for the new century. **New York: Touchstone**.p.288–340, 1998.

BERENSON, A.B.; RAHMAN, M.; WILKINSON, G. .Effect of injectable and oral contraceptives on serum lipids. **Obstetrics and Gynecology**., v. 114(4),p. 786–794. 2009.

BEVILACQUA, M.P. & NELSON, R.M. Selectins. **Journal of Clinical Investigation**. v.91(2), p.379–387. 1993.

BEVILACQUA, M.P.; POBER, J.S.; MENDRICK, D.L.; COTRAN, R.S.; GIMBRONE, M.A. JR. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. **Proceedings of the national academic of sciences of the United States of America**,v. 84, p..9238-9242. 1987.

BILGIR, O.; KEBAPCILAR,L.; BILGIR,C.T.F.; KEBAPCILAR,A.; BOZKAYA,G.; YILDIZ,Y.; YUKSEL,A.; SARI,I. The Effect of Ethinylestradiol (EE) /Cyproterone Acetate (CA) and EE/CA Plus Metformin Treatment on Adhesion Molecules in Cases with Polycystic Ovary Syndrome .**Internal Medicine**.v. 48(14),p. 1193-1199. 2009.

BIRDSALL, H.H.; LANE, C.; RAMSER, M.N.; ANDERSON, D.C. Induction of VCAM-1 and ICAM-1 on human neural cells and mechanisms of mononuclear leukocyte adherence. **Journal of Immunology**. v.148(9),p.2717-23.1992.

BLAND, J.M. & ALTMAN, D.G. Statistics notes: logarithms. **British Journal**, London,v. 312(7032),p.700.1996.

BLAND, J.M. & ALTMAN, D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. **British Medical Journal**.v. 310(6973), p.170. 1995.

BLOOM, A.L. Haemostasis and thrombosis. 3.ed. New York, **Churchill Livingstone**, v.1. 1999.

BOBROW, R.S. Excess factor VIII: a common cause of hypercoagulability. **The Journal of The American Board Family Practice**. ,v. 8(2),p.147–9. 2005.

BORISSOFF, J.I.; SPRONK, H.M.H.; HEENEMAN,S.;TEN CATE,H. Is thrombin a key player in the‘coagulation atherogenesis’maze? **Cardiovascular Research**,v.82, p. 392–403. 2009.

BOUCHEIX, C. Monoclonal antibodies for domains which are differentially expressed in fibrinogen, in fibrinogen degradation products or in fibrin degradation products. Properties of the biological products. **Ed. H. Peeters-Pergamon press**. v.30, p.399- 402. 1983.

BREITENSTEIN, A.; TANNER, F.C.; LÜSCHER, T.F. Tissue Factor and Cardiovascular Disease: Quo Vadis? expression occurs during atherogenesis, particularly in patients with acute coronary syndromes. **Circulation Journal**, v.74, p. 3-12. 2010.

BROZE, G.J. ; GIRARD, T.J.; NOVOTNY, W.F. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. **Biochemistry**, v. 29, p. 7539 – 7546. 1990.

BURKMAN, R.T. Lipid metabolism effects with desogestrel-containing oral contraceptives. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.168, p.1033– 40. 1993.

CALLEJON, D.R.; RIOS, D.A.R.; FRANCESCHINI, S.A.; TOLOI, M.R.T. Transdermal estradiol and lipid profile: effects on a specific group of Brazilian postmenopausal women **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. São Paulo, v.93, n.6. 2009.

CAMPOS, H.; WALSH, B.W.; JUDGE, H.; SACKS, F.M. Effect of estrogen on very low density lipoprotein and low density lipoprotein subclass metabolism in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 82, p.3955–3963. 1997.

CARMAN, C.V. & SPRINGER, T.A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. **Journal of cell biology**, v. 167, p.377–88, 2004.

CAULIN – GLASER, T. ; GARCÍA-CARDEÑA, G.; SARREL, P.; SESSA, W.C.; BENDER, J.R. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca^{2+} mobilization. **Circulation Research**, v. 81, p.885-892. 1997.

CHANDLER, W.L.; RODGERS, G.M.; SPROUSE, J.T.; THOMPSON, A.R. Elevated hemostatic factor levels as potential risk factors for thrombosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.126, p.1405-14. 2002.

CHI, I. The safety and efficacy issues of progestin-only oral contraceptives an epidemiologic perspective. **Contraception**, v.47, p.1–21. 1993.

CHONG, B.H.; MURRAY, B.; BERNDT, M.C.; DUNLON, L.C.; BRIGHTON, T.; CHESTERMAN, C.N. Plasma P selectin is increased in thrombotic consumptive platelets disorders. **Blood**, v.83, p.1535-41. 1994.

CICINELLI,E.; RANIERI,G.; MAFFEI, S.;COLAFIGLIO, G.; RIA,R.; BELLAVIA,M.; SCHONAUER, M.M. Long-term effects of tibolone on circulating levels of vascular cell adhesion molecules and E-selectin in postmenopausal women. **Fertility and Sterility**.,v.86 (4),p. 899-904. 2006.

COLACURCI, N.; CHIÀNTERA, A.; FORNARO, F.; DE NOVELLIS, V.; MANZELLA, D.; ARCIELLO, A.; CHIÀNTERA, V.; IMPROTA, L.; PAOLISSO. Effects of soy isoflavones on endothelial function in healthy postmenopausal women.**Menopause**.,v.12, p.299-307. 2005.

COLLINS, R.G.; VELJI,R.;GUEVARA, N.V.; HICKS,M.J.;CHAN.L.; BEAUDET,A.L. P-selectin or intercelular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice. **Journal of experimental medicine**.,v.191,p.189-194. 2000.

COLVIN, B.T. Physiology of haemostasis.**Vox Sanguinis**.,v. 87,p.43-46. 2004.

COMP, P.C. & ESMON, C.T. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. **New England Journal of Medicine**.v.311, p.1525-1528. 1984.

COMP, P.C.; NIXON, R.R.; COOPER, M.R.; ESMON, C.T. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. **Journal of Clinical Investigation**. v.74, p. 2082-2088. 1984.

CONOVER, W.J. Practical Nonparametric Statistics (2nd ed.), **New York: John Wiley**.1980

CONRAD, J. Biological coagulation findings in third-generation oral contraceptives. **Human Reproduction Update**.,v.5,p.672– 80. 1999.

COUILLARD, C.; BERGERON, N.; PRUD'HOMME, D.; BERGERON, J.; TREMBLAY, A.; BOUCHARD, C.; MAURIE`GE, P.; DESPRE`S, J.P . Gender difference in postprandial lipemia: importance of visceral adipose tissue accumulation.Arteriosclerosis, **Thrombosis and Vascular Biology**., v.19, p.2448–2455. 1999.

CROOK ,D. Effects of estrogens and progestogens on plasma lipids and lipoproteins. In: Fraser IS, Jansen RPS, Lobo RA, Whitehead MI, eds. **Estrogens and progestogens in clinical practice**. London: Harcourt Brace, Co. Ltd. (Churchill Livingstone),p.787–798.1998.

CROOK,D.; CUST,M.P.; GANGAR, K.F.; WORTHINGTON,M.;HILLARD, T,C.; STEVENSON, J.C.; WHITEHEAD, M.I.; WYNN,V. Comparison of transdermal and oral estrogen-progestin replacement therapy: effects on serum lipids and lipoproteins. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v.166, p.950-55. 1992.

DAHLBÄCK, B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorder. **Blood**, v.112, p.19-27. 2008.

DAVIE, E.W. & RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science** . v.145, p.1310–1312. 1964.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v.30, p. 10363 – 10370. 1991.

DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H.B.; THANNICKAL, V.J.; RAJAVASHISTH, T.B.; GIMBRONE, M.A. JR.; SHIN, W.S.; LIAO, J. Nitric oxide decrease cytokine- induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **Journal of Clinical investigation**. v.96, p.60-68. 1995.

DI ANGELANTONIO, E.; SARWAR, N.; PERRY, P.; KAPTOGE, S.; RAY, K.K.; THOMPSON, A.; WOOD, A.M.; LEWINGTON, S.; SATTAR, N.; PACKARD, C.J.; COLLINS, R.; THOMPSON, S.G.; DANESH, J., et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. **JAMA**. v.302, p. 1993–2000 .2009.

DI NISIO, M.; MIDDELDORP, S. & BÜLLER, H.R. Direct Thrombin Inhibitors. **New England Journal of Medicine**, v.353, p.1028-40. 2005.

DUSTERBERG, B.; ELLMAN, H.; MULLER, U.; ROWE, E.; MUHE, B. A three-year clinical investigation into efficacy, cycle control and tolerability of a new low-dose monophasic oral contraceptive containing gestodene. **Gynecological Endocrinology**, v.10, p.33–9. 1996.

DUVILLARD, L.; DAUTIN, G.; FLORENTIN, E.; PETIT, J.M.; GAMBERT, P.; VERGE`S, B. Changes in apolipoprotein B100-containing lipoprotein metabolism due to an estrogen plus progestin oral contraceptive: a stable isotope kinetic study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, p.2140-6. 2010.

EGEBERG, O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. **Thrombosis Diathesis Haemorrhagica**. v.13, p.516-530. 1965.

ELGER, W.; BEIER, S.; POLLOW, K.; GARFIELD, R.; SHI, S.Q.; HILLISCH, A. Conception and pharmacodynamic profile of drospirenone. **Steroids**, v.68, p. 891–905. 2003.

ENDRIKAT, J. ; KLIPPING, C. ; CRONIN, M. ; GERLINGER, C. ; RUEBIG, A. ; SCHMIDT, W. ; DUSTERBERG, B. An open label, comparative study of the effects of a dose-reduced oral contraceptive containing 20 µg ethinyl estradiol and 100 µg levonorgestrel on hemostatic, lipids, and carbohydrate metabolism variables; **Contraception**. v. 65, p.215–221. 2002.

EPPIHIMER, M.J.; SCHAUB, R.G. P-Selectin-dependent inhibition of thrombosis during venous stasis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p.2483–2488. 2000.

ESHRE, C. Hormones and cardiovascular health in women. **Human Reproduction Update**, v.12(5), p.483-97. 2006.

ESMON, C.T. The protein C pathway. **CHEST**, v.124, p. 26S–32S. 2003.

ESMON, C.T. The interactions between inflammation and coagulation. **British Journal of Haematology**, v. 131, p.417–430. 2005.

FARZATI, A.; ESPOSITO, K.; COLACURCI, N.; FORNARO, F.; CHIANTERA, V.; FARZATI, B. Effects of transdermal hormone replacement therapy on levels of soluble P- and E- selectin in postmenopausal healthy women. **Menopause**, v.77, p.477-80. 2002.

FERREIRA, A.C.P.; MONTES, M.B.A; FRANCESCHINI, S.A.; TOLOI, M.R.T. Third-generation progestogen type influences hemostatic changes caused by oral contraceptives in Brazilian women. **Contraception**, v. 64, p.353–356. 2001.

FRANCO, R.F. & REITSMA, P.H. Genetic risk factors of venous thrombosis. **Human Genetics**, v. 109, p.369–384. 2001.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas** (1 ed). São Paulo: Atheneu, p.739-48. 2001.

FRISHMAN, W.H. Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**, v.104, p.18-27. 1998.

FRYE, C.A. An overview of oral contraceptives: Mechanism of action and clinical use. **Neurology**, v.66, p.29–S36. 2006.

FUHRMANN, U.; KRATTENMACHER, R.; SLATER, E.P.; FRITZEMEIER, K.H. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. **Contraception**, v.54, p.243–51. 1996.

GASPARD, U.J. Metabolic effects of oral contraceptives. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.157, p.1029 – 41. 1987.

GERSTMAN, B.B.; PIPER, J.M. & TOMITA, D.K. Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. **American Journal of Epidemiology**. v. 133,p.32–7.1991.

GODSLAND, I.F. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974–2000. **Fertility and Sterility**. ,v. 75,p.898–915. 2001.

GOLDHABER, M.D. & SAMUEL, Z. Risk Factors for Venous Thromboembolism. **Journal of the American College of Cardiology**., v. 56, p.1-7. 2010.

GORDON, T.; CASTELLI, W. P.; HJORTLAND, M. C.; KANNEL, W. B. & DAWBER, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. **American Journal of Medicine**. v.62,p. 707–714.1977.

GRAHAM, S & FRASER, I.S. The progestogen-only mini-pill. **Contraception**. v.26,p.373–388. 1982.

GUETTA ,V.; QUYYUMI, A.A.; PRASAD, A.; WACLAWIW, M.; CANNON, R.O. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women.**Circulation**. ,v.96,p.2797-2801.1997.

GUIDA, M.; BIFULCO, G.; DI SPIEZIO SARDO, A.; SCALA, M.; FERNANDEZ, L.M.; NAPPI, C. Review of the safety, efficacy and patient acceptability of the combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill. **Internal Journal of Womens Health**. v.2, p.279-90. 2010.

HAMMOND, G.L.; RABE, T.; WAGNER, J.D. Preclinical profiles of progestins used in formulations of oral contraceptives and hormone replacement therapy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**.,v.185,p.24–31. 2001.

HATHAWAY, W.E.Clinical aspects of antithrombin II deficiency.**Seminars in Hematology**.,v. 28,p.19-23. 1991.

HEDON, B. The evolution of oral contraceptives. Maximizing efficacy,minimizing risks. **Acta Obstetricia at Gynecologica Scandinavica**.,v.152(1),p. 7 –12.1991.

HELLGREN, M.; CONARD, J.; NORRIS, L.; KLUFT, C. Cardiovascular risk markers during treatment with estradiol and trimegestone or dydrogesterone. **Maturitas**,v.62, p.287–293. 2009.

HEMELAAR, M.; VAN DER MOORENK M.J.; VAN BAAL, W.M.; SCHALKWIJK, C.G.; KENEMANS, P.; STEHOUWER, C.D. Effects of transdermal and oral postmenopausal hormone therapy on vascular function: a randomized, placebo-controlled study in healthy postmenopausal women. **Menopause**. v.12,p. 526-535. 2005.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**.,v.16,p.17-20. 2003.

HONG, M. K.; ROMM, P. A.; REAGAN, K.; GREEN, C. E.; RACKLEY, C. E. Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. **American Journal of Cardiology**.,v.69,p.176–178.1992.

HORTON, T.J.; COMMERFORD, S.R.; PAGLIASSOTTI, M.J.; BESSESEN, D.H. Postprandial leg uptake of triglyceride is greater in women than in men. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**.,v. 283,p.1192–1202. 2002.

HUBER, J.; FOIDART, J.M.; WUTTKE, W.; MERKI-FELD, G.S.; THE, H.S.; GERLINGER, C.; SCHELLSCHMIDT, I.; HEITHECKER, R. Efficacy and tolerability of a monophasic oral contraceptive containing ethinylestradiol and drospirenone. **The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**.,v.5, p.25–34. 2000.

HUITEMA, B. E. The analysis of covariance and alternatives. New York: **Wiley**, 1980.

HUO, Y.; LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. **Acta Physiologica Scandinavica**., v.173,p.35-43. 2001.

HWANG ,S.J.; BALLANTYNE, C.M.; SHARRETT, A.R.; SMITH, L.C.; DAVIS, C.E.; GOTTO, A.M. JR, BOERWINKLE, E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. **Circulation**.,v. 96, p.4219-4225.1997.

IKEDA, H.; NAKAYAMA, H.; ODA, T.; KUWANO, K.; MURAISHI, A.; SUGI, K.; KOGA, Y.; TOSHIMA, H. Soluble form of P selectin in patients with acute myocardial infarction. **Coronary Artery Disease**.,v. 5, p.515-8.1994.

JILMA, B.; FASCHING, P.; RUTHNER, C.; RUMPLMAYR, A.; RUZICKA, S.; KAPIOTIS, S. WAGNER, O.F.; EICHLER, H.G. Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus. **Thrombosis and Haemostasis**.,v.76, p.328-32, 1996.

JORDAN, W.M. Pulmonary embolism. **Lancet**.v.ii.p.1146-1147. 1961.

KANNEL, W.B. Overview of hemostatic factors involved in atherosclerotic cardiovascular disease. **Lipids**, v.40, p.1215-20. 2005.

KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood**, 1;88(9):3259-87, 1996.

KEMMEREN, J.M.; ALGRA, A.; GROBBEE, D.E. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta analysis. **British Medical Journal**, 323:131-4, 2001.

KEMMEREN, J.M.; ALGRA, A.; MEIJERS, J.C.; TANS, G.; BOUMA, B.N.; CURVES, J.; ROSING, J.; GROBBEE, D.E. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on the protein C system in the absence or presence of the factor V Leiden mutation: a randomized trial. **Blood**, v.103, p.927-3. 2004.

KERNOHAN, A.F.; SPIERS, A.; SATTAR, N.; HILLIER, C.; CLELAND, S.J.; SMALL, M.; LUMSDEN, M.A.; MCCONNELL, J.; PETRIE J.R. Effects of low-dose continuous combined HRT on vascular function in women with type 2 diabetes. **Diabetes & Vascular Disease Research**. v. 1, p.82-88. 2004.

KHADER, Y.S.; RICE, J.; JOHN, L.; ABUEITA, O. Oral contraceptives use and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. **Contraception**. v.68(1), p. 11-7. 2003.

KIRK, G.; ELHADD, T.A.; MCLAREN, M.; GREENE, S.A.; BELCH, J.J.F. Children and adolescents with diabetes mellitus have higher soluble E selectins and ICAM - 1 levels than matched controls. **Thrombosis and Haemostasis**. v.77(6), p.142. 1997.

KLIPPING, C. & MARR, J. Effects of two combined oral contraceptives containing ethinyl estradiol 20 µg combined with either drospirenone or desogestrel on lipids, hemostatic parameters and carbohydrate metabolism. **Contraception**, v.71, p.409-16. 2005.

KLUFT, C. Determination of prekallikrein in human plasma: optimal conditions for activating prekallikrein. **The Journal of Laboratorial and Clinical Medicine**. v.91, p.83-95. 1978.

KLUFT, C.; ENDRIKAT, J.; MULDER, M.S.; GERLINGERB, C.; HEITHECKER, R. A prospective study on the effects on hemostasis of two oral contraceptives containing drospirenone in combination with either 30 or 20 µg ethinylestradiol and a reference containing desogestrel and 30 µg ethinylestradiol. **Contraception**, v. 73, p. 336- 343. 2006.

KNOPP, R. H. , ZHU, X. & BONET, B. Effects of estrogens on lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women. **Atherosclerosis** , v.110, p. s83-s91.1994.

KNOWLSON, L.; BACCHU, S.; PANEESHA, S.; MCMANUS, A.; RANDALL, K.; ROSE, P. Elevated D-dimers are also a marker of underlying malignancy and increased mortality in the absence of venous thromboembolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63(9), p.818-2.2010.

KOH, K.K.; MCDONALD, K. H. & CANNON, E. O. Effects of Hormone Replacement Therapy on Coagulation, Fibrinolysis, and Thrombosis Risk in Postmenopausal Women **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 626 -633. 1999.

KRAAIJENHAGEN, R.A.; IN'T ANKER, P.S.; KOOPMAN, M.M.; REITSMA, P.H.; PRINS, M.H.; VAN DEN ENDE, A.; BÜLLER, H.R. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**, v.83, p.5-9. 2000.

KRATTENMACHER, R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. **Contraception**, v.62, p.29 –38. 2000.

KRAUSS, R.M. & BURKMAN, R.T. The metabolic impact of oral contraceptives. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, p.1177– 84.1992.

LAMON-FAVA, S.; POSTFAI, B.; DIFFENDERFER, M.; DELUCA, C.; O'CONNOR, J.R.J.; WELTY, F.K.; DOLNIKOWSKI, G.G.; BARRETT, P.H.; SCHAEFER, E.J. Role of the estrogen and progestin in hormonal replacement therapy on apolipoprotein A-I kinetics in postmenopausal women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p.385–391. 2006.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. **Trends in Cardiovascular Medicine**. v. 15, p.254–259. 2005.

LEWINGTON, S.; WHITLOCK, G.; CLARKE, R.; SHERLIKER, P.; EMBERSON, J.; HALSE, J.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. **Lancet**, v. 370, p.1829–1839. 2007.

LEY, K. Molecular mechanism of leukocyte recruitment in inflammatory process. **Cardiovascular Research**, v.32, p.733-42. 1996.

LIBBY, P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. **Journal of Internal Medicine**, v.263, p.517–527. 2008.

LIDEGAARD, O.; EDSTRÖM, B. & KREINER S. Oral contraceptives and venous thromboembolism. A five-year national case-control study. **Contraception**, v. 65, p.187-96. 2002.

LINDAHL, U. Heparan sulfate-protein interactions: a concept for drug design? **Thrombosis and Haemostasis**,v. 98,p.109-115. 2007.

LINDBERG, U.B.; CRONA, N.; STIGENDAL, L.; TEGER-NILSSON, A.C.; SILFVERSTOLPE, G. A comparison between effects of estradiol valerate and low dose ethinyl estradiol on haemostasis parameters. **Thrombosis and Haemostasis**, 61:65–9, 1989.

LIP, G.Y.H. Fibrinogen and cardiovascular disorders. **Quartely Journal of Medicine**,v.88, p.155-65. 1995.

LUND-KATZ, S. & PHILLIPS, M. C. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. **Subcellular Biochemistry**,v. 51,p. 183–227. 2010.

LUSIS A.J. Atherosclerosis. **Nature**,v.407, p.233-41. 2000.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**. v.202, p.498–499. 1964.

MACHADO, R.B.;MELO, N.R.; JUNIOR, H.M.;CRUZ, A.M.Effect of a continuous regimen of contraceptive combination of ethinylestradiol and drospirenone on lipid, carbohydrate and coagulation profiles.**Contraception**. v. 81,p. 102–106. 2010.

MACKMAN, N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. **Anesthesia and Analgesia**,v.108, p.1447 – 1452. 2009.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**. v. 451,p.914-918. 2008.

MAGKOS, F. & MITTENDORFER, B. Gender differences in lipid metabolism and the effect of obesity. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**,v. 36, p.245–265. 2009.

MAGKOS, F.; PATTERSON, B.W.; MOHAMMED, B.S.; KLEIN, S.; MITTENDORFER, B. Women produce fewer but triglyceride-rich very low-density lipoproteins than men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 92:,p.311– 1318. 2007.

MAMMEN, E.F. Oral contraceptive pills and hormonal replacement therapy and thromboembolic disease. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**. v.14(5), p.1045-59. 2000.

MARGOLIS, K.L.; ADAMI, H.O.; LUO, J.; YE, W.; WEIDERPASS, E. A prospective study of oral contraceptive use and risk of myocardial infarction among Swedish women. **Fertility Sterility**, v. 88, p.310–6. 2007.

MARTIJN, F.B.G. ; BAREND, B. ; COEN M. ; BONNO N.B. Physiological responses to protein aggregates: Fibrinolysis, coagulation and inflammation (new roles for old factors) **FEBS Letters**, v.583, p. 2691– 2699. 2009.

MEIJERS, J.C.; MIDDELDORP, S.; TEKELENBURG, W.; VAN DEN ENDE, A.E.; TANS, G.; PRINS, M.H.; ROSING, J.; BULLER, H.R.; BOUMA, B.N. Increased Fibrinolytic Activity during Use of Oral Contraceptives Is Counteracted by an Enhanced Factor XI-independent down Regulation of Fibrinolysis. **Thrombosis and Haemostasis**. v.84, p. 9–14. 2000.

MENDELSON, M. E. & KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**. v.340, p.1801–1811. 1999.

MENG, H.; MARCHESE, M.J.; GARLICK, J.A.; JELASKA, A.; KORN, J.H.; GAILIT, J.; CLARK, R.A.; GRUBER, B.L. Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. **Journal of Investigate Dermatology**. v. 105(6), p.789-96. 1995.

MIDDELDORP, S.; MEIJERS, J.C.; VAN DEN ENDE, A.E; VAN ENK A, BOUMA, B.N.; TANS, G.; ROSING, J.; PRINS, M.H.; BÜLLER, H.R Effects on coagulation of levonorgestrel- and desogestrel-containing low dose oral contraceptives: A cross-over study. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 84, p.4-8. 2000.

MIKKOLA, T.; TURUNEN, P.; AVELA, K.; ORPANA, A.; VIINIKKA, L.; YLIKORKKALA, O. 17 β -estradiol stimulates prostacyclin, but not endothelin-1, production in human vascular endothelial cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, p.1832–1836. 1995.

MILLER, J.; KNORR, R.; FERRONE, M.; HOUEI, R.; CARRON, C.P.; DUSTIN, M.L. Intercellular adhesion molecule 1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated 1. **Journal of Experimental Medicine**. v. 182, p.1231–41. 1995.

MISHELL, J.R. An oral contraceptive with 3 approved indications. **The Journal of Reproductive medicine**. v.53, p.717–9. 2008.

MIYAGAWA, K.; ROSCH, J.; STANEZYK, F.; HERMSMEYER K. Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. **Nature Medicine**. v. 3, p.324-327. 1997.

NABULSI, A. A.; FOLSOM, A. R.; WHITE, A.; PATSCH, W.; HEISS, G.; WU, K. K.; SZKLO, M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. **The New England Journal of Medicine**.v. 328,p. 1069–1075. 1993.

NAVAB, M.; REDDY, S.T.; VAN LENTEN, B.J.; FOGELMAN, A.M. **Nature Reviews Cardiology**. v.8,p. 222–232 .2011.

NELSON,D.L.; COX,M.M. Lipids.In: **Lehninger principles of biochemistry**. 3 ed.New York: Worth publishers, cap11,p.363-88, 2000.

NEW, G.; TIMMINS, K.L.; DUFFY, S.J.; TRAN, B.T.; O'BRIEN, R.C.; HARPERR,W.; MEREDITH, I.T. Long-term estrogen therapy improves vascular function in male to female transsexuals. **Journal of the Americam College of Cardiology**. v.29,p. 1437–1444. 1997.

NORRIS, L.A. Blood coagulation.**Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology**.v.17, p.369-83. 2003.

ODLIND, V.; MILSOM, I.; PERSSON, I.; VICTOR, A. Can changes in sex hormone binding globulin predict the risk of venous thromboembolism with combined oral contraceptive pills? **Acta Obstetricia and Gynecologia Scandinavia**.v. 81, p.482–90. 2002.

OELKERS, W.H. Drospirenone in combination with estrogens: for contraception and hormone replacement therapy. **Climacteric**.v. 8, p.19–27. 2005.

OWENS, P.A. & MACKMAN,N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here **Thrombosis and Haemostasis**, v.104,p. 432-9. 2010.

PARISE, L., SMYTH, S. & COLLER B. Platelet morphology, biochemistry, and function. **McGraw-Hill Professional**, New York. 2005.

PAULO, M.; SALVADOR, M.M.; DOS ANJOS NETO FILHO, M.; MONTES, M.B.; FRANCESCHINI, S.A.; TOLOI, M.R. Effect of isoflavone extract on human endotelial cell damage and nitric oxide production.**Menopause**. v.16(3),p.539-44. 2009.

PETITTI, D.B. Clinical practice. Combination estrogen-progestin oralcontraceptives.**The New England Journal of Medicine**. v.349,p.1443–50. 2003.

POORT, S.R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and na increase in venous thrombosis. **Blood**.v. 88.p. 3698-3703. 1996.

RAPAPORT, S.I. Hemostatic mechanisms. Introduction to hematology. 2 ed. **Philadelphia, J.B. Lippincott Company**. v. 23, p.432-69. 1987.

RAPKIN, A.J.; WINER, S.A. Drospirenone: a novel progestin. **Expert Opinion on Pharmacotherapy** .v. 8, p.989–99. 2007.

REDDY, N.M.;HALL, S.W.;MACKINTOSH, F.R. Partial thromboplastin time: prediction of adverse events and poor prognosis by low abnormal values. **Archives of Internal Medicine**.v.159(22), p.2706–10. 1999.

REILLY, P.L.; WOSKA, J.R.; JEANFAVRE, D.D.; MCNALLY, E.; ROTHLEIN, R.; BORMANN, B.J. The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer.Correlation with binding to LFA-1. **Journal of Immunology**.v.155,p. 529–32. 1995.

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; ROITMAN-JOHNSON, B.; STAMPFER, M.J.; ALLEN, J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. **Lancet**. v.351, p.88-92. 1998.

RIFICI, V. A. & KHACHADURIAN, A. K. The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17- β estradiol. *Metabolism. Clinical and Experimental*.v. 41, p.1110–1114. 1992.

RIOS, D.R.; RODRIGUES, E.T.; CARDOSO, A.P.; MONTES, M.B.; FRANCESCHINI, S.A; TOLOI, M.R. Lack of effects of isoflavones on the lipid profile of Brazilian postmenopausal women *Nutrition*. v.24(11-12), p.1153-8. 2008.

ROCHA, V. Z. & LIBBY, P. **Nature Reviews Cardiology**. v. 6, p.399–409. 2009.

ROSENDAAL, F.R. Venous Thrombosis:The Role of Genes, Environment, and Behavior . **Americam Society of Hematology Education Program**. p. 1-12. 2005.

ROSING, J.; CUVERS, J.; TANS, G. Oral contraceptives, thrombosis and haemostasis. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine**. v.95, p.193-7. 2001.

ROTT, L.S.; BRISKIN, M.J.; ANDREW, D.P.; BERG, E.L.; BUTCHER, E.C. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation. **Journal of Immunology**, v.156(10), p.3727-36. 1996.

SACK, M. N.; RADER, D. J. & CANNON, R. O. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. **Lancet**. v.343, p.269–270. 1994.

SANO, H.; NAKAGAWA, N.; NAKAJIMA, H.; YOSHIDA, S.; IWAMOTO, I. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in selective eosinophil migration across vascular endothelial cells. **International Archives of Allergy and Immunology**. v.107(4), p.533-40. 1995.

SAULS, D.L.; BANINI, A.E.; BOYD, L.C.; HOFFMAN, M. Elevated prothrombin level and shortened clotting times in subjects with type 2 diabetes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v.5(3), p.638–9. 2007.

SCHWARZ, H.P.; FISCHER, R. M.; HOPMEIER, P.; BATARD, M.A.; GRIFFIN, J.H. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. **Blood**. v.64, p.1297-1300. 1984.

SEEGER, H.; PETERSEN, G.; SCHULTE-WINTROP, E.; TEICHMANN, A.T.; MUECK, A.O. Effect of two oral contraceptives containing ethinylestradiol and levonorgestrel on serum and urinary surrogate markers of endothelial function. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v. 40, p. 150-157. 2002.

SILVERBERG, M. & DIEHL, S.V. The autoactivation of factor XII (Hageman factor) induced by low-Mr heparin and dextran sulphate. The effect of the Mr of the activating polyanion. **Biochemistry Journal**. v.248, p. 715–720. 1987.

SILVERBERG, M. Hageman factor activation by polysaccharides: effect of molecular weight. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.247, p. 453–460. 1989

SITRUK-WARE, R. New progestagens for contraceptive use. **Human Reproduction Update**. v.12, p.169–78. 2006.

SITRUK-WARE, R. Pharmacological profile of progestins. **Maturitas**. v. 61, p.151–7. 2008.

SKOUBY, S.O. & PETERSEN, K.R. Clinical experience with the recently developed progestogens. **International Journal of Fertility**. v. 36(1), p.32–7. 1991.

SOARES, G.M.; VIEIRA, C.S.; DE PAULA MARTINS, W.; DOS REIS, R.M.; DE SA, M.F.; FERRIANI, R.A. Metabolic and cardiovascular impact of oral contraceptives in polycystic ovary syndrome. **International Journal of Clinical Practice**. v. 63, p. 160–169. 2009.

SPEROFF, L. & DE CHERNEY, A. Evaluation of a new generation of oral contraceptives. The Advisory Board for the New Progestins. **Obstetrics and Gynecology**. v. 81, p.1034–47. 1993.

SPONA, J.; FEICHTINGER, W.; KINDERMANN, C.; MOORE, C.; MELLINGER, U.; WALTER, F.; GRÄSER, T. Modulation of ovarian function by an oral contraceptive containing 30 micrograms ethinylestradiol in combination with 2.00 mg dienogest. **Contraception**. v. 56, p.185–91. 1997.

STECK, T. L. & LANGE, Y. Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. **Trends in Cell Biology**. v. 20, p. 680–687. 2010.

STEGNAR, M.; VENE, N. & BOZIC, M. Do haemostasis activation markers that predict cardiovascular disease exist? **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**. v. 33, p.302–8. 2004.

TAMURA, N.; KITAJIMA, I.; KAWAMURA, Y.; TODA, E.; EGUCHI, Y.; ISHIDA, H.; GOTO, S. Important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombin formed under arterial blood flow conditions. **Circulation Journal**. v.73, p. 540 – 548. 2009.

TANEEPANICHSKUL, S. & PHUPONG, V. Influence of a new oral contraceptive with DRSP on lipid metabolism. **Gynecological Endocrinology**. v. 23(6), p.347–350. 2007.

TANS, G.; CURVERS, J.; MIDDELDORP, S.; THOMASSEN, M.C.; MEIJERS, J.C.; PRINS, M.H.; BOUMA, B.N.; BÜLLER, H.R.; ROSING, J. A randomized cross-over study on the effects of levonorgestrel and desogestrel-containing oral contraceptives on the anticoagulant pathways. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 84, p.15–21. 2000.

TATSUMI, H.; KITAWAKI, J.; TANAKA, K.; HOSODA, T.; HONJO, H. Lack of stimulatory effect of dienogest on the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by endothelial cell as compared with other synthetic progestins. **Maturitas**. v. 42, p. 287–294. 2002.

TAYLOR, F.B.; PEER, G.T.; LOCKHART, M.S.; FERRELL, G.; ESMON, C.T. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation *in vivo*. **Blood**. v. 97, p.1685–1688. 2001.

TCHAIKOVSKI, N.S.; ROSING, J. Mechanisms of Estrogen-Induced Venous Thromboembolism **Thrombosis Research**. v. 126, p.5 – 11. 2010.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB Journal**. v.9, p.866–873. 1995.

TEICHMANN, A. & CORBIN, A. Clinical experience with a monophasic oral contraceptive containing 150 µg levonorgestrel and 30 µg ethinylestradiol: efficacy, tolerance, and metabolic interactions. Levonorgestrel, **Thieme**. p.81–91. 1998

TEICHMANN, A. Pharmacology of estradiol valerate/dienogest. **Climacteric**. v. 6,p.17–23. 2003.

THE WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: the postmenopausal estrogen/progestin interventions(PEPI) trial.**JAMA**.v.203, p.199-208. 1995.

TOY, J.L.; DAVIES, J.A.; HANCOCK, K.W.; MCNICOL, G.P. The comparative effects of a synthetic and a 'natural' oestrogen on the haemostatic mechanism in patients with primary amenorrhoea. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 85, p.359–62,.1978.

TRIPODI, A. & MANNUCCI, P.M. Activated partial thromboplastin time (APTT). New indications for an old test? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v.4(4), p.750–1. 2006.

TRIPODI, A.; CHANTARANGKUL, V.; MARTINELLI, I.; BUCCIARELLI,P.; MANNUCCI, P.M. A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thromboembolism. **Blood**. v.104(12), p.3631–4. 2004.

TRUSSELL, J.; HATCHER, R.A.; STEWART, F. Contraceptive efficacy. **Contraceptive Technology**. v.18,p. 773–845. 2004.

VALERIE, L.N.G. Prothrombin Time and Partial Thromboplastin Time Assay Considerations. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 29, p.253–263. 2009.

VAN DER GRAAF, F.; KEUS, F.J.; VLOOSWIJK, R.A.; BOUMA, B.N. The contact activation mechanism in human plasma: activation induced by dextran sulfate. **Blood**. v. 59, p. 1225–1233. 1982.

VAN DER STEEG, W.A.; HOLME, I.; BOEKHOLDT, S.M.; LARSEN, M.L.; LINDAHL, C.; STROES, E.S.; TIKKANEN, M.J.; WAREHAM, N.J.; FAERGEMAN, O.; OLSSON, A.G.; PEDERSEN, T.R.; KHAW KT KASTELEIN, J.J. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for cardiovascular risk. The IDEAL and EPIC-Norfolk studies. *Journal of American College Cardiology*. v.51, p. 634–642. 2008.

VAN HYLCKAMA, V.A.; HELMERHORST, F.M.; VANDENBROUCKE, J.P.; DOGGEN, C.J.; ROSENDAAL, F.R. The venous thrombotic risk of oral contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. **British Medical Journal**.v. 339, p.2921. 2009.

VAN OOSTEN, M.; VAN DE BILT ,E.; DE VRIES, H.E.; VAN BERKEL ,T.J.; KUIPER, J. Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. **Hepatology**. v.22(5), p.1538-46. 1995.

VAN TILBURG, N.H.; ROSENDAAL, F.R.; BERTINA, R.M. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. **Blood**.v. 95, p.2855-2859. 2000.

VAN ZONNEVELD, A.J.; VEERMAN, H.; PANNEKOEK, H. On the interaction of the finger and the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. Inhibition of kringle-2 binding to fibrin by epsilon-amino caproic acid. **Journal of Biological Chemistry**. v.261, p. 14214 -14218. 1986.

VIRCHOW, R.L.K. Phlogose und thrombose im Gefäßsystem. **Gesammelte Abhandlung zur WissenschaftlichenMedizin**. Franksfurt, Germany: Staatsdruckerei, 1856.

WALSH, B.W. & SACKS,F.M. Effects of low dose oral contraceptives in very low density and low density lipoprotein metabolism. **Journal of clinical Investigation**. v. 91, p.2126–2132. 1993.

WALSH, B.W.; SCHIFF, I.; ROSNER, B.; GREENBERG, L.; RAVNIKAR, V.; SACKS,F.M . Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. **The New England Journal of Medicine**. v. 325, p.1196–1204. 1991.

WANG, X.; MAGKOS, F.; MITTENDORFER, B. Sex Differences in Lipid and Lipoprotein Metabolism:It's Not Just about Sex Hormones **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**.v. 96, p. 885–893. 2011.

WELCH, B. L. The generalization of "Student's" problem when several different population variances are involved. **Biometrika**.v. 34 (1–2), p. 28-35. 1947

WIEGRATZ, I.; LEE, J.H.; KUTSCHERA, E.; WINKLER, U.H.; KUHL, H. Effect of four oral contraceptives on hemostatic parameters. **Contraception**. v. 70, p.97–106. 2004.

WILLIAMSON, D.F.;PARKER, R.A.; KENDRICK, J.S. The box plot: a simple visual method to interpret data. **Annals Internal Medicine**.v. 110 (11), p.916-21. 1989.

WINKLER, U.H.; RÖHMB, P. & HÖSCHENB, K. An open-label, comparative study of the effects of a dose-reduced oral contraceptive containing 0.02 mg ethinylestradiol/2 mg chlormadinone acetate on hemostatic parameters and lipid and carbohydrate metabolism variables. **Contraception**. v.81, p. 391–400. 2010.

WOLFE, B.M. & HUFF, M.W. Effects of combined estrogen and progestin administration on plasma lipoprotein metabolism in postmenopausal women. **Journal of Clinical Investigation**. v. 83, p.40–45. 1989.

WOLFE, B.M. & HUFF, M.W. Effects of low dosage progestin-only administration upon plasma triglycerides and lipoprotein metabolism in postmenopausal women. **Journal of Clinical Investigation**. v.92, p.456–461. 1993.

WOLFE, B.M. & HUFF, M.W. Effects of continuous low-dosage hormonal replacement therapy on lipoprotein metabolism in postmenopausal women. **Metabolism** v.44, p.410–417. 1995.

WOLFE, B.M.; BARRETT, P.H.; LAURIER, L.; HUFF, M.W. Effects of continuous conjugated estrogen and micronized progesterone therapy upon lipoprotein metabolism in postmenopausal women. **Journal of Lipid Research**. v.41(3), p.368-75. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION COLLABORATIVE STUDY OF CARDIOVASCULAR DISEASE AND STEROID HORMONE CONTRACEPTION. Cardiovascular disease and use of oral and injectable progestogen-only contraceptives and combined injectable contraceptives. Results of an international, multicenter, casecontrol study. **Contraception**. v. 7, p.31S-324. 1998.

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**. v.346(8990), p. 1575-82. 1995a.

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**. v. 346(8990), p. 1582-8. 1995b.

YEBOAH, J.; KLEIN, K.; BROSNIHAN, B.; REBOUSSIN, D.; HERRINGTON, D.M. Effects of hormone therapy on soluble cell adhesion molecules in postmenopausal women with coronary artery disease. **Menopause**. v.15(6), p. 1060-1064. 2008.

YILDIZHAN, R.; YILDIZHAN, B.; ADALI, E.; YORUK, P.; BIROL, F.; SUER, N. Effects of two combined oral contraceptives containing ethinyl estradiol 30 µg combined with either gestodene or drospirenone on hemostatic parameters, lipid profiles and blood pressure. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. v. 280, p.255–261. 2009.

YVAN-CHARVET, L.; WANG, N. & TALL, A. R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 30, p.139–143. 2010.

7. Anexos

Anexo A

Of. CEP 02/2008 - FCFRP/USP
rlq

Ribeirão Preto, 22 de fevereiro de 2008.

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "*Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento e a hemostasia*", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 114, foi analisado na 63ª Sessão Ordinária deste CEP, realizada no dia 22 de fevereiro de 2008 e considerado **aprovado**.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

PROF.ª, DR.ª. LUCIANA SIMON PEREIRA CROTT
Vice-Coordenadora do CEP – FCFRP/USP

Ilmo. Sr.

Prof.ª, Dr.ª. MARIA REGINA TORQUETI TOLOI

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Anexo B **Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto**

Estado de São Paulo
Secretaria da Saúde
www.saude.ribeiraopreto.sp.gov.br

OF. 2266/10 - GS
RASR/rasr

Ribeirão Preto, 21 de maio de 2010.

Senhora Orientadora,

Em atenção à solicitação de autorização para a realização do Projeto de Pesquisa intitulado **“Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre a hemostasia”**, informamos que somos favoráveis à realização do referido Projeto.

Sugerimos que no questionário a ser aplicado aos sujeitos seja incluído o item **raça/cor**, de acordo com a Portaria SAS nº 719/07.

Solicitamos que a pesquisadora mantenha contato com os Gerentes das Unidades de Saúde onde serão realizadas as pesquisas para o agendamento do início da coleta de dados e que após os resultados da pesquisa sejam repassados ao Programa de Saúde da Mulher desta Secretaria.

Com protestos de distinta consideração e elevado apreço, subscrevemo-nos.

Cordialmente,

DR. STÊNIO JOSÉ CORREIA MIRANDA
Secretário Municipal da Saúde - Substituto

ILUSTRÍSSIMA SENHORA
PROFª MARIA REGINA TORQUETI
ORIENTADORA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO -
USP
NESTA

De acordo
Henrique
28/05/10
Prof. Dr. João Terra Filho
Físico - ORL
Centro de Saúde Escola-FMESP/USP

Anexo C

Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto

Via do Café, S/N - Telefone: (016) 3633-3036
Fax: (016) 3633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar como voluntária em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Pedimos que você responda um questionário, que está junto com este documento. Em caso de recusa, você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pelo telefone (16) 3602-4213 ou pelo e-mail cep@fcrp.usp.br.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do projeto: “Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento e a hemostasia”

Pesquisador Responsável: Prof^a Dr^a Maria Regina Torqueti Toloi (torqueti@fcrp.usp.br)

Telefone para contato: (16) 3602-4220

DESCRIÇÃO DA PESQUISA AO VOLUNTÁRIO SADIO

Existem proteínas no sangue que evitam coágulos a formação de coágulos no interior dos vasos sanguíneos e outras que desmancham o coágulo caso ele seja formado. Normalmente estas proteínas atuam em equilíbrio, para evitar o entupimento dos vasos sanguíneos. Dentre estas estão as proteínas que fazem parte da coagulação e outras que são chamadas de proteínas do sistema complemento. Há casos em que a ação destas proteínas pode ser alterada quando as pessoas fazem uso de medicamentos. Por exemplo, o uso de anticoncepcionais, também chamados de contraceptivos hormonais ou pílulas, pode aumentar o risco de formação de coágulos no interior dos vasos sanguíneos, que é um problema conhecido como trombose. Este risco é maior ainda em mulheres que tomam anticoncepcionais e têm problemas de saúde causados por alterações hormonais, inflamação ou, ainda, casos de trombose na família.

Uma vez que as proteínas do sistema complemento também controlam a coagulação do sangue e a inflamação, o objetivo desta pesquisa é medir a atividade das proteínas do sistema complemento, da coagulação e das proteínas que desmancham o coágulo, tanto no sangue de mulheres que usam anticoncepcionais hormonais, oral ou injetável, como no sangue de mulheres que não usam, para comparar se os anticoncepcionais estão alterando a ação destas proteínas. Também será estudado se os anticoncepcionais hormonais

Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto

Via do Café, S/N - Telefone: (016) 3633-3036
Fax: (016) 3633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

interferem na função de uma célula do sangue, o neutrófilo. A função desta célula está relacionada com as proteínas do sistema complemento e é muito importante para a inflamação.

Para medir estas proteínas e a função da célula (o neutrófilo), as voluntárias, que concordarem em participar deste estudo, deverão doar 24 (vinte e quatro) ml de sangue (3 tubos). O sangue será colhido de uma veia do braço, por uma pessoa do laboratório com bastante experiência em tirar sangue das pessoas. Será sempre utilizado material estéril e descartável, isto é, devidamente limpo e livre de contaminação. O único desconforto desta coleta será apenas a picada da agulha para tirar o sangue. Às vezes, pode aparecer um hematoma no local onde foi dada a picada da agulha, o que normalmente não traz problemas para a pessoa.

Ao participar desta pesquisa, você estará contribuindo para um estudo do efeito dos anticoncepcionais sobre as proteínas do sistema complemento, que também controlam a coagulação e a inflamação, e sobre a função do neutrófilo. Esta pesquisa oferece como benefício a oportunidade de analisar se o uso de anticoncepcionais pode estar alterando estas proteínas e a função do neutrófilo no seu sangue. Se você participar como uma voluntária que não usa anticoncepcional hormonal, a medida das proteínas no seu sangue e a função do neutrófilo serão importantes como controles para compararmos com aquelas das voluntárias que usam o anticoncepcional.

Precisamos que você responda um questionário informando alguns dados pessoais e sobre o uso de anticoncepcionais. O seu nome será sempre mantido em sigilo (segredo) e você terá a liberdade de desistir de participar desta pesquisa a qualquer tempo, não sendo penalizada de forma alguma. Esclarecemos, também, que você não terá nenhuma despesa ao participar deste estudo. Você também terá a liberdade de procurar os pesquisadores responsáveis a qualquer momento para saber sobre o andamento da pesquisa. Quando a pesquisa terminar, somente os resultados, e nunca a sua identidade, serão publicados em revistas científicas.

Favor ler e preencher abaixo, se for do seu consentimento

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo acima descrito, como sujeito. Fui devidamente informada e esclarecida pelas pesquisadoras Prof^a. Dr^a. Maria Regina Torqueti Toloi e/ou Prof^a. Dr^a. Cleni Mara Marzocchi Machado sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Prof^a. Dr^a. Maria Regina Torqueti Toloi
Pesquisadora Responsável / CPF 930142608-00
DACTB – FCFRP – USP

Nome e Assinatura da Voluntária

Anexo D

Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto

Via do Café, S/N - Telefone: (016) 3633-3036
Fax: (016) 3633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Título do projeto: “Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento e a hemostasia”

QUESTIONÁRIO

Nome da Voluntária: _____

Data de nascimento: _____ Nacionalidade: _____

RG: _____ CPF: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

Qual a data de sua última menstruação? _____

Qual é o seu peso? _____

Quantas horas você dorme por noite? _____

Você se alimenta regularmente, faz todas as refeições diárias? _____

Você come cereais, carne, frutas e legumes todos os dias? _____

Você faz exercícios físicos regularmente, pratica algum esporte? Quantas vezes na semana? _____

Você fuma? () sim () não Há quanto tempo? _____

Você toma anticoncepcionais hormonais? () sim () não

Qual o nome do anticoncepcional? _____

Há quanto tempo você toma anticoncepcional? _____

Há quanto tempo você toma este anticoncepcional? _____

Você toma este anticoncepcional sob orientação médica? () sim () não

Se você não toma anticoncepcional, já tomou anteriormente? () sim () não

Se tomou anteriormente, há quanto tempo está sem tomar anticoncepcional? _____

Você toma outros medicamentos? () sim () não

Quais são os outros medicamentos que você toma? _____

Você tomou algum medicamento nos últimos 15 dias? () sim () não

Você se lembra o nome do medicamento? _____

Você se lembra porque tomou este medicamento? _____

Você conhece alguém na sua família que já teve doenças causadas pela formação de coágulos nos vasos sanguíneos (entupimento dos vasos ou um problema chamado de trombose)? () sim () não Qual o grau de parentesco? _____

Anexo E

Pacientes	Idade	IMC	Prática exercícios	Período de uso contraceptivo	Histórico de trombose família	Alimentação saudável	Fator VII	TP	Fator XII	TTPA	Fibrinogênio	Fator 1+2	Proteína S	Proteína C	Antitrombina	Ddímeros	PAI 1	ICAM	V CAM	E-selectina
1	30	24,7	Não		Sim	Sim	112,6	15,3	115	32,1	243,2	118,7	134,36	123,6	101,8	0,1	2,8	84,67294	644,9802	13,86742
2	27	20,2	Sim		Sim	Sim	112,6	14,3	94,9	30,2	268,9	153,93	125,28	96,4	106,2	0,18	1,8	168,4783	463,7604	20,20455
3	31	29,3	Não		Não	Sim	180	13,9	108,2	26,3	249		188,34	113,1	93,5	0,26	2,2	179,0926	284,5022	11,48334
4	28	24,3	Sim		Não	Sim	47,8	15,6	60,6	34	224,2	81,349	150,49	84,3	71,3	0,54	2,4	126,8396	403,4348	22,42357
5	27	20,2	Não		Não	Sim	194,4	14,3	45,8	28,4	259,6	112,1	128,1	114,1	103,9	0,13	2	148,6089	638,7864	28,7214
6	27	19,4	Não		Não	Não	108,9	14,6	81,6	32,4	249	58,919	139,18	111,1	95,3	0,12	2,2	96,59996	636,534	22,97274
7	25	20,2	Não		Sim	Sim	131,7	15	89,5	32,4	245,1	69,149	141,89	113,6	99,7	0,17	1,9	111,8871	407,901	17,27182
8	28	25	Sim		Não	Sim	124,9	14	69,8	27,6	253,1	62,653	198,36	144	105	0,12	2,8	152,3622	457,553	21,03175
9	28	23,1	Não		Sim	Não	93,8	14,2	71,3	31	218,2	132,1	131,47	115,9	94,8	0,12	2,7	132,7232	538,581	20,56884
10	25	18	Não		Sim	Sim	92,3	14,4	125,5	33,3	253,1	88,723	134,89	98,7	90,6	0,17	2,1	173,6766	587,299	18,82266
11	27	25	Sim		Não	Sim	200	13,6	193,6	28,4	268,9	160,28	161,42	167,4				179,0926	433,0948	21,5093
12	23	20,7	Não		Não	Não	103,5	14,8	50,7	34	156,1	78,545	134,36	86,1	92,6	0,18	2,8	156,3653	598,0426	23,52215
13	27	25,2	Sim		Não	Sim	131,7	14,4	49,2	34,7	179,8	131,49	119,75	95,6	90,5	0,24	2,8	126,2734	514,647	22,71927
14	24	17,4	Não		Sim	Não	127,1	15,1	62,6	36,2	245,4	64,266	127,58	106	99,1	0,24	3,3	155,3049	459,896	16,80436
15	26	21,9	Não		Não	Não	149,3	15,6	70,5	38,8	268,9	87,011	148,25	100,7	84,4	0,17	3,6	123,4426	385,5698	10,18464
16	26	25,3	Sim		Não	Sim	118,6	12,7	78,9	29,9	323,1	462,56	154,76	125,8	106,7	0,18	3,3	138,8066	613,8184	36,68975
17	24	22,5	Não		Não	Sim	64,5	14,6	158,2	26,9	339,1	108,53	124,26	116,9	80,3	0,45	2,5	176,0005	675,8372	16,40697
18	25	21	Não		Não	Sim	157,8	14,7	41,5	31,1	299,1	136,42	137,03	101,3	88,4	0,27	3,2	166,3862	583,0434	15,80676
19	28	22,7	Não		Não	Sim	95,3	17,4	164,6	26,8	279	153,93	164,66	116,3				152,8984	568,4532	17,50617
20	20	22	Não		Sim	Não	55,8	15,7	42,3	35,3	268,9	115,09	156,19	94,4	87,2	0,25	2,5	90,0762	315,8806	14,25476
21	27	25,9	Não	8 anos	Não	Sim	127,1	13,8	98,3	32	302,3	204,62	109,35	116,4	73,8	0,42	2,2	129,6562	581,2198	14,57637
22	24	22,3	Sim	5 anos	Sim	Não	157,8	13,4	173,6	27,4	323,1	140,76	130,43	102,9	100,5	0,23	1,8	128,8197	445,8378	15,0205
23	25	18,4	Não	5 anos	Não	Sim	157,8	13,2	68,3	30,4	199,1	88,152	101,06	119,5	91,1	0,18	2,2	121,4485	361,4742	22,2547
24	27	24,6	Não	4 anos	Não	Não	144	12,7	120,9	35,1	298,9	147,63	119,01	142,4	90,8	0,2	1,8	183,1958	362,4396	17,25803

Pacientes	Idade	IMC	Prática exercícios	Período de uso contraceptivo	Histórico de trombose família	Alimentação saudável	Fator VII	TP	Fator XII	TTPA	Fibrinogênio	Fator 1+2	Proteína S	Proteína C	Antitrombina	Ddímeros	PAI 1	ICAM	V CAM	E-selectina
25	27	22,9	Não	3 anos	não	Sim	166,9	14,1	104,4	30,2	231,1	77,428	116,79	113,4	93,7	0,16	1,6	69,1437	445,0568	14,41522
26	25	19,8	Não	7 anos	Não	Não	166,9	15,1	89,5	28,2	267	69,695	123,5	113,8	90,5	0,15	1,4	134,675	493,7062	4,423906
27	23	27,34	Não	1 ano	Sim	Não	131,7	12,3	98,3	28,3	284,4	87,581	119,25	120,9	99,9	0,17	1,1	169,7779	687,9508	20,42867
28	26	20,3	Não	4,5 anos	Sim	Sim	200	11,4	42,3	28,1	268,9	147,63	93,15	133,2	92,7	0,23	2,2	129,6562	407,0078	5,579064
29	29	24,1	Sim	1 ano	Sim	Não	200	11,4	152	27,9	388,9	115,69	118,51	136,1	77,8	0,26		129,0986	373,0596	15,94278
30	25	25	Não	3 anos	Não	Sim	163,8	11,7	46,8	32,2	284,4	276,63	105,39	113,8	100,6	0,47	1,5	44,88934	462,239	24,0012
31	21	27,4	Sim	1 ano	Não	Não	173,3	12,4	120,9	26,5	255,2	222,75	134,63	124,9	87,6	0,46	2,4	96,29554	384,645	6,16384
32	23	24,03	Sim	10 anos	Não	Sim	122,7	12,6	78	29,8	249	65,345	133,57	113,5	95	0,18	0,8	112,4726	307,7568	11,90928
33	21	19,53	Sim	1 ano	Não	Sim	136,4	13,5	94,9	31,8	334,9	89,868	111,24	97,4	85,6	0,29	0,9	178,3196	653,145	13,2178
34	27	24,02	Sim	3 anos	Não	Sim	200	11	144,3	30	352,4	126,59	128,61	117,4	103	0,29	1,5	145,8999	337,4778	15,43994
35	20	23,66	Não	2 anos	Não	Não	200	11,9	125,5	31,9	383,1	97,373	90,81	117,6	85,9	0,38	0,9	94,4309	361,4742	14,04081
36	22	21,23	Não	4 anos	sim	Não	101,8	11,7	109,5	26,7	312,3		105,16	132,6	78,7	0,55	2,2	152,6303	393,6092	20,47072
37	23	22,89	Sim	6 meses	Não	Sim	110,7	12	99,5	29,7	271,3	129,03	146,3	112,5	91,8	0,14	2,5	143,4577	452,867	16,80436
38	29	23,01	Sim	6 meses	Sim	Sim	122,7	11,6	117,9	25,2	326,9	111,51	120	103,8	95,8	0,26	1,9	112,4727	435,5926	10,4626
39	23	20,62	Sim	5 anos	Não	Não	141,4	12,3	138,9	28,8	299,1	112,7	90,81	126,2	79,9	0,28	2,3	147,528	385,5698	15,23698
40	22	17,53	sim	2 anos	Não	Sim	81,2	14,2	112,2	32,5	255,2	114,5	95,74	104,2	81,9	0,15	2,4	113,6438	366,3014	9,959005
41	21	24	Não	2 anos	Não	Sim	160,7	12,3	83,5	29,6	339,1	52,619	101,74	127,2	98,7	0,27	2,3	105,6196	361,4742	19,20621
42	23	25,1	Não	6 meses	sim	Sim	154,9	11,6	97,2	26,2	330,9	116,9	90,81	114,9	89,4	0,17	2,6	69,3904	412,2796	7,290641
43	23	25,6	Sim	8 meses	Não	Sim	176,6	12,6	127,1	28,9	305,5	116,29	113,4	105,9	87,9	0,4	2,3	119,3622	365,2392	8,049056
44	25	20,18	Não	6 meses	Não	Sim	127,1	12,2	87,4	27,8	139,2	126,59	126,3	99	97,4	0,43	2,5	71,67444	245,4276	8,498147
45	22	17,2	Não	6 meses	Não	Sim	173,3	12,5	72,1	37,1	250,5	155,2	101,51	94,5	94,3	0,61	2,5	86,9178	398,7606	25,49575
46	21	22,21	Não	11 meses	Sim	Não	105,3	11,9	83,5	30,8	339,1	83,606	77,3	104	82,7	0,26	2,3	135,6596	356,9032	10,89241
47	21	22,31	Não	1 ano	Não	Sim	105,3	12,2	80,7	32,8	299,1	237,73	106,31	113,3	90,1	0,62	1,8	116,0297	325,622	17,89696
48	26	19,15	Não	1 ano	Sim	Sim	71,7	13,4	88,5	28,7	268,9	62,653	83,79	117,6	93,2	0,19	1,7	133,1106	505,5362	35,31409
49	26	23,74	Não	3 anos	Não	Sim	157,8	12,3	70,5	28,1	339,1	112,1	110,77	131,2	91,6	0,33	1,8	132,8278	396,452	23,12755
50	31	22,1	Não	6 meses	Não	Sim	114,6	12,2	148,1	26,1	296	205,96	110,3	89,7	85,5	1,04	2,6	114,9271	373,4308	11,35482
51	21	19,2	Sim	3 anos	Não	Sim	114,6	12,3	108,2	27,1	273,8	169,89	105,39	122,7	101,8	0,39	2,5	121,3062	378,3458	14,09619
52	21	20,43	Não	8 meses	Não	Não	194,4	11,5	185,8	29,2	377,6	135,18	87,67	96,6	80,9	0,27	2	162,4816	392,6044	15,72915

Pacientes	Idade	IMC	Prática exercícios	Período de uso contraceptivo	Histórico de trombose família	Alimentação saudável	Fator VII	TP	Fator XII	TTPA	Fibrinogênio	Fator 1+2	Proteína S	Proteína C	Antitrombina	Ddímeros	PAI 1	ICAM	V CAM	E-selectina
53	26	21,34	Não	1 ano	Não	Sim	146,6	13,5	108,2	27,8	305,5	143,25	106,31	86,9	79,2	0,4	2,4	105,6196	446,2148	15,32267
54	32	21,79	Sim	3 anos	não	Sim	200	11,6	97,2	28,9	339,1	109,13	121,24	99,6	90,9	0,23	3,1	48,91446	304,5466	23,50369
55	25	23,44	Sim	6 meses	Sim	Sim	200	11,7	150,1	29	319,4	127,81	121,74	107,1	99,3	0,26	3,1	168,6308	410,3032	10,64146
56	24	19,49	Não	1 ano	Sim	Sim	200	11,7	138,9	28,8	319,4	117,5	85,82	92,2	99,9	0,19	2,5	129,151	619,0148	21,16216
57	25	22,66	Não	4 anos	Não	Sim	116,5	14,4	49,7	28,4	299,1	226,82	154,47	115,7	90	0,18	2	111,9031	366,0584	9,900775
58	19	23,63	Não	5 anos	Não	Não	116,5	11,6	116,5	27,9	339,1	130,87	128,35	85,1	94,6	0,34	3,9	114,9271	349,0016	14,52204
59	28	14,27	Excluída				200	13,9	41,9	34		197,32	141,62	91,6	98,6	0,38	3,1			
60	22	26,23	Não	3 anos	Sim	Não	180	11,9	93,8	32,4	334,9	112,7	135,16	81,7	78,5	0,28	2,2			
61	20	21,48	Não	1,5 anos	Não	Sim	200	14,1	140,7	30,9	279	161,56	121,49	97,5	101,7	0,17	2,9	103,4441	329,416	17,73552
62	23	19,68	Não	1,5anos	Não	Não	200	13,6	140,7	28,6	296	248,73	124,26	81,2	92,7	0,38	2,1	90,86574	473,9952	23,18688
63	29	26,56	Não	2 anos	Não	sim	160,7	13,1	100,7	27,6	267	239,79	141,62	111,1	93,5	0,25	2,1	57,66644	424,1602	19,95024
64	32	21,33	Não	5 anos	Não	Sim	67,5	13,9	75,4	27,6	343,3	199,31	141,62	95,4	99,5	0,41	3,2	101,554	287,992	16,12226
65	27	19,16	Não	1 ano	Sim	Sim	187	13,9	199,1	29,9	271,3	140,76	152,76	97	100,6	0,25	2	94,58412	426,3414	24,38309
66	29	27,58	Não	1,5anos	Não	Sim	96,9	13,7	56,9	32,9	273,8	128,42	182,65	92,2	96,1	0,27	3,4	104,2599	200,6616	35,3354
67	35	21,93	Não	14 anos	Não	Sim	108,9	13,6	58,7	31,5	271,3	153,93	158,5	103	104,1	0,24	2,9	99,40326	352,5134	23,48377
68	22	28,58	Sim	2 anos	sim	Não	124,9	13,1	72,1	29,5	285,4	245,97	120,74	97	94,4	0,23	3,3	127,7455	300,408	23,92205
69	29	20,83	Não	4 anos	sim	sim	89,3	14,8	87,4	28,9	185,8	119,31	174,29	72,5	106,2	0,19	2,7	73,9706	393,374	23,28576
70	31	22,83	Não	5 anos	Não	Sim	116,5	14	100,7	28,4	299,1	143,25	108,65	85,1	97,1	0,41	2,9	83,77108	386,4484	8,293418
71	33	29,3	Não	7 meses	Não	Não	103,5	13,6	146,2	26,2	323	152,67	120	95,9	88,2	0,22	2,9	83,77108	293,1654	29,79169
72	28	37,37	Excluída	8 anos	Não	Não	131,7	13,9	154	25,8	308,9	229,54	152,76	96,9	93,7	0,22	4,3			

Numeração	Colesterol	Triglicérides	HDL	LDL	VLDL
C1	128	97	37	71,4	19,4
C2	160	48	46	103,8	9,6
C3	175	72	48	112,6	14,4
C5	139	54	39	89,3	10,8
C6	166	57	57	98,22	11,4
C7	135	41	48	78,8	8,2
C8	177	88	73	87,03	17,6
C9	146	69	47	84,5	13,8
C10	163	45	54	100,4	9
C11	151	41	52	90,1	8,2
C13	223	312	51	109,4	62,4
C14	139	38	48	83,5	7,6
C15	194	65	40	141,4	13
C16	143	38	53	82,8	7,6
C17	167	65	34	119,9	13
C18	150	81	58	75,6	16,2
C 19	200	42	59	132,7	8,4
C20	168	83	45	106,5	16,6
C21	179	73	48	115,7	14,6
C22	146	99	39	86,79	19,8
T1	129	102	58	50,3	20,4
T3	200	124	65	110,3	24,8
T4	191	124	67	98,9	24,8
T5	190	196	61	89,3	39,2
T6	195	111	64	108,9	22,2
T7	192	138	56	107,7	27,6
T8	200	115	66	110,6	23
T9	175	95	61	95,26	19
T10	187	126	61	100,9	25,2
T11	256	212	66	147,7	42,4
T12	205	91	58	129,3	18,2
T13	202	55	71	120,2	11
T14	178	123	56	97,8	24,6
T19	173	103	59	93,5	20,6
T23	207	91	82	107	18,2
T24	197	130	54	116,8	26
T26	188	132	55	106,3	26,4
T27	158	65	65	79,9	13
T28	187	222	48	94,8	44,4
T30	207	121	68	114	24,2
T31	169	180	67	65,2	36
T32	140	93	54	67,3	18,6
T34	174	162	50	92,2	32,4
T37	131	74	38	78,1	14,8
T38	159	93	52	87,7	18,6
T39	182	98	53	109,7	19,6
T42	239	163	71	135,9	32,6
T43	249	95	64	165,8	19
T44	197	94	58	120,8	18,8
T45	187	37	92	86,9	7,4
T46	184	108	72	90,7	21,6