



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA

ALAN CARLOS NERY DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE OXIDADA EM
MULHERES QUE UTILIZAM E NÃO UTILIZAM CONTRACEPTIVO ORAL
COMBINADO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SALVADOR – BA
2016

ALAN CARLOS NERY DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE OXIDADA EM
MULHERES QUE UTILIZAM E NÃO UTILIZAM CONTRACEPTIVO ORAL
COMBINADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Medicina e Saúde Humana.

Orientadora: Dr^a. Ana Marice Ladeia

Coorientador: Dr. Jefferson Petto

**Salvador
2016**

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Central da EBMSP

S231 Santos, Alan Carlos Nery dos

Avaliação da lipoproteína de baixa densidade oxidada em mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral combinado. /Alan Carlos Nery dos Santos. – Salvador. 2016.

87f. il.

Orientadora: Dr^a. Ana Marice Ladeia

Coorientador: Dr. Jefferson Petto

Dissertação (mestrado) apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde Humana.

Inclui bibliografia

1. Estresse Oxidativo. 2. Doenças Cardiovasculares. 3. Aterosclerose. I. Título.

CDU: 616.12

Nome: SANTOS, Alan Carlos Nery dos

Título: Avaliação da lipoproteína de baixa densidade oxidada em mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral combinado.

Dissertação apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Medicina e Saúde Humana.

Aprovado em: 19 de agosto de 2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Mário de Seixas Rocha
Titulação: Doutor em Medicina e Saúde Humana
Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof. Dr^a.: Milena Bastos Brito
Titulação: Doutora em Ciências Médicas
Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof. Dr.: Cristiano Penas Seara Pitanga
Titulação: Doutor em Ciências do Esporte
Instituição: Universidade Católica do Salvador

Dedico este trabalho a minha mãe (Cecília), as minhas mães acolhedoras (Isabel, Angelina e Iracema) e aos meus grandes amigos e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus familiares, amigos, colegas e aos apoiadores. E em especial, a Jefferson Petto e a Francisco Oliveira, dois grandes professores que tenho como mentores e amigos. Agradeço também ao Instituto Social da Bahia, a Faculdade Social e a Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública pelas excelentes oportunidades de aprendizado e pelos grandes amigos que lá encontrei.

Sou também muito grato aos meus orientadores (Ana e Jefferson). Sem o direcionamento e colaboração de vocês, seria mais do que complicado atingir nossos objetivos. Por isso, também peço desculpas, pois, gostaria de ter aproveitado muito mais a companhia e os inúmeros ensinamentos passados por vocês.

Agradeço também a toda equipe envolvida na seleção das voluntárias e coleta de dados. Ao Laboratório de Patologia Clínica por todo o suporte para análise das variáveis laboratoriais. E a minha grande “chefa” pela compreensão e colaboração.

Vocês todos são de grande importância para mim.

RESUMO

Introdução: O uso de contraceptivo oral combinado (COC) tem sido relacionado a alterações no metabolismo glicêmico, lipídico, maior estresse oxidativo e pressão arterial sistêmica, o que poderia sugerir maior oxidação da LDL em mulheres que utilizam COC. **Objetivo:** Testar a hipótese de que existe diferença nos valores plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-oxidada) entre mulheres que utilizam e não utilizam COC, bem como avaliar a correlação entre ela e o perfil lipídico e proteína c reativa de alta sensibilidade (PCR-as). **Métodos:** Foram selecionadas 42 mulheres com idade entre 18 e 35 anos, eutróficas, irregularmente ativas, com triglicerídeos <150mg/dL, glicemia <100mg/dL e que utilizavam ou não COC. Essas foram alocadas no grupo COC, formado por 21 mulheres em uso COC há pelo menos um ano; e grupo controle (GC), composto por 21 mulheres que não utilizavam nenhum tipo de contraceptivo hormonal há pelo menos um ano. **Resultados:** Foi observado que o GCOC apresenta valores mais elevados da LDL-oxidada que o GC, respectivamente 384mU/ml vs. 283mU/ml ($p < 0,01$). Também observou-se correlação positiva entre a LDL-oxidada com a LDL ($r = 0,3$, $p < 0,05$), com o colesterol total ($r = 0,47$, $p < 0,01$) e com os triglicerídeos ($r = 0,32$, $p < 0,03$), não havendo correlação com a PCR-as. **Conclusão:** Mulheres que utilizam COC apresentam valores plasmáticos mais elevados da LDL-oxidada, existindo, correlação positiva entre a LDL-oxidada e variáveis lipídicas.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo; Doenças Cardiovasculares; Aterosclerose; Anticoncepcionais.

ABSTRACT

Introduction: The use of combined oral contraceptives (COCs) has been associated with changes in the glucose metabolism, lipid, increased oxidative stress and blood pressure, which could suggest greater oxidation of lipoproteins in women using COCs. **Objective:** To test the hypothesis there is a difference in the plasma values of oxidized LDLs (oxLDLs) between women who use and those that do not use COCs, and we also assessed the correlation between oxLDLs and the lipid profile and C-reactive protein (hs-CRP). **Methods:** The study population consisted of 42 women satisfying our selection criteria. They were divided into the COC group, consisting of 21 women using low-dose ethinyl oestradiol contraceptives (15–30 mcg) for at least one year, and the control group, consisting of 21 women who did not use any type of hormonal contraceptive for at least one year. **Results:** It was observed that women who use COCs exhibited higher values of oxLDLs (384mU/ml vs. 283mU/ml, $p < 0.01$) than those who do not use this drug. We also observed a moderate and positive correlation between oxLDLs with LDLs ($r = 0.3$, $p < 0.05$), total cholesterol ($r = 0.47$, $p < 0.01$), and the triglycerides ($r = 0.32$, $p < 0.03$), there was no correlation with hs-CRP. **Conclusion:** Women using COCs have higher plasma levels of oxidized LDL, existing as well as positive correlation between oxidized LDL and lipid variables.

Keywords: Oxidative Stress; Cardiovascular Diseases; Atherosclerosis; Contraceptive Agents.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Quadro 1 – Classificação do nível de atividade física segundo o IPAQ – versão curta.....	23
Tabela 1 – Características clínicas e antropométricas das mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral combinado.....	27
Tabela 2 – Comparação dos lipídeos de jejum (mg/dL) entre os grupos estudados.....	28
Figura 1 – Comparação da LDL-oxidada entre os grupos analisados.....	28
Tabela 3 – Análise de correlação entre a LDL-oxidada e as variáveis do perfil lipídico de jejum.....	29
Figura 2 – Gráfico de correlação entre a LDL-oxidada e os triglicerídeos.....	29
Figura 3 – Gráfico de correlação entre a LDL-oxidada e o colesterol total.....	30
Figura 4 – Gráfico de correlação entre a LDL-oxidada e a lipoproteína de baixa densidade.....	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CA – Circunferência Abdominal
COC – Contraceptivo Oral Combinado
CT – Colesterol Total
EDRF – Fator de Relaxamento Dependente do Endotélio
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
FCDP – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos
HDL – High Density Lipoprotein
IL-6 – Interleucina 6
IMC – Índice de Massa Corporal
LDL – Low Density Lipoprotein
LDLOX – Lipoproteína de Baixa Densidade Altamente Oxidada
LDL-Oxidada – Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada
M-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófago
NO – Óxido Nítrico
eNOs – Enzima Óxido Nítrico Sintetase
ONOO- – Peroxinitrito
PA – Pressão Arterial
PCR-as – Proteína C Reativa de Alta Sensibilidade
TG – Triglicérides
TGF- α e β – Fator de Crescimento Tumoral
TGO – Transaminase Glutâmica Oxidativa
TGP – Transaminase Glutâmica Pirúvica
VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VLDL – Very Low Density Lipoprotein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVOS	13
3.1	Primário	13
3.2	Secundário	13
4	REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1	Perfil lipídico e contraceptivo oral combinado	14
4.2	Doença aterosclerótica	15
4.3	Origem da placa aterosclerótica	16
4.4	Papel do endotélio na aterogênese	17
4.5	Papel da LDL oxidada e aterogênese	19
4.6	Resposta inflamatória na aterogênese	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1	Desenho	24
5.2	População, critérios de inclusão e exclusão	24
5.3	Protocolo de avaliação	25
5.4	Protocolo da coleta de dados laboratoriais	25
6	ESTATÍSTICA	27
6.1	Hipótese nula	27
6.2	Hipótese alternativa	27
6.3	Cálculo de tamanho amostral	27
6.4	Variáveis	27
6.5	ASPECTOS ÉTICOS	28
7	RESULTADOS	29
8	DISCUSSÃO	33
9	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	37

10 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	47
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que mulheres em idade reprodutiva, que utilizam contraceptivo oral combinado (COC), apresentam alterações no metabolismo glicêmico^{1,2}, lipídico^{3,4}, estresse oxidativo^{5,6} e inflamação subclínica crônica^{7,8}. Também, já foi identificado aumento nas subfrações aterogênicas da lipoproteína de baixa densidade (LDL)⁹ e elevação da pressão arterial sistêmica (PAS)¹⁰. Em conjunto, essas alterações, apresentam associação com a oxidação da LDL, a qual, tem sido fortemente relacionado com um perfil lipídico mais aterogênico¹¹.

Uma vez oxidada, a LDL apresenta várias ações na fisiologia vascular, entre elas, inibe a expressão do RNAm da enzima óxido nítrico sintetase endotelial, tendo como consequência a diminuição da produção do óxido nítrico e o favorecimento do processo aterosclerótico¹². Além disso, também prejudica a proliferação, motilidade celular e a ação das células-tronco endoteliais, mecanismos capitais na endotelização das áreas lesadas no processo aterosclerótico^{13,14}. Ainda, tem sido sugerido que valores mais elevados de LDL-oxidada, mesmo dentro dos limites de normalidade, estão associados a um maior risco de futuros eventos cardiovasculares e síndrome metabólica^{1,15-17}.

Assim, embora já tenha sido descrito que os COC aumentam o risco de eventos aterotrombóticos em proporções diferentes entre mulheres com e sem os clássicos fatores de risco para doenças cardiovasculares, ainda existem questionamentos sobre a ocorrência desses eventos, assim como, lacunas sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares em mulheres que utilizam COC^{18,19}. A LDL-oxidada emerge como um importante fator de risco pró-aterogênico, capaz de influenciar em todas as fases do processo aterosclerótico¹³.

Outro dado interessante é que no Brasil 33,8% das mulheres com idade entre 18 e 49 anos utilizam contraceptivos orais, sendo que dessas, mais de 13% (IC95% 10,9-15,7%) apresentam fatores de risco como o tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias e obesidade²⁰. Esses fatores, somados ao uso dos COC podem aumentar sensivelmente o risco de eventos aterotrombóticos mesmo em mulheres em idade reprodutiva^{18,19}.

Por outro lado, em nosso conhecimento ainda não existem estudos que tenham investigado a oxidação da LDL em mulheres jovens em uso de COC, sem outros fatores que justifiquem sua oxidação. Assim, este estudo visa avaliar se existe diferença entre valores plasmáticos da LDL-oxidada em mulheres que utilizam ou não COC.

2 JUSTIFICATIVA

O contraceptivo oral combinado (COC) é o método de planejamento familiar mais no mundo. No Brasil, estima-se que 33,8% das mulheres em idade reprodutiva façam uso desse grupo de medicamentos, os quais são normalmente reportados como de baixo risco a saúde. Entretanto, um dado preocupante é que cerca de 18% das mulheres fazem uso do COC por conta própria, fato que pode contribuir para o aumento dos riscos associados a esse grupo de medicamentos.

De fato, pesquisas científicas têm sugerido que o uso do COC pode aumentar o risco de eventos aterotrombóticos, bem como, causar elevação da pressão arterial sistêmica, provocar alterações no metabolismo glicêmico e lipídico mesmo em mulheres saudáveis. Sabidamente, esses são fatores associados ao adoecimento e mortalidade por doenças cardiovasculares e metabólicas.

Outro importante dado que reforça essa preocupação é que mais de 13% das mulheres brasileiras que utilizam COC, o fazem de forma inadequada. Isso porque, elas apresentam doenças como a hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, obesidade, diabetes mellitus, além de serem tabagistas. Quando somado ao uso de COC, a presença desses fatores de risco faz com que as mulheres aumentem em mais de 4 vezes a chance de desenvolver infarto do miocárdio.

Entretanto, mesmo em face a tantas informações, ainda é pouco claro quais são os mecanismos envolvidos no risco aterotrombótico de mulheres que utilizam COC. Por outro lado, estudo sugerem que a oxidação da lipoproteína de baixa densidade esteja associada a todas as fases da doença aterosclerótica, fato que indica que o estudo dessa variável lipídica liga ao estresse oxidativo possa ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos no risco cardiovascular relacionado ao uso do contraceptivo oral combinado.

3 OBJETIVOS

3.1 Primário

Testar a hipótese de que existe diferença entre os valores plasmáticos da LDL-oxidada entre mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral combinado.

3.2 Secundário

Avaliar a correlação entre a LDL-oxidada e as variáveis do perfil lipídico de jejum e proteína c reativa.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Perfil lipídico e contraceptivo oral combinado

Desde a sua introdução na década de 60, estudos tem se dedicado a investigação e monitoramento das manifestações clínicas relacionados ao uso de contraceptivos orais¹⁹. No Brasil e no mundo, milhares de mulheres em idade reprodutiva fazem uso dos contraceptivos orais, principalmente, os de terceira geração. Entretanto, embora este grupo de medicamentos sejam descritos como de baixo risco para trombose arterial ou venosa, quando associados a fatores de risco como tabagismo, HAS, dislipidemias e obesidade podem, provocam respostas cardiovasculares e metabólicas ainda mais desfavoráveis^{18,19}.

Mesmo em baixas dosagens de estrogênio/progesterona, os COC contribuem para modificar o metabolismo das lipoproteínas, principalmente, no que se refere ao aumento dos valores plasmáticos do colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) e lipemia pós-prandial. Esse aumento pode chegar a 100%, quando por exemplo, comparados os valores plasmáticos dos TG entre mulheres que utilizam as que não utilizam COC^{4,8,21}.

Entretanto, mesmo diante dessas alterações, pesquisas tem encontrado dificuldade em estabelecer adequadas relações de causa-efeito entre o uso de COC e doenças cardiometabólicas, principalmente, em virtude da metodologia transversal de boa parte dos estudos sobre o tema¹⁹. Outro dado interessante, é que, parte da literatura tem indicado aumento dos valores plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL), sem aparentes modificações nas concentrações da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Esse dado aponta para um perfil lipídico com baixo potencial aterogênico, como sugerido por algumas pesquisas^{22,23}.

Por outro lado, mesmo sem modificações quantitativas na LDL, já foi demonstrado que mulheres que utilizam contraceptivos orais apresentam alterações qualitativas na LDL, sendo, representadas por maiores subfrações das partículas aterogênicas dessa lipoproteína⁹. Assim, também seria plausível questionar se a elevação plasmática da HDL, nessa situação específica, seria de fato protetora, uma vez que, existem subfrações aterogênicas da HDL²⁶.

Em conjunto, os dados anteriormente mencionados, somando-se às alterações no estresse oxidativo, no metabolismo glicêmico, inflamação subclínica crônica e aumento da pressão arterial sistêmica, podem sugerir um maior potencial aterotrombótico nessas mulheres. O que torna plausível a continuidade de investigações sobre o risco aterotrombóticos em mulheres em idade reprodutiva, que utilizam COC.

4.2 Doença aterosclerótica

Durante muitos anos, a aterosclerose foi considerada uma doença decorrente de um processo de deposição de lipídios, a qual afetava várias camadas da parede vascular arterial de forma sistêmica, porém irregular e também por mecanismos hidráulicos passivos²⁵. Entretanto, a aterosclerose, também é caracterizada como um processo inflamatório crônico na parede das artérias que resulta na formação de placas de gordura e obstrução da luz destes vasos²⁶.

O processo aterosclerótico ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre²⁷. Esta é uma doença multifatorial que progride lentamente surgindo como resultado de uma série de respostas celulares específicas²⁸. Segundo Naghavi e cols.²⁹, esta enfermidade é responsável por mais de 19 milhões de mortes anuais. No Brasil, aproximadamente 300 mil óbitos ocorrem por ano, causados por doenças cardiovasculares, associadas à aterosclerose³⁰.

Diversos fatores, denominados de fatores de risco para desenvolvimento da aterosclerose, estão relacionados com o desenvolvimento desta enfermidade, os quais são classificados como: dislipidemia; histórico familiar; hipertensão arterial; diabetes mellitus; obesidade; tabagismo e sedentarismo^{31,32}. Somando-se a estes fatores, pesquisas tem sugerido que o uso atual de COC possa representar risco cardiovascular, o qual, varia em detrimento da formulação do COC e da presença dos tradicionais fatores de risco para doenças cardiovasculares nas usuárias deste grupo de medicamentos^{18,19}.

Do ponto de vista fisiopatológico, a aterosclerose inclui acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos, os quais depositam-se na parede das artérias, promovendo o desenvolvimento de placas ou estrias gordurosas, o que consequentemente provoca a obstrução das mesmas³³. Os principais locais de ação

da doença são a aorta, as artérias coronárias e cerebrais, o que pode gerar por consequência o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma aórtico³³.

De acordo com outro estudo, há duas fases independentes na evolução da doença aterosclerótica. A fase denominada de aterosclerótica, a qual ocorre predominância da formação anatômica da lesão aterosclerótica em consequência às lesões endoteliais provocadas pelos denominados fatores de risco aterogênicos clássicos e que leva décadas para evoluir. E ainda, em concordância com os autores supracitados existe a fase trombótica, em que ocorre a formação aguda de trombo sobre a placa de ateroma, o que de fato poderia motivar eventos agudos coronarianos, tais como infarto do miocárdio, angina instável e morte súbita³⁴.

Outros estudos mostram que a aterosclerose não é um simples mecanismo degenerativo provocado pelo envelhecimento e sim um processo inflamatório que pode provocar eventos clínicos agudos em consequência de uma possível ruptura da placa com formação de trombos³⁵. Essa instabilidade da placa aterosclerótica é potencializada pela LDL-oxidada, a qual, além favorecer o crescimento da placa, modifica o funcionamento das principais células envolvidas na formação da estria lipídica³⁶.

4.3 Origem da placa aterosclerótica

Análises de eventos celulares que ocorrem durante o processo aterosclerótico mostraram um tipo de resposta inflamatória crônica em que antecede a migração e proliferação de células do músculo liso arterial²⁵. Segundo Ross³⁷, o evento inicial que provoca a resposta inflamatória se estabelece a partir do acúmulo de lipídios e partículas de lipoproteínas sob o endotélio. Após este acúmulo ocorre a fixação e a propagação de monócitos e linfócitos T provenientes do sangue periférico.

Há algumas décadas, acreditava-se que o endotélio desempenhava apenas um papel de barreira seletiva na difusão de macromoléculas entre a luz do vaso sanguíneo e o espaço intersticial. Entretanto, atualmente estudos mostram que o endotélio desempenha funções na regulação do tônus vagal, regulação de processos inflamatórios, promoção e inibição de crescimento neovascular e ainda, modulação de agregação e modulação plaquetária^{38,39}.

Os primeiros estudos que mostravam os papéis regulatórios das células endoteliais vasculares, apresentaram resultados que descreviam mecanismos

desempenhados pelo fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF), posteriormente identificado como o óxido nítrico (NO)⁴⁰. O mecanismo de regulação endotelial, promotor de sua própria homeostase, ocorre através de liberação de várias substâncias que podem gerar regulações autócrinas e parácrinas dando origem a atividades pró e anticoagulantes e ainda, a ocorrência da liberação de substâncias com o poder de promover adesão celular e ações vasoativas⁴¹.

O NO aparece como uma das principais substâncias regulatórias na homeostase do endotélio. O mesmo é sintetizado na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (eNOs)⁴². Além da função de vasodilatação, o NO desempenha diversas funções como: inibição, adesão e a agregação plaquetária, impede a proliferação do músculo liso vascular, limita o recrutamento vascular de leucócitos e inibe a produção do fator tecidual (fator crítico na geração do trombo)^{43,44}.

Estudos afirmam que a fase inicial da aterosclerose surge devido ao acúmulo de macrófagos, envolvendo resíduos de LDL e colesterol, no espaço subendotelial do vaso arterial, o que provocaria o aparecimento das denominadas células espumosas, representando alteração morfológica mais precoce e característica da aterosclerose⁴⁵. Interessante notar que, apenas um pequeno subconjunto de macrófagos representando 5 a 10% da população destas células consegue sobreviver ao acúmulo progressivo de lipídeos no seu compartimento endolisossomal, sendo esse pequeno subconjunto de células as responsáveis pela formação de células aterogênicas⁴⁶. Os mecanismos envolvidos no processo parecem estar ligados à ação das lipoxigenases, enzimas que catalisam ácidos graxos⁴⁷.

4.4 **Papel do endotélio na aterogênese**

Uma das primeiras mudanças induzidas pela hipercolesterolemia e hipertensão parece ser a permeabilidade endotelial alterada em conjunto com a aderência de leucócitos, processo que é facilitado por uma série de moléculas de adesão intracelular e moléculas de adesão vascular³⁷.

Estudos trazem informações de que quando o endotélio é agredido por fatores de risco, este perde progressivamente sua função fisiológica de proteção. Ao contrário das respostas fisiológicas, o endotélio passa a secretar elementos que participam da progressão da aterosclerose, o que resulta na disfunção endotelial, e por

consequência, alteração na resposta vasodilatadora e redução da atividade antitrombótica, ocasionando alterações morfológicas, com consequentes danos vasculares^{48,49}.

Fisiologicamente, as LDL plasmáticas alcançam o citoplasma das células endoteliais através de endocitose. Estudos mostram a formação de invaginações na membrana da célula endotelial, locais onde se localizam os receptores específicos da apoB-100 e que as invaginações transformam-se em vesículas de endocitose, promovendo a entrada de partículas de LDL para o interior da célula endotelial⁵⁰.

Ao alcançarem o citoplasma das células endoteliais as partículas de LDL são hidrolizadas em fosfolípidos, triglicérides, proteínas e colesterol através dos lisossomos e os receptores específicos⁵⁰.

Quando os níveis de LDL ultrapassam os valores fisiológicos, ocorrem aumentos no processo de endocitose das LDL através de receptores específicos e inespecíficos, consequentemente, aumentando a concentração de LDL nativas no interior da célula endotelial, induzindo um consumo maior de ON e ainda produção de radicais livres, provocando peroxidação dos ácidos graxos das partículas de LDL e, também, a oxidação das proteínas apoB⁵¹.

O processo denominado estresse oxidativo, em que ocorre geração de radicais livres é a via final de lesão celular da maioria dos fatores de risco cardiovascular⁵². Já está bem estabelecido que o NO é um mediador crucial da vasodilatação dependente do endotélio e pode também desempenhar um importante papel na agregação de plaquetas e na manutenção do equilíbrio entre o crescimento e diferenciação de células do músculo liso⁵².

O estresse oxidativo origina-se na secreção de NO, um gás instável com alto poder de difusão e que atua como um intermediário químico que produz efeitos na transdução de sinais biológicos específicos de maneira autócrina ou parácrina⁵³. Por outro lado, superóxidos resultam de uma redução de elétrons de oxigênio por uma variedade de oxidases. Quando O₂ é produzido em conjunto com o NO, eles reagem rapidamente para formar uma molécula altamente reativa peroxinitrito (ONOO-) que é um importante mediador da peroxidação lipídica e nitração de proteínas, incluindo a oxidação da LDL, o que provoca efeitos pró-aterogênicos⁵².

Na ausência de eNOs imediatamente acessíveis o O₂ é rapidamente dismutado em EROs mais estáveis (H₂O₂), pela superóxido dismutase, que é então convertido em H₂O ou pela peroxidase catalase ou pela glutatona⁵².

O processo acima descrito, em que ocorreria a oxidação de LDL provocaria a disfunção da Gl proteína, que é receptor de membrana em que atuam inúmeros agonistas da via de produção do óxido nítrico, o que compromete uma das principais funções endoteliais⁵¹.

4.5 Papel da LDL oxidada e aterogenese

Quando a célula endotelial apresenta disfunção, esta permite maior influxo da LDL nativa e LDL-oxidada para a camada íntima vascular, mecanismo que se dá através de transcitose (é esse termo mesmo?). A quantidade transportada de moléculas de LDL dependerá da concentração, ou seja, níveis elevados de LDL no endotélio resultam em aumento da quantidade do composto que atinge a camada íntima⁵⁴.

Segundo Berliner *et al.*⁵⁵ ocorrem dois estágios para que a LDL seja oxidada: o primeiro descreve a oxidação dos lipídios da LDL, com pequena alteração na apo B (a denominada LDL minimamente oxidada - MM-LDL-OX) e que ocorre antes que os monócitos sejam ativados. Estas LDL denominadas de minimamente oxidadas promovem aumento na aderência de leucócitos (como monócitos/macrófagos e linfócitos-T) para a parede vascular. O segundo estágio inicia-se a partir da ativação dos monócitos e que os mesmos são convertidos em macrófagos os quais promoverão a oxidação dos lipídios da LDL e também ocorrerá a oxidação da fração proteica (apo B)⁵⁵. Estes mecanismos estimulam as células endoteliais a produzirem moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF)⁵⁶.

Descrevendo o segundo estágio, estudos mostram que em resposta ao aumento de LDL-oxidada, ocorre recrutamento de monócitos para a área da lesão e estes são convertidos em macrófagos, e então, os lipídeos da LDL são ainda mais oxidados, ocorrendo alteração também na parte proteica dessa lipoproteína, impedindo o reconhecimento da mesma pelo receptor de LDL. Isto faz com que as LDL sejam reconhecidas apenas pelos receptores *scavengers* ou removedores presentes nos macrófagos e células musculares lisas⁵⁴.

Na superfície dos macrófagos e células musculares lisas da parede arterial encontram-se os receptores *scavengers* SRA-I, SRA-II e CD36, estes receptores não

sofrem regulação negativa, o que significa que sua expressão não é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol⁵⁷.

Quando as LDL-oxidadas interagem com os receptores *scavengers* ocorre rápida captação dessa lipoproteína pelos macrófagos. Então, as LDL-oxidadas são degradadas no meio interno da célula, o colesterol livre é esterificado e em seguida armazenado nas gotas lipídicas, isso faz com que a célula tenha um aspecto espumoso⁵⁸.

Estes fatores supracitados resultarão em acúmulo de colesterol originando células espumosas e conseqüentemente o surgimento da estria gordurosa⁵⁹. A presença das LDL-oxidadas provoca a conversão de monócitos sub-endoteliais em macrófagos ativados, os quais fagocitam as partículas de lipoproteínas modificadas, acumulam o colesterol destas partículas em vesículas no citoplasma dando origem às células esponjosas²⁵.

De acordo com Nievelstein *et al.*⁶⁰, quando as LDL atingem a camada íntima dos vasos, uma trama de fibras e fibrilas secretadas pelas células parietais aprisionam essas moléculas. As LDL nativas são reconhecidas e conseqüentemente não se acumulam em quantidade significativa nos macrófagos. Múltiplas vias secretam produtos oxidativos através das células endoteliais, musculares lisas, e também pelos macrófagos, o que por conseqüência promove a difusão das LDL aprisionadas no espaço subendotelial e iniciam a oxidação lipídica⁶⁰.

A LDL-oxidada não é reconhecida pelos receptores clássicos de LDL, todavia, são reconhecidas pelos receptores de LDL acetilados (removedores) e/ou receptores oxidados⁶¹. As conseqüências geradas pela modificação oxidativa da LDL seriam, em princípio, aumentar a captação das mesmas pelos macrófagos, produção de muitas moléculas modificadas com atuações e efeitos biológicos diversos, inclusive efeitos que se acentuam na lesão endotelial e na ativação de células endoteliais⁶².

A literatura mostra que a LDL-oxidada faz com que ocorra à produção de potentes ativadores dos monócitos pelas células endoteliais como a proteína quimiotáxica para monócitos (MCP-1) e o fator estimulador das colônias de monócitos (M-CSF), que tem o papel de promover o crescimento e a diferenciação dos monócitos em macrófagos⁶³.

A formação e acúmulo de células espumosas provocam as primeiras lesões ateroscleróticas levando a formação de uma estria gordurosa na parede interna das artérias, que é constituída de macrófagos carregados de lipídeos e linfócitos T,

resultantes da resposta inflamatória local³⁷. Se os efeitos causadores de tal resposta inflamatória persistirem, a resposta inflamatória se tornará crônica e deletéria para as células das paredes das artérias²⁵. Esta condição pode levar a uma lesão expandida que pode conter múltiplas camadas de células musculares lisas, macrófagos e linfócitos T. E se as condições que induzem esta resposta inflamatória continuarem por um longo tempo ocorrerá remodelagem da lesão e a formação de uma capa fibrosa³⁷.

A capa fibrosa consiste de numerosas células musculares lisas cercadas por fibras de colágeno, fibras elásticas e prostaglandinas e cobre as numerosas células musculares lisas ploriferadas, macrófagos e linfócitos T, junto com quantidades variadas de restos de células necróticas, lipídeos intra e extracelular e grandes quantidades de novo tecido conjuntivo²⁵.

4.6 Resposta inflamatória na aterogênese

A resposta inflamatória promove mudanças funcionais em células endoteliais, linfócitos T, macrófagos derivados de monócitos e células do músculo liso^{33,63}. Quando essas células são ativadas ocorrem mecanismos de elaboração e interação de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, acúmulo de lipídios e proliferação de células do músculo liso²⁵. Estudos também mostraram que a resposta inflamatória também ocorre devido a oxidação da LDL^{33,64}.

Estas respostas promovem expressão e seleção de vários mediadores que têm grande capacidade de dar origem à lesão vascular, sendo eles: fatores de crescimento de endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), a interleucina-1 (IL-1) e os fatores de crescimento tumoral $-\alpha$ e $-\beta$ (TGF- α , TGF- β)⁶⁵. Algumas destas substâncias desempenham papéis importantes no desenvolvimento da lesão, a IL-1, em conjunto com TGF- α e TGF- β podem inibir a proliferação endotelial e induzir a expressão genética secundária pelo endotélio de fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP) e outros mediadores que podem dar origem a lesão vascular^{33,65}.

Dentre os mecanismos que promovem a formação da placa aterosclerótica devido a uma resposta inflamatória, ocorre a síntese de tecido conjuntivo pelo endotélio induzido pelo TGF- β e, além disso, as células endoteliais produzem fatores estimulantes de colônias de macrófagos (M-CSF), fatores estimulantes de colônias de

macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e LDL-oxidada, todas estas substâncias são mitogênicas e também podem ativar macrófagos adjacentes³³. Esta sequência de eventos gera uma resposta inflamatória protetora seguida por formação de resposta fibro-proliferativa, que com o tempo torna-se excessivo desencadeando o processo de doença²⁵.

Embora não esteja clara a relação entre LDL-oxidada e inflamação marcada pela elevação da PCR, estudos indicam que a elevação desta proteína de fase aguda está relacionada com risco aumentado para doenças cardiovasculares. Interessante notar que a literatura tem indicado aumento significativo da PCR em mulheres que utilizam COC. Vale ressaltar que a associação entre o uso de COC e a elevação da PCR se mantém significativa mesmo após ajuste para fatores de confusão como a obesidade⁶⁵. Embora seja sugerido que valores <1, 1-3 e >3 mg/L, são indicadores respectivamente de baixo, moderado e de alto risco para futuros eventos cardiovasculares^{66,68}, Zieske et al.⁶⁹ apontam que pequenas elevações dessa proteína estão associadas com aumento do risco de aterotrombose durante 20 anos após coleta das amostras sanguíneas.

Outro possível mecanismo que promove a elevação da PCR em mulheres que utilizam COC, seja, o que está relacionado a sensibilidade insulínica. Segundo Beck⁷⁰, as progestinas, hormônios sintéticos que simulam os efeitos da progesterona e são encontrados nos COC, promovem diminuição da sensibilidade à insulina, mecanismo observado em um estudo realizado por nosso grupo⁷¹. A diminuição da sensibilidade a insulina desencadeia alterações metabólicas que vão desde o aumento dos triglicerídeos de jejum até o aumento da inflamação vascular⁷².

A diminuição da sensibilidade a insulina provoca aumento da produção da insulina na tentativa de manter em níveis adequados a glicemia e o suprimento da glicose na célula muscular. O aumento da resistência à insulina provoca diminuição da atividade da lipase lipoproteica e consequente diminuição na captação e utilização dos triglicerídeos pelo tecido muscular. Isso eleva a quantidade dos triglicerídeos plasmáticos e consequentemente da VLDL e LDL circulantes⁷². Como mostrado por O'Meara et al.⁷³, triglicerídeos de jejum mais elevados induzem a aumento da lipemia pós-prandial. Tal mecanismo explica o porquê mulheres em uso de COC apresentarem valores de triglicerídeos e LDL de jejum e lipemia pós-prandial mais elevados que mulheres que não utilizam COC⁴. Tanto a elevação da insulina, quanto a elevação dos triglicerídeos e lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade e

também da lipemia pós-prandial induzem a lesão endotelial, resultado que pode induzir aumento da PCR⁷⁴.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho

A pesquisa caracteriza-se como um estudo analítico de corte transversal, a qual tem como variável preditora o uso de COC e variável de desfecho a LDL-oxidada.

5.2 População, critérios de inclusão e exclusão

A população estudada foi constituída por mulheres eutróficas, irregularmente ativas, com idade entre 18 e 30 anos, nulíparas, com valores de jejum dos triglicérides <150mg/dL, da glicemia <100mg/dL e que utilizavam ou não COC. Todas as participantes eram discentes de uma faculdade privada localizada na cidade de Salvador, BA – Brasil.

A amostra foi dividida em dois grupos: grupo COC (GCOC) formado por mulheres em uso de COC de baixa dosagem de etinilstradiol (15-30mcg) há pelo menos um ano; e grupo controle (GC), composto por mulheres que não utilizavam nenhum tipo de contraceptivo hormonal há pelo menos um ano.

Para determinar se as participantes eram irregularmente ativas foi utilizado o Questionário Internacional de Atividade Física - versão curta, validado para população brasileira⁷⁵ (**ANEXO I**). A **Tabela 1** apresenta os níveis de atividade física, bem como, suas respectivas descrições.

Quadro 1. Classificação do nível de atividade física segundo o IPAQ – versão longa.

NIVEL	DESCRIÇÃO
Muito ativo	Aquele que cumpriu as recomendações de: a) VIGOROSA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão b) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão + MODERADA e/ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão.
Ativo	Aquele que cumpriu as recomendações de: a) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão; ou b) MODERADA ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão; ou c) Qualquer atividade somada: ≥ 5 dias/sem e ≥ 150 minutos/sem (caminhada + moderada + vigorosa).
Irregularmente ativo A	Aquele que atinge pelo menos um dos critérios da recomendação quanto à frequência ou quanto à duração da atividade: a) Frequência: 5 dias /semana ou b) Duração: 150 min / semana.
Irregularmente ativo B	Aquele que não atingiu nenhum dos critérios da recomendação quanto à frequência nem quanto à duração.
Sedentário	Aquele que não realizou nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

Foram excluídas mulheres que relataram dislipidemia familiar, hipo ou hipertireoidismo, histórico de alcoolismo ou tabagismo, síndrome do ovário policístico, estar em dieta hipo ou hiperlipídica, fazer uso de suplementos alimentares ou anabolizantes, estar em uso de hipolipemiantes, corticóides, diuréticos ou betabloqueadores. Excluídas também, mulheres que na avaliação física apresentaram valores da pressão arterial sistêmica $\geq 140/90$ mmHg, circunferência abdominal ≥ 80 cm ou, no exame laboratorial, alteração da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e oxidativa (TGO). A TGP e TGO foram avaliadas com o intuito de identificar enfermidades pancreática e hepática, e a creatinina de identificar a presença de disfunção renal.

5.3 Protocolo de avaliação

Todas as participantes responderam ao questionário semiestruturado, elaborado pelos autores da pesquisa e passaram por exame físico (**ANEXO II**). Esse último foi composto por medida de Pressão Arterial (PA) em repouso, massa corporal total, estatura e circunferência abdominal.

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado com as medidas de massa e altura, de acordo com a equação de Quetelet: $\text{massa(kg)}/\text{altura}^2(\text{cm})$. Os pontos de corte de IMC adotados foram os preconizados pela IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia²⁷, ou seja, baixo peso (IMC $< 18,5$); eutrofia (IMC 18,5-24,9); sobrepeso (IMC 25-29,9) e obesidade (IMC ≥ 30).

A circunferência abdominal foi obtida com fita métrica metálica e inelástica, marca Starrett®, com definição de medida de 0,1cm. Foi mensurada na menor curvatura localizada entre a última costela e a crista ilíaca sem comprimir os tecidos⁷⁶.

5.4 Protocolo da coleta de dados laboratoriais

Todas as participantes foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica na cidade de Salvador, BA – Brasil, para realizar as coletas das amostras sanguíneas. Depois de puncionada a veia antecubital, foram coletados 10 ml de sangue para dosagem dos triglicerídeos (TG), da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-oxidada), da lipoproteína de alta densidade (HDL), do colesterol total

(CT), glicemia, transaminase glutâmica pirúvica e oxidativa. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a de muito baixa densidade (VLDL) foram calculadas pela equação de Friedewald⁷⁷: $CT=HDL+LDL+VLDL$, sendo a VLDL igual aos TG/5.

As coletas foram realizadas com as voluntárias em jejum de 12 horas. Elas foram orientadas a não alterarem sua dieta na semana do teste, a não praticarem nenhum esforço físico diferente do habitual e não ingerir bebidas alcoólicas 24h antes do exame laboratorial. Para o GC, as coletas foram realizadas entre o quinto e o décimo dia do ciclo menstrual, considerando as menores flutuações hormonais, conforme recomendado por Casazza e cols.⁷⁸. O sangue foi coletado por um profissional capacitado e em ambiente laboratorial próprio para esse tipo de procedimento.

Para determinação da LDL-oxidada nas amostras de soro, foi utilizado o kit Elisa. Nesta análise, os valores da LDL-oxidada considerados normais foram entre 100 e 700 mU/mL. Os valores dos TG, da HDL, do CT e da glicemia foram obtidos pelo método enzimático colorimétrico de Trinder⁷⁹. A TGP e a TGO foram dosadas pelo método colorimétrico de Reitman-Frankel⁸⁰.

6 ESTATÍSTICA

6.1 Hipótese nula

Não existe diferença entre os valores plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade entre mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral combinado.

6.2 Hipótese alternativa

Existe diferença entre os valores plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade entre mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral combinado.

6.3 Cálculo de tamanho amostral

O cálculo amostral foi realizado no programa GraphPad StatMate 2.0 for Windows. Para um alfa de 5% e beta de 80% e considerando como significativa uma diferença de 20% entre os grupos, foram necessárias 36 mulheres, ou seja, 18 para cada grupo.

6.4 Variáveis

Foram consideradas como variáveis preditoras o uso de COC e de desfecho, e a lipoproteína de baixa densidade oxidada. Também foram consideradas como variáveis de interesse do presente estudo: Idade, Índice de Massa Corporal, Pressão Arterial Sistêmica, Triglicerídeos, Glicemia, Colesterol Total, Lipoproteína de Baixa Densidade, Lipoproteína de Alta densidade, Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, Proteína C Reativa, Razão Triglicerídeos/Lipoproteína de Alta Densidade.

Inicialmente para verificar a distribuição dos dados foram aplicados testes de simetria e curtose e o teste de *Shapiro-Wilk*. Os valores das variáveis com comportamento normal foram descritos em média e desvio padrão e os valores das variáveis não paramétricas em mediana e intervalo interquartil.

Para a comparação intergrupos das variáveis paramétricas foi utilizado o teste *t de Student* não pareado bidirecional e para as variáveis não paramétricas o teste de *Mann-Whitney*. Verificada também a correlação entre os valores da LDL-oxidada com todas as variáveis do perfil lipídico – triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL e a

PCR. Nas análises de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman*. Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico BioStat 5.0, adotando nível de significância de 5%.

6.5 ASPECTOS ÉTICOS

Durante todo o estudo foram observadas as diretrizes sobre a pesquisa com seres humanos da Declaração de Helsinque e da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciência e Tecnologia de Salvador – BA sob o número 3390/2010.

Todas as participantes receberam detalhadamente as informações sobre os objetivos do estudo, riscos e benefícios envolvidos nos procedimentos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram preenchidas duas vias, ficando uma em posse das participantes e a outra com os pesquisadores (**ANEXO III**).

7 RESULTADOS

A **Tabela 1** apresenta as características clínicas e antropométricas da amostra. Nota-se a homogeneidade entre os grupos e destaca-se a diferença entre valores da pressão arterial sistólica ($p < 0,02$) e proteína c reativa ($p < 0,01$), sendo estes, maiores no GCOC.

Tabela 1. Características clínicas e antropométricas das mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral combinado (n=42).

Variáveis	GCOC (n = 21)	GC (n = 21)	Valor de p
Idade (anos)	23 ± 3,1	23 ± 3,4	0,98
Índice de Massa Corporal (kg/m ²)	20 ± 2,1	19 ± 2,8	0,07
Circunferência Abdominal (cm)	73 ± 7,8	70 ± 5,9	0,32
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	118 ± 8,8	111 ± 9,7	0,02*
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	77 (74 – 80)	70 (70 – 80)	0,18
Proteína C Reativa (mg/L)	2,7 (1,8 – 6,4)	0,9 (0,5 – 1,1)	< 0,01#
Glicemia (mg/dL)	82 ± 6,9	83 ± 5,7	0,57
Transaminase Glutâmica Pirúvica (U/L)	15 ± 4,2	14 ± 3,4	0,16
Tempo de Uso do COC (anos)	3,7 ± 2,3	-	-

GCOC – Grupo Contraceptivo Oral Combinado; GC – Grupo Controle; COC – Contraceptivo Oral Combinado. *Teste t de Student bidirecional para amostras independentes; #Teste de Mann-Whitney bidirecional.

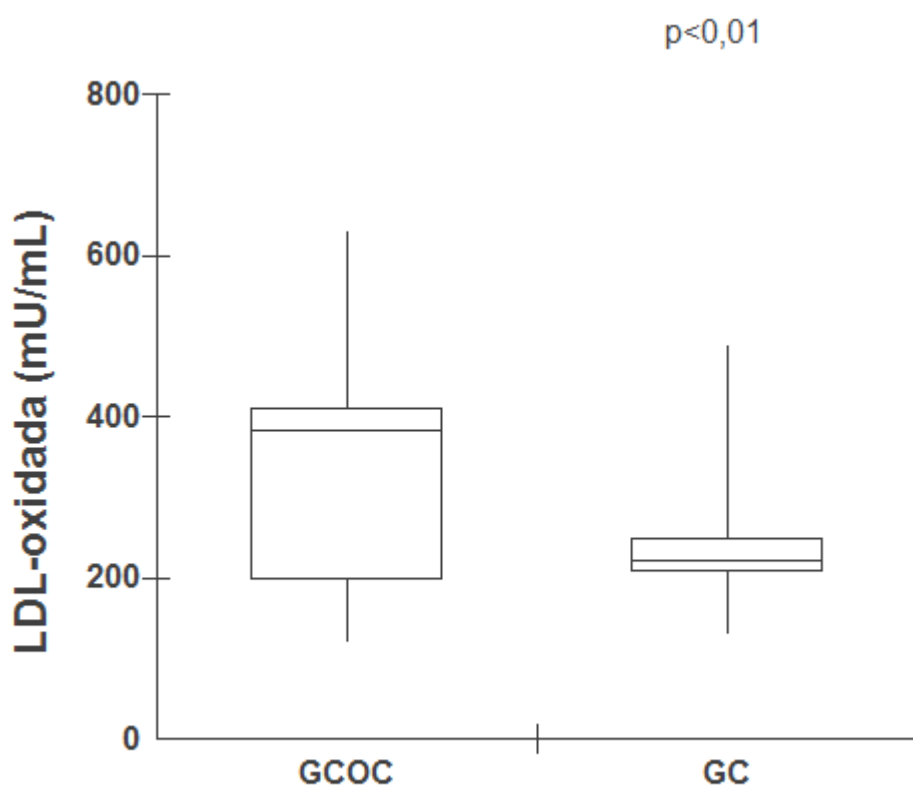
Ao comparar as variáveis lipídicas de jejum e a razão TG/HDL (**Tabela 2**) percebe-se que o GCOC apresenta valores plasmáticos de triglicerídeos ($p < 0,01$), colesterol total ($p < 0,01$), HDL ($p < 0,04$), VLDL ($p < 0,01$) e a razão TG/HDL ($p < 0,01$) maiores que o GC.

Tabela 2. Comparação dos lipídeos de jejum (mg/dL) entre os grupos estudados.

Variáveis	GCOC (n =21)	GC (n = 21)	Valor de p
Triglicerídeos	95 (73 – 112)	49 (40 – 64)	< 0,01#
Colesterol Total	210±38,6	183±29,7	0,01*
HDL	58±19,3	48±11,5	0,04*
LDL	134±35,1	126±27,7	0,42
VLDL	19 (15 – 22)	10 (8 – 13)	< 0,01#
Razão TG/HDL	1,7±0,5	1,1±0,5	< 0,01*

GCOC – Grupo Contraceptivo Oral Combinado; GC – Grupo Controle; HDL - High Density Lipoprotein; LDL - Low Density Lipoprotein; VLDL - Very Low Density Lipoprotein. *Teste *t* bidirecional para amostras independentes; #Teste de Mann-Whitney bidirecional.

Como mostrado na **Figura 1**, às mulheres do GCOC apresentam valores plasmáticos da LDL-oxidada (mU/mL) mais elevados do que o GC, 384 mU/mL(198–410) vs. 283 mU/mL (208–250) ($p<0,01$).

**Figura 1.** Comparação da LDL-oxidada entre os grupos estudados.

Na **Tabela 3** são expostas as análises de correlação entre a LDL-oxidada e as variáveis do perfil lipídico de jejum, bem como entre a LDL-oxidada e a PCR. Observada correlação linear moderada positiva entre a LDL-oxidada e a LDL, os triglicerídeos e o colesterol total. (**Figura 2**).

Tabela 3. Análise de correlação entre a LDL-oxidada (mU/mL) e as variáveis do perfil lipídico de jejum (mg/dL) e PCR-as (mg/dL).

Cruzamentos	Coefficiente de Correlação (rs)	Valor de p
LDL-oxidada e TG	0,32	0,03*
LDL-oxidada e CT	0,47	< 0,01*
LDL-oxidada e LDL	0,30	< 0,05*
LDL-oxidada e HDL	-0,26	0,08
LDL-oxidada e PCR-as	0,20	0,19

LDL-Oxidada - Low Density Lipoprotein Oxidada; TG - Triglicerídeos; CT - Colesterol Total; HDL - High Density Lipoprotein; LDL - Low Density Lipoprotein; PCR - Proteína C Reativa de alta sensibilidade; *Teste de Correlação de Spearman.

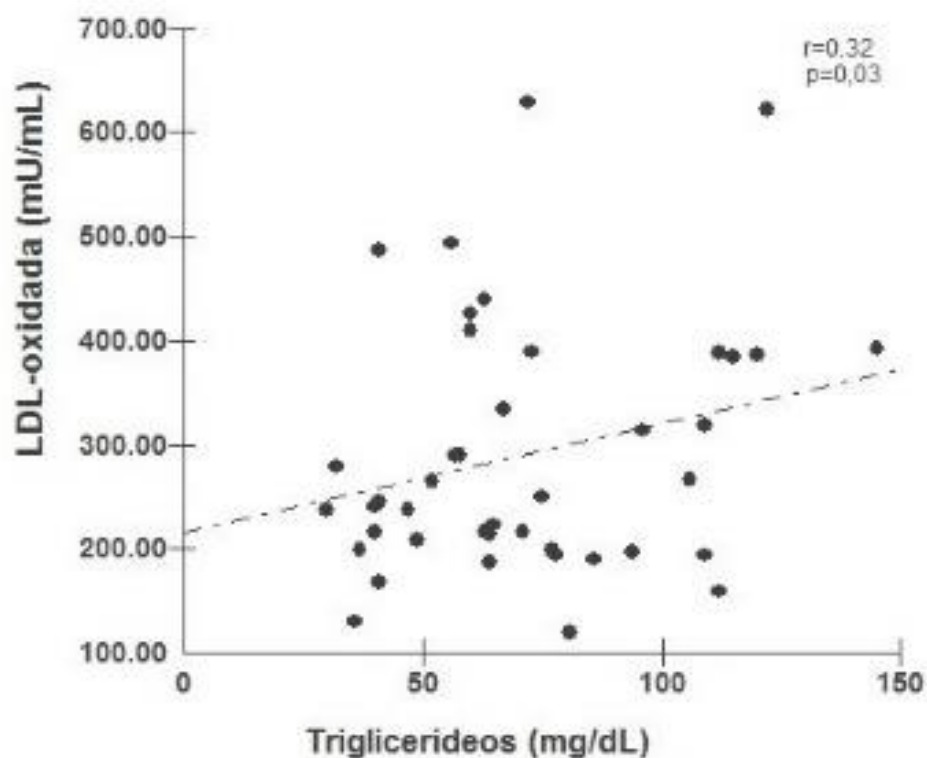


Figura 2. Gráfico de correlação entre a LDL-oxidada e os triglicerídeos.

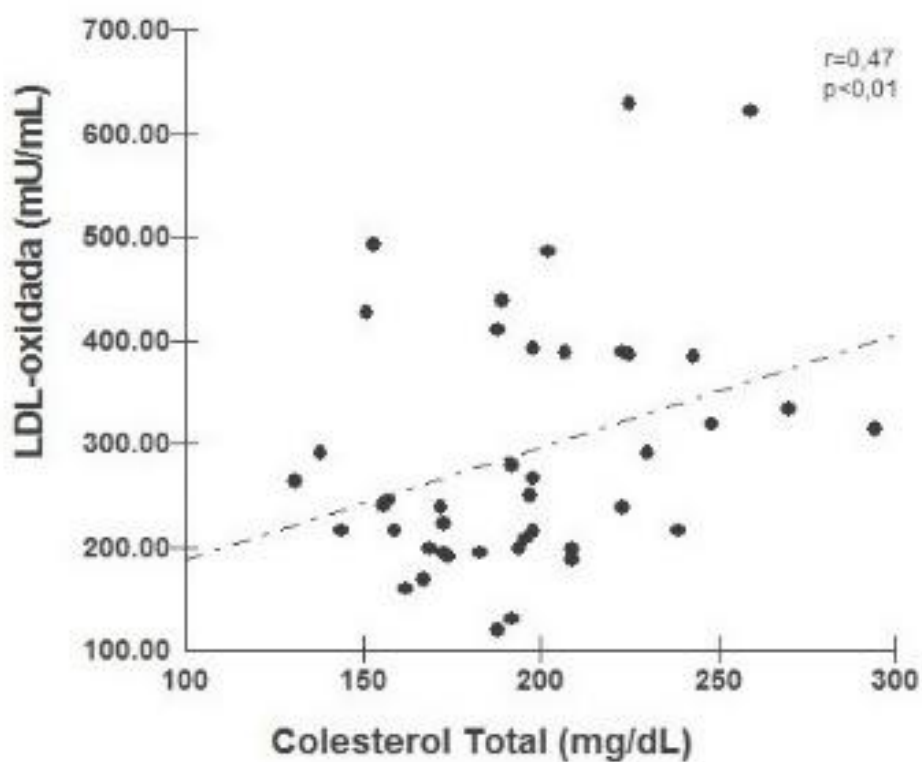


Figura 3. Gráfico de correlação entre a LDL-oxidada e o colesterol total.

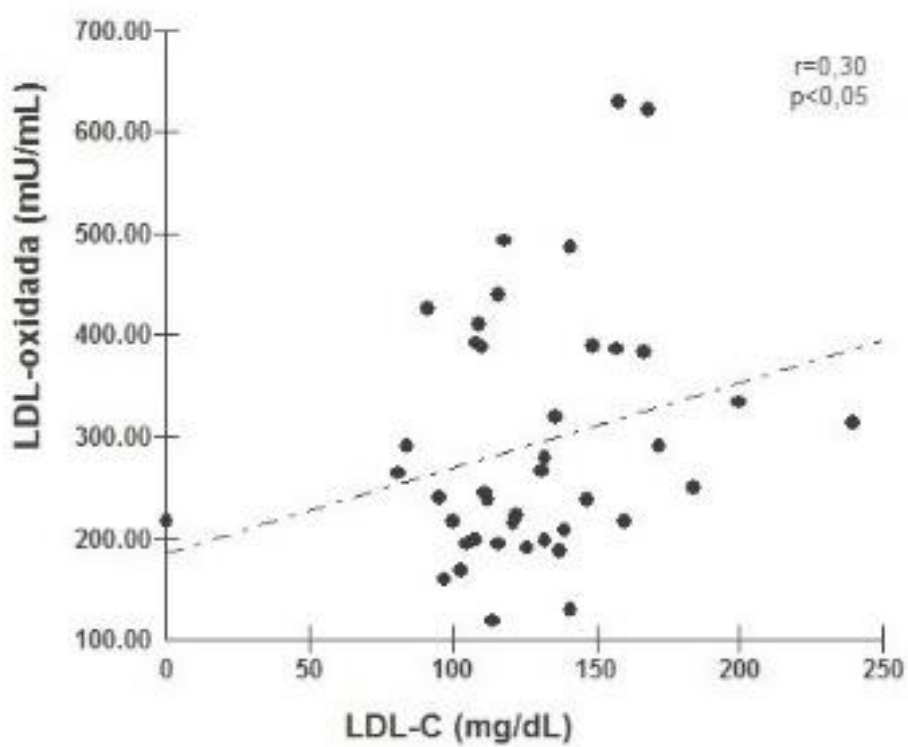


Figura 4. Gráfico de correlação entre a LDL-oxidada e a lipoproteína de baixa densidade.

8 DISCUSSÃO

Em resposta aos objetivos deste estudo, foi identificado que mulheres que utilizam COC apresentam valores mais elevados da LDL-oxidada, bem como correlação moderada positiva entre a LDL-oxidada com a LDL, com colesterol total e com os triglicerídeos. Assim, embora não seja possível estabelecer relação de causa-efeito em virtude do método empregado e, os resultados aqui apresentados são reforçados pelas características e homogeneidade da amostra, a qual, não apresenta os clássicos fatores como tabagismo, dislipidemias, diabetes mellitus e obesidade, que sabidamente poderiam induzir o aumento da LDL-oxidada.

Cabe inicialmente ressaltar que nos últimos anos evidências científicas têm deixado cada vez mais claro o papel da LDL-oxidada na fisiopatologia da aterosclerose⁸¹. Contudo, ainda não existe um mecanismo claramente definido e sim, várias hipóteses que ajudam explicar a oxidação da LDL em diferentes populações^{81,11}. Uma dessas hipóteses, demonstra que a biodisponibilidade da LDL, em associação com o estresse oxidativo parece ser o principal determinante para a formação da LDL-oxidada¹¹.

Assim, embora não tenha sido verificada diferença nos valores plasmáticos da LDL de jejum, entre os grupos estudados, é possível hipotetizar que o GCOC apresenta maior concentração da subfração mais aterogênica da LDL. Essa partícula é caracterizada por ser pequena e densa, e por apresentar menores concentrações de antioxidantes. Em conjunto, esses fatores a torna mais propensas ao dano oxidativo^{82,83}. Neste estudo, a hipótese em questão baseia-se no resultado da razão TG/HDL, a qual, foi significativamente maior no GCOC. Tem sido sugerido que a razão TG/HDL possa refletir o tamanho das partículas da LDL, sendo, valores >1, indicativos da presença de partículas pequenas e densas⁸³.

Por outro lado, em concordância com nosso estudo, Graaf et al.⁹ mostraram que mulheres que utilizam COC apresentam maiores concentrações da subfração aterogênica da LDL, fato que pode sugerir um perfil lipídico mais aterogênico nessa população.

Contrapondo ao nosso resultado, embora em uma população como idade entre 40 e 48 anos, formulação dos COC diferentes, além da presença de fatores de risco como tabagismo, doença intestinal e atividade física, o estudo ELAN⁶, não identificou

alterações significativas entre os valores plasmáticos da LDL-oxidada de mulheres que utilizam e não utilizam COC. No entanto, foi visto que nas mulheres em uso desse grupo de medicamentos, a oxidação lipídica, marcada pela maior concentração de peróxidos (-OOH), era 1.7 vezes maior. Segundo os autores, esse resultado poderia ser explicado pelo maior estresse oxidativo induzido pelo etinilstradiol presente nas formulações dos COC^{6,84}.

Corroborando com a observação supracitada, este estudo pode sugerir, assim como outras pesquisas, que mulheres em uso de COC apresentam maior estresse oxidativo^{5,6}. Hipótese que pode ser apoiada pelo significativo aumento da LDL-oxidada no GCOC, uma vez que, segundo a literatura essa lipoproteína oxidada é uma variável do estresse oxidativo⁸⁵.

De acordo como dados de literatura, as propriedades estrogênicas e androgênicas dos COC têm influência no estresse oxidativo, isso porque, esses hormônios apresentam várias ações sobre endotélio vascular, aumentando por exemplo, a biodisponibilidade do óxido nítrico, fato que não parece proteger mas sim agredir o endotélio, pelo maior estresse oxidativo⁸⁴.

Outro dado que chama atenção, é que, a LDL-oxidada apresenta correlação com outras variáveis lipídicas. De fato, nossos resultados, assim como outros estudos, indicam que a LDL-oxidada apresenta correlação moderada positiva com o colesterol total, os triglicérides e a LDL^{11,15}. Essa relação pode ser parcialmente justificada por achados que indicam que um aumento de 1mg/dL nos níveis séricos do colesterol total ou da LDL, bem como, aumento de uma unidade na relação colesterol total para HDL, podem predizer incrementos de 0.22, 12.21 e 15.78 U/L nas concentrações da LDL-oxidada respectivamente⁸⁵. Segundo a literatura, os triglicérides podem predizer independentemente de variáveis como a LDL, valores elevados da LDL-oxidada⁸⁶.

Em concordância com a literatura, nosso estudo demonstrou aumento significativo dos valores séricos dos TG, da HDL, da PCR, e da pressão arterial sistólica no GCOC, ao passo que, nenhuma diferença foi detectada nos valores da LDL^{22,87,88}. Contudo, é preciso ter cautela ao analisar os resultados referentes a LDL e a HDL, uma vez que, a razão TG/HDL é significativamente maior nesse grupo de mulheres, o que indica, um maior potencial aterogênico relacionado ao LDL. Em relação ao HDL, embora em nossa amostra seus valores estejam significativamente

elevados, ainda não se sabe quais os efeitos do COC sobre as suas subfrações, tendo em vista que, existem partículas aterogênicas da HDL²⁴.

Também é interessante notar que o COC tem sido sugerido como um fator para elevação plasmática da PCR em mulheres em idade reprodutiva. Segundo alguns autores, o uso atual dos COC pode representar de forma independente 20 a 32% da variação da PCR nessas mulheres^{89,90}. Além disso, também foi demonstrado que uma em cada três mulheres em uso de COC apresenta PCR > 3mg/L, fato que segundo a literatura pode aumentar sensivelmente o risco de eventos cardiovasculares⁸⁹.

Além disso, assim como nos nossos resultados, pesquisas têm demonstrado elevação significativa da pressão arterial em mulheres que utilizam COC^{10,91,92}. De fato, segundo alguns estudos, o uso do COC pode estar relacionado a quadros de hipertensão arterial leve e moderada, com aumentos que variam entre 20 e 40mmHg, na pressão arterial sistólica e 10 a 20mmHg, na diastólica. Ainda segundo os estudos, essa elevação pode ser revertida no prazo de três meses após interrupção do COC⁹². Tal elevação da pressão arterial pode ocorrer devido a alterações nas concentrações de eletrólitos, estresse oxidativo, resistência à insulina e maior produção da renina e angiotensinogênio hepático nessas mulheres^{10,91,92}.

Portanto, somando-se o fato de que a LDL-oxidada emerge como um fator de risco não tradicional para futuros eventos cardiovasculares em mulheres após a menopausa¹⁷, e que, na fisiopatologia da aterosclerose, além de estar presentes em todas as fases do processo aterosclerótico, ela começa a ser depositada na parede arterial de indivíduos adultos jovens, antes mesmo da formação inicial da placa de ateroma⁹³, sugere-se que mulheres em uso de COC apresentam risco cardiovascular maior que mulheres que não utilizam esse grupo de medicamentos.

A oxidação da LDL está intimamente ligada a disfunção endotelial, num processo de retroalimentação positiva. A disfunção endotelial associada ao processo inflamatório vascular arterial, são os principais responsáveis pela oxidação da LDL, que, por sua vez, provoca toxicidade das células endoteliais e atração quimiotóxica de monócitos/macrófagos retroalimentando a disfunção endotelial. Esse mecanismo é conhecido como a teoria oxidativa da aterogênese^{25,33}.

Os resultados aqui apresentados apontam mecanismos que podem ajudar a elucidar o resultado de um estudo multicêntrico que mostrou que o uso de COC está associado a um risco de infarto do miocárdio aumentado em 5 vezes na Europa e mais de 4 vezes em países não-europeus. Vale ressaltar que esse aumento está

intimamente ligado às formulações dos COC com ($\geq 50 \mu\text{g}$ de estrogênio) e a presença dos clássicos fatores de risco como tabagismo, hipertensão arterial, dislipidemias e obesidade^{18,19}. Outro interessante estudo demonstrou que mulheres em uso de COC com dosagens de etinilstradiol entre 30 a 40 μg tinham risco de trombose arterial entre 1,3 e 2,3. Já em dosagens menores (20 μg), o risco foi de 0,9 e 1,7 vezes, quando comparadas as mulheres que não utilizam esse grupo de medicamentos. Esses resultados sugerem que mesmo em baixas dosagens, os COC podem aumentar o risco de aterotrombose, fato que deve ser levado em consideração durante a sua prescrição, principalmente em mulheres que apresentem fatores de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas^{94,95}.

9 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo possui limitações que precisam ser discutidas: em primeiro lugar, a metodologia transversal aqui empregada não permite estabelecer uma relação de causa-efeito. Em segundo, a não estratificação dos tipos de COC, tendo em vista que este, mesmo sendo de terceira geração, possui diferentes formulações em concentrações de estrogênio e progestina, fato que além de causar diferentes efeitos no metabolismo, limita a generalização dos resultados quanto ao tipo de hormônio presente na formulação do contraceptivo. Em terceiro lugar, o controle dietético não foi adequadamente realizado, embora não tenham sido selecionadas voluntárias em controle ou limitação dietética, não se pode anular completamente a influência da dieta em nossos resultados.

É importante salientar que as limitações não inviabilizam a importância dos resultados do presente estudo, ao contrário disso, adicionam dados que facilitam o entendimento das alterações no perfil lipídico de mulheres em idade reprodutiva e que utilizam COC. Interessante notar que diferente das análises quantitativas já realizadas, este estudo avaliou a qualidade das LDL, indicando que embora não se tenha valores absolutos da LDL capaz de sugerir risco cardiovascular, existem alterações na qualidade dessa lipoproteína como indicada pela razão TG/HDL e pela maior oxidação no grupo que utilizava COC, que sugerem um maior potencial aterogênico nessas mulheres.

Ainda que estes resultados careçam de mais estudos, eles ajudam a compreender o risco aterotrombótico aumentado em mulheres que utilizam COC. Por outro lado, nossos dados também chamam atenção para a necessidade de estudo voltados não somente a dados quantitativos, mas, a análises que remetam a qualidade das lipoproteínas, para que se possa inferir resultados e desfechos mais precisos. Cabendo também salientar a importância de estudos longitudinais, com estratificação quanto aos tipos e formulações dos contraceptivos estudados.

Por fim, tendo em vista que no Brasil mais de 13% das mulheres que utilizam COC, que o fazem de forma inadequada, haja vista, a presença de fatores de risco que se somados ao uso dos COC, podem elevar sensivelmente a ocorrência de eventos cardiovasculares. Assim se torna necessário o monitoramento dos fatores de risco no momento que antecede a prescrição deste grupo de medicamentos, mesmo

em mulheres em idade reprodutiva. Além disso, também são necessárias a criação de estratégias de prevenção e educação em saúde para esse grupo de mulheres.

10 CONCLUSÕES

- 1) Mulheres que utilizam COC apresentam elevação dos valores plasmáticos da LDL-oxidada;
- 2) Observou-se correlação moderada e positiva da LDL-oxidada com variáveis aterogênicas do perfil lipídico;
- 3) Em conjunto esses achados sugerem maior agressão vascular, maior estresse oxidativo e conseqüentemente maior risco cardiovascular nessa população.

REFERÊNCIAS

1. Kim C, Siscovick DS, Sidney S, Lewis CE, Kiefe CI, Koepsell TD; CARDIA Study. Oral contraceptive use and association with glucose, insulin, and diabetes in young adult women: the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Diabetes Care.* 2002;25(6):1027-32.
2. Frempong BA, Ricks M, Sen S, Sumner AE. Effect of Low-Dose Oral Contraceptives on Metabolic Risk Factors in African-American Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(6): 2097–2103. doi: 10.1210/jc.2007-2599.
3. Abdel-Barry JA, Flafl MS, Al-Namaa LM, Hassan NA. Lipoprotein changes in women taking low-dose combined oral contraceptive pills: a cross-sectional study in Basra, Iraq. *East Mediterr Health J.* 2011;17(9):684-8.
4. Petto J, Vasques LM, Pinheiro RL, Giesta BA, Santos ACN, Gomes Neto M, Ladeia AM. Comparison of postprandial lipemia between women who are on oral contraceptive methods and those who are not. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(3):245-50.
5. Chen jt and Kotani k. Oral Contraceptive Therapy Increases Oxidative Stress in Pre-Menopausal Wome. *Int J Prev Med.* 2012;3(12): 893–896.
6. Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, Collette G, Haleng J, Cheramy-Bien JP, et al.. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Liège, Belgium. *Hum Reprod.* 2007;22(8):2335-43.
7. Sørensen CJ, Pedersen OB, Petersen MS, Sørensen E, Kotzé S, Thørner LW, et al. Combined Oral Contraception and Obesity Are Strong Predictors of Low-Grade Inflammation in Healthy Individuals: Results from the Danish Blood Donor Study (DBDS). *PLoS ONE.* 2014; 9(2): e88196.
8. Petto J, Pereira LS, Santos ACN, Giesta BA, Melo TA, Ladeia AMT. Inflamação Subclínica em Mulheres que Utilizam Contraceptivo Oral. *Rev Bras Cardiol.* 2013;26(6):465-71.
9. de Graaf J, Swinkels DW, Demacker PN, de Haan AF, Stalenhoef AF. Differences in the low density lipoprotein subfraction profile between oral contraceptive users and controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(1):197-02.
10. Harvey RE, Hart EC, Charkoudian N, Curry TB, Carter JR, Fu Q. Oral Contraceptive Use, Muscle Sympathetic Nerve Activity, and Systemic Hemodynamics in Young Women. *Hypertension.* 2015;66(3):590-7.
11. Holvoet P, De Keyzer D, Jacobs DR Jr. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol.* 2008;3(6):637-649.
12. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized Low-density Lipoprotein Decreases the Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 1995 270: 319-324.

13. Yang H, Mohamed ASS, Zhu S. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:85.
14. Xavier HT, Abdalla DSP, Martinez TLR, Ramires JAF, Gagliardi ART. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea in vitro de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq. Bras. Cardiol.* 2004;83(6):488-92.
15. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, et al.. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes.* 2004;53(4):1068-73.
16. Rietzschel ER, Langlois M, De Buyzere ML, et al. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol is associated with decreases in cardiac function independent of vascular alterations. *Hypertension.* 2008;52:535–541.
17. Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Ribeiro S, Rocha-Pereira P, Cotterill E, Teixeira F, et al. Markers of Increased Cardiovascular Risk in Postmenopausal Women: Focus on Oxidized-LDL and HDL Subpopulations. *Dis Markers.* 2013;35(2): 85–96.
18. Acute myocardial infarction and combined oral contraceptives: results of an international multicentre case-control study. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet.* 1997;349(9060):1202-9.
19. Baillargeon JP, McClish DK, Essah PA, Nestler JE. Association between the current use of low-dose oral contraceptives and cardiovascular arterial disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(7):3863-70.
20. Corrêa DAS. . Dissertação [Mestrado em Saúde e Enfermagem] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
21. Petto J, Silveira DW, Santos ACN, Seixas CR, Santo DGCE, Oliveira FTO, et al. Lipemia pós-prandial e inflamação subclínica em mulheres ativas que utilizam contraceptivo oral. *Int J Cardiovasc Sci.* 2015;28(3):215-223. doi.org/10.5935/2359-4802.20150031.
22. Cauci S, Di Santolo M, Culhane JF, Stel G, Gonano F, Guaschino S. Effects of third-generation oral contraceptives on high-sensitivity C-reactive protein and homocysteine in young women. *Obstet Gynecol.* 2008;111(4):857-64.
23. Loos RJ, Verhaeghe J, De Zegher F, Beunen G, Derom C, Fagard R, et al.. Markers for cardiovascular disease in monozygotic twins discordant for the use of third-generation oral contraceptives. *J Hum Hypertens.* 2003;17(7):481-5.
24. Oravec S, Dostal E, Dukát A, Gavorník P, Kucera M, Gruber K. HDL subfractions analysis: a new laboratory diagnostic assay for patients with cardiovascular diseases and dyslipoproteinemia. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32(4):502-9.

25. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
26. Gotsman I, Stabholz A, Planer D, Pugatsch T, Lapidus L, Novikov Y, et al.. Serum cytokine tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 associated with the severity of coronary artery disease: indicators of an active inflammatory burden? *Isr Med Assoc J*. 2008;10(7):494-8.
27. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(4 supl. 1):1-36.
28. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003;290(7):932-40.
29. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al.. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation* 2003;108:1664–1672.
30. Machado DF, Ferreira CLLF, Costa NMB, Oliveira TT. *Ciência Tecnol. Aliment*. 2003, 23, 270.
31. Saini HK, Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):818-39.
32. Yasue H, Hirai N, Mizuno Y, Harada E, Itoh T, Yoshimura M, et al.. Low-grade inflammation, thrombogenicity, and atherogenic lipid profile in cigarette smokers. *Circ J*. 2006;70(1):8-13.
33. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
34. Gottlieb MG, Bonardi G, Moriguchi EH. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Scientia Medica*. 2005;15(3): 203-07.
35. Lusis AJ. Genetic factors affecting blood lipoproteins: the candidate gene approach. *J Lipid Res*. 1988;29(4):397-429.
36. Carvajal CC. LDL Oxidada y la aterosclerosis. *Med. leg. Costa Rica [online]*. 2015;32(1):161-69.
37. Ross R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1997;131 Suppl:S3-4.
38. Rush JW, Ford RJ. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;37(1-2):185-92.
39. Linke A, Erbs S, Hambrecht R. Exercise and the coronary circulation-alterations and adaptations in coronary artery disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2006;48(4):270-84.
40. Furchgott RF & Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-76.

41. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(5):463-78.
42. Ganz P, Vita JA. Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation.* 2003;108(17):2049-53.
43. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(4):383-9.
44. Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation.* 2000;101(18):2144-8.
45. Schwartz D, Andalibi A, Chaverri-Almada L, Berliner JA, Kirchgessner T, Fang Z-T, et al.. Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium. *J. Clin. Invest.*1994;94:1968-73.
46. Estronca LM, Silva JC, Sampaio JL, Shevchenko A, Verkade P, Vaz AD, Vaz WL, Vieira OV. Molecular etiology of atherogenesis—in vitro induction of lipidosis in macrophages with a new LDL model. *PLoS One.* 2012 7(4):e34822.
47. Scheidegger KJ; Butler S; Witztum JL. Angiotensin II Increases Macrophage-mediated Modification of Low Density Lipoprotein via a Lipoxygenase-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 1997 272: 21609-21615.
48. Greig D, Castro P, Gabrielli L, Miranda R, Verdejo H, Alcaíno H, et al.. Inflammation and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. *Rev Med Chil.* 2008;136(6):687-93.
49. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology.* 2006;13(3):129-42.
50. Simionescu M, Simionescu N. *Endothelial Cell Biology in Health and Disease.* Plenum, New York. 1988.
51. Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation.* 1992;85(5):1927-38.
52. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 2003;108(16):1912-6.
53. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:287-299.
54. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis.* 1989;9(6):895-907.
55. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al.. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995;91(9):2488-96.

56. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
57. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med*. 2002;8(11):1211-7.
58. Yang X, Galeano NF, Szabolcs M, Sciacca RR, Cannon PJ. Oxidized low density lipoproteins alter macrophage lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. *J Nutr*. 1996;126(4 Suppl):1072S-5S.
59. Moore K & Tabas I. The cellular biology of macrophages in atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-55.
60. Nievelstein PF, Fogelman AM, Mottino G, Frank JS. Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arterioscler Thromb*. 1991;11(6):1795-805.
61. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1095-108.
62. Navab M, Hama SY, Nguyen TB, Fogelman AM. Monocyte adhesion and transmigration in atherosclerosis. *Coron Artery Dis*. 1994;5(3):198-204.
63. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol*. 1991;14(2 Suppl 1):11-16.
64. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson GK. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med*. 2000;247(3):397-405.
65. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;78(6):539-52.
66. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9709):132-40.
67. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*. 2003;107(3):363-9.
68. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Tracy RP. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol*. 2002;55(5):445-51.
69. Zieske AW, Tracy RP, McMahan CA, Herderick EE, Homma S, Malcom GT, et al. Elevated serum C-reactive protein levels and advanced atherosclerosis in youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1237-43.
70. Beck P. Effect of progestins on glucose and lipid metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 1977;1(286):434-45.

71. Petto J, Seixas CR, Feitosa LC, Bacelar JF, Cerqueira DGLES, Barbosa PRP. Índice de Homa em mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104(5Supl.3):1-39.
72. Martins WP, Soares GM, Vieira CS, Reis RM, Sá MFS, Ferriani RA. Resistência à insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos modifica fatores de risco cardiovascular. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009; 31(3):111-6.
73. O'Meara NM, Lweis GF, Cabana VG, Iverius PH, Getz GS, Polonsky KS. Role of basal triglyceride and high-density lipoprotein in determination of postprandial lipid and lipoprotein responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(2):465-71.
74. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001; 158: 1039–51.
75. Matsudo S, Araújo T, Matsudo V, Andrade D, Andrade E, Oliveira LC, et al. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Atividade Física & Saúde.* 2001;6(2):5-18.
76. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii,1-253.
77. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
78. Casazza GA, Suh SH, Miller BF, Navazio FM, Brooks GA. Effects of oral contraceptives on peak exercise capacity. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93(5):1698-702.
79. Casella M. Home monitoring of blood glucose by owners of diabetic cats and dogs: technical problems and evaluation of differences between home and hospital blood glucose curves. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de Zurique; 2003.
80. Burtis CA, Bruns DE, Ashwood ER. Tietz. Fundamentos de Química Clínica. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 1998.
81. Leiva E, Wehinger S, Guzmán L and Orrego R. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis, Hypercholesterolemia, Dr. Sekar Ashok Kumar (Ed.) 2015, InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/hypercholesterolemia/role-of-oxidized-ldl-in-atherosclerosis>.
82. van der Zwan LP, Teerlink T, Dekker JM, Henry RM, Stehouwer CD, Jakobs C, et al. Circulating oxidized LDL: determinants and association with brachial flow-mediated dilation. *J Lipid Res.* 2009;50(2):342-9.
83. Maruyama C, Imamura K, Teramoto T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2003;10(3):186-91.

84. Andozia MB, Vieira CS, Franceschini SA, Torqueti Tolloi MR, Silva de Sá MF, Ferriani RA. Ethinylestradiol and estradiol have different effects on oxidative stress and nitric oxide synthesis in human endothelial cell cultures. *Fertil Steril*. 2010;94(5):1578-82.
85. Barbosa KB, Volp AC, Hermsdorff HH, Navarro-Blasco I, Zulet MÁ, Martínez JA, et al. Relationship of oxidized low density lipoprotein with lipid profile and oxidative stress markers in healthy young adults: a translational study. *Lipids Health Dis*. 2011;10:61.
86. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol*. 2004;59(5):479-84.
87. Godsland IF, Crook D, Simpson R, Proudler T, Felton C, et al. The effects of different formulations of oral contraceptive agents on lipid and carbohydrate metabolism. *N Engl J Med*. 1990;323(20):1375-81.
88. Sherif K. Benefits and risks of oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:S343-8.
89. Raitakari M, Mansikkaniemi K, Marniemi J, Viikari JS, Raitakari OT. Distribution and determinants of serum high-sensitive C-reactive protein in a population of young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J Intern Med*. 2005;258(5):428-34.
90. Dreon DM, Slavin JL, Phinney SD. Oral contraceptive use and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Life Sci*. 2003;73(10):1245-52.
91. Lubianca JN, Moreira LB, Gus M, Fuchs FD. Stopping oral contraceptives: an effective blood pressure-lowering intervention in women with hypertension. *J Hum Hypertens*. 2005;19:451-5.
92. Haroon S, Naveed KA. Effect of hormonal contraceptives on serum electrolytes and blood pressure. *J Post Med Inst* 2014;28(4): 409-13.
93. Uchida Y, Maezawa Y, Uchida Y, Hiruta N, Shimoyama E, Localização de Oxidado lipoproteína de baixa densidade e sua relação com Plaque Morfologia em artérias coronárias humanas Kawai S (2013). *PLoS ONE* 8 (2): e55188.
94. Lidegaard O, Lokkegaard E, Jensen A, Skovlund CW, Keiding N. Thrombotic stroke and myocardial infarction with hormonal contraception. *N Engl J Med*. 2012;366(24):2257-66.
95. Brito MB, Nobre F, Vieira CS. Contracepção Hormonal e Sistema Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(4):e81-e89.

APÊNDICE I

QUESTIONÁRIO PADRÃO E EXAME FÍSICO

Data: ___/___/_____

Horário: ___:___

1.Momento♥ **Identificação:**

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/_____

Idade: _____

Sexo: ()F ()M

Grau de instrução: () 1º grau () 2º grau () 3º grau

Outro: _____

Profissão: _____ Telefone: _____

Etnia: _____

2.Momento♥ **Fármacos**

A. () Não utiliza

B. () Utiliza:

➤ Qual(is): _____

➤ Finalidade: _____

➤ Dosagem: _____

♥ **Tabagismo**

A. () Não fumante

B. () Fumante

Quantidade: _____

Tempo de

uso: _____

C. () Ex-fumante

Tempo de uso: _____

Tempo de abstinência: _____

3.Momento♥ **Contraceptivo oral**

A. () Não utiliza

B. () Utiliza:

➤ Qual utiliza: _____

➤ Tempo de uso: _____

4.Momento♥ **Limitações ao exercício**

A. () Gonartrose

C. () Labirintite

B. () Relatos de hipoglicemia

D. () Hipotensão

postural

5.Momento♥ **Massa corpórea:** _____ kg**Altura:** _____ cm**IMC:** _____**CA:** _____♥ **TA em repouso:**

#####	TA em supino (mmHg)	TA em sedestação (mmHg)	TA em ortostase (mmHg)
Braço D.			
Braço E.			

APÊNDICE II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: **Avaliação da Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada em Mulheres que Utilizam em não Utilizam Contraceptivo Oral Combinado.**

Pesquisador Responsável: **Ana Marice Teixeira Ladeia**

Pesquisador Colaborador: **Alan Carlos Nery dos Santos**

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: **Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública**

Telefones para contato: **(71) 9964 2420 - (71) 9227 7737**

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

R.G: _____

O Sr.^(a) _____ está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa "**Avaliação da Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada em Mulheres que Utilizam em não Utilizam Contraceptivo Oral Combinado**", de responsabilidade da pesquisadora Ana Marice Teixeira Ladeia.

Justificativa e Objetivo

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar o efeito do contraceptivo oral na gordura sanguínea.

Este trabalho se justifica no fato de verificar os riscos do uso do contraceptivo oral. Por fim, o presente trabalho ajudará a entender quais os riscos que os contraceptivos de última geração causam no perfil lipídico e também sobre a função do coração.

Passos do Estudo

Em primeiro lugar se faz necessário dizer que todas as informações pessoais (nome, endereço, fotos e dados pessoais) não serão expostas na pesquisa. **É necessário também dizer que os participantes não terão nenhuma despesa financeira relacionada à pesquisa.**

O primeiro passo de nosso trabalho é coletar os dados clínicos através de um questionário padrão e de um exame físico.

No segundo passo será realizado um exame de sangue em jejum de 12 horas, em um laboratório especializado. Nesse exame serão coletados 10 ml de sangue e então dosadas as gorduras sanguíneas, a glicose e a proteína C reativa. Esses exames tem

a função de verificar a inflamação nas artérias e a gordura que está circulando no sangue e que pode causar placa de gordura.

Todos os resultados dos testes serão armazenados e repassados ao voluntário no final da pesquisa.

Esse estudo não apresenta nenhum risco de agravamento da condição clínica do participante, nem de contágio de outras doenças. Todo o material utilizado é esterilizado e descartável e os exames serão realizados em laboratório especializado e por profissionais habilitados e experientes.

Qualquer dúvida do voluntário em relação a algum procedimento poderá ser sanada diretamente com o pesquisador responsável ou colaboradores.

Fica assegurado o direito do voluntário, a qualquer momento do estudo, desistir de participar da pesquisa.

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

10.1 Ou

Eu, _____, RG nº _____,
responsável legal por _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Salvador, _____ de _____ de 2014.

Nome e assinatura da voluntária ou seu responsável legal

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

Testemunha

Testemunha

ANEXO I

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA

Nome: _____

Data: ____ / ____ / ____

Idade: ____

Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gastou fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

- Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez:

1a) Em quantos dias da última semana você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

1b) Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: ____ Minutos: ____

2a) Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

2b) Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: ____ Minutos: ____

3a) Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b) Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a) Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de semana? _____ horas ____ minutos

4b) Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um dia de final de semana? _____ horas
____ minutos

ANEXO II

Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Rede de
Ensino

IMES

INSTITUTO MANTENEDOR DE ENSINO SUPERIOR

FTC
FACULDADE DE TECNOLOGIA E DESIGN

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DO CEP/IMES

O protocolo nº 3390 **Título do projeto:** Comparação da lipemia pós prandial em mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral, teve **PARECER considerado APROVADO**, na Reunião Plenária do CEP/IMES realizada em 13 de junho de 2011.

(X) Aprovado
() Não Aprovado
() Projeto com Pendências
() Aprovado com Recomendações

Dar conhecimento ao pesquisador, e lembrar a necessidade de entrega do relatório final.

Atenciosamente,


Juliana Vieira
ASSISTENTE ADMINISTRATIVA

ANEXO III**Artigo Original com Dados da Dissertação**

Artigo Principal: Formatado para submissão no **Journal of Lipid Research**.

Original Article

ELEVATION OF OXIDIZED LDL IN USERS OF COMBINED ORAL
CONTRACEPTIVES

Running Title

oxLDL AND ORAL CONTRACEPTIVES

ABSTRACT

The use of combined oral contraceptives (COCs) has been associated with changes in the lipid metabolism and higher oxidative stress, which suggest higher oxidation of the lipoproteins. In this study, we determined if there is a difference in the plasma values of oxidized LDLs (oxLDLs) between women who use and those that do not use COCs, and we also assessed the correlation between oxLDLs and the lipid profile and C-reactive protein. The study population consisted of 42 women satisfying our selection criteria. They were divided into the COC group, consisting of 21 women using low-dose ethinyl oestradiol contraceptives (15–30 mcg) for at least one year, and the control group, consisting of 21 women who did not use any type of hormonal contraceptive for at least one year. Our results showed that women who use COCs exhibited higher values of oxLDLs ($p < 0.01$) than those who do not use this drug. We also observed a moderate and positive correlation between oxLDLs with LDLs, total cholesterol, and the triglycerides. Our results may suggest a lipid profile with greater atherogenic potential related to the use of COCs.

Keywords: Oxidative Stress, Cardiovascular Diseases, Atherosclerosis, Metabolism.

INTRODUCTION

Studies show that women who use combined oral contraceptives (COCs) exhibit changes in glucose metabolism (1,2), lipid metabolism (3,4), oxidative stress (5,6), and chronic subclinical inflammation (7,8). Some studies have also identified an increase in both the atherogenic subfractions of LDLs (9) and blood pressure (10); these latter alterations are found to be related with LDL oxidation (11).

Once oxidized, LDLs inhibit the mRNA expression of the endothelial nitric oxide synthase enzyme, causing reduced production of nitric oxide and favouring atherosclerosis (12). Furthermore, they also impair the main mechanisms in the endothelialisation of the lesioned areas during atherosclerosis, which include the proliferation, cell motility, and action of endothelial stem cells (13,14). It has also been suggested that higher values of oxLDLs, even within normal limits, are associated with higher risk of cardiovascular events and metabolic syndrome (1,15-17).

Owing to the relevance of the topic and the absence of studies on LDL oxidation in young women, without other factors that justify the oxidation, we tested our hypothesis that there is a difference in the plasma values of oxLDLs between women who use and do not use COCs. The correlation between oxLDLs and the variables of the fasting lipid profile and C-reactive protein (CRP) was also assessed.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The study was an analytical cross-sectional study, which considered the use of COCs as a predictive variable and oxLDLs as an outcome variable.

The study population consisted of 42 normal-weight, nulliparous, irregularly active women aged between 19–30 years, with fasting values for triglycerides at <150 mg/dL and

glucose at <100 mg/dL, and who used or did not use COCs. All participants were students at a private university located in the city of Salvador, Bahia in Brazil.

The sample was divided into two groups: the COC group (COCG) comprised of 21 women using low-dose ethinyl oestradiol COCs (15–30 mcg) for at least one year, and the control group (CG), consisting of 21 women who had not been using any type of hormonal contraceptive for at least one year.

To determine if the participants were irregularly active, the long version of the International Physical Activity Questionnaire developed by the World Health Organization and by the US Centers for Disease Control and Prevention was used (18).

Women who reported a family history of dyslipidaemia, hypo- or hyperthyroidism, a history of alcoholism or smoking, polycystic ovary syndrome, a hypo- or hyperlipid diet, use of dietary supplements or anabolic substances, or use of lipid-lowering drugs, corticoids, diuretics, or beta-blockers were excluded from the study. Women exhibiting values of systemic blood pressure at levels $\geq 140/90$ mmHg, waste circumference of ≥ 80 cm in the physical evaluation, or, in the laboratory test, exhibiting abnormal glutamic-pyruvic transaminase (GPT), oxidative (GOT), or creatinine were also excluded. GPT and GOT were assessed to identify pancreatic and hepatic diseases, and creatinine to identify the presence of renal dysfunction.

All participants answered the semi-structured questionnaire prepared by the authors and underwent a physical examination. This exam consisted of measuring resting blood pressure (BP), total body mass, stature, and waist circumference.

The Body Mass Index (BMI) was calculated with the measurements of mass and height, according to the Quetelet equation: $\text{mass (kg)} / \text{height}^2$ (cm). The BMI cut points used were those recommended by the IV Brazilian Directive on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis from the Department of Atherosclerosis of the Brazilian Cardiology Society –

underweight (BMI <18.5); normal weight (BMI 18.5-24.9); overweight (BMI 25-29.9), and obese (BMI \geq 30).

The waist circumference was obtained by measuring using metallic and inelastic Starrett[®] metric tape with a precision of 0.1 cm. It was measured at the smallest circumference located between the last rib and the iliac crest without compressing the tissues (20).

Laboratory Data Collection Protocol

All participants were directed to the Clinical Pathology Laboratory in the city of Salvador, Bahia in Brazil for blood sample collection. After puncturing the antecubital vein, 10 mL of blood was collected for measuring TGs, oxidized LDLs (oxLDLs), HDLs, total cholesterol (TC), glucose, GPT, and GOT. The LDLs and VLDLs were calculated by the Friedewald equation (21): $TC = HDLs + LDLs + VLDLs$, with $VLDLs = TGs/5$.

The collections were performed after a 12-hour fasting period. Participants were instructed not to change their diet during the week of the test, not to engage in physical activity other than their habitual activities, and not to ingest alcoholic beverages for 24 hours prior to the laboratory exam. For the CG, the collections were performed between the fifth and tenth day of the menstrual cycle, considering the lowest hormonal fluctuations, as recommended by Casazza et al. (22). Blood was collected by a trained professional.

An ELISA kit was used to determine oxLDLs in the serum samples. The TG, HDL, total cholesterol, and glucose values were obtained through the Trinder enzymatic colorimetric method (23). GPT and GOT were measured using the Reitman-Frankel colorimetric method (24).

The sample size calculation was performed by the software program GraphPad StatMate 2.0 for Windows. For an alpha of 5%, beta of 80%, and significant difference of 20% between the groups, 18 women were required for each group.

Statistics

To verify the distribution of the data, symmetry, kurtosis, and Shapiro-Wilk tests were applied initially. The values of the normally distributed variables were described using the mean and standard deviation, and the values of non-parametric variables using the median and interquartiles.

The unpaired two-way Student's *t* test was used for the intergroup comparison of the parametric variables, and the Mann-Whitney for the non-parametric variables. We also verified the correlation between the oxLDL values with all variables from the lipid profile – TGs, total cholesterol, HDLs, LDLs, and CRPs. In the correlation analyses, the Spearman correlation coefficient was used. All statistical analyses were performed using the BioStat 5.0 package, adopting a significance level of 5%.

Ethical Aspects

The guidelines on research involving human beings from the Declaration of Helsinki and from Resolution 466/12 of the Brazilian National Health Council were followed throughout the entire study. This study was submitted and approved by the Research Ethics Committee from the Salvador School of Science and Technology in Bahia, Brazil, under number 3390/2010.

All participants received detailed information on the study objectives, risks, and benefits involved in the procedures and signed the free and informed consent form. Two copies of each form were signed, one remaining with the participants and the other with the researchers.

RESULTS

Table 1 shows the clinical and anthropometric characteristics of the samples. There was an observed homogeneity between the groups. Moreover, the systolic blood pressure ($p < 0.02$) and CRPs ($p < 0.010$) were higher in COCG than in CG.

A comparison of the fasting lipid variables and the TG/HDL ratio (**Table 2**) shows that the COCG exhibited higher plasma values for TGs ($p < 0.01$), total cholesterol ($p < 0.01$), HDLs ($p < 0.04$), VLDLs ($p < 0.01$), and TG/HDL ratio ($p < 0.01$) than CG.

Figure 1 shows that women from the COCG exhibited oxLDLs plasma levels that are much higher than those of the CG. The values were 384 mU/mL (198–410) and 283 mU/mL (208–250 ($p < 0.01$), respectively.

Table 3 presents the correlation analyses between oxLDLs and the variables of the fasting lipid profile, as well as between oxLDLs and CRPs. There was a moderate and positive linear association between oxLDLs and LDLs, TGs, and total cholesterol.

DISCUSSION

In this study, we found that women who use COCs exhibited much higher values of oxLDLs, and a moderate and positive correlation between oxLDLs with LDLs, total cholesterol, and TGs. Thus, although it is not possible to establish a perfect cause-effect relationship owing to the method used, non-stratification of the types of COCs and effects of regionality, the results presented here are reinforced by the characteristics and homogeneity of the sample, which did not exhibit the classic factors known to increase oxLDLs. In this regard, although there is no clearly defined mechanism, some hypotheses may explain the increased oxLDLs in women using COCs.

The bioavailability of oxidative stress-associated LDLs has been shown to be the main factor in oxLDL formation (11). Although we have not identified a difference in the fasting plasma values of LDLs between the groups studied, we suggested that COCG exhibited higher concentration of the atherogenic subfraction of LDLs. These small and dense particles with lower concentrations of antioxidants are more prone to oxidation (25). This hypothesis is based on the significantly higher TG/HDL ratio in COCG. This ratio reflects the size of the LDL particles, such that values >1 indicate the presence of small and dense particles (26).

In agreement with our study, Graaf et al. (9) showed that women using COCs exhibited higher concentrations of the atherogenic subfraction of LDLs, which may suggest a more atherogenic lipid profile in this population. Meanwhile, in contrast with our results, the ELAN (6) study did not identify significant differences between the plasma values of oxLDLs in women aged 40–48 years old who used and did not use oral contraceptives and were exposed to factors such as smoking, intestinal disease, and physical activity. However, in women using ethinyl oestradiol, the lipid oxidation, indicated by higher peroxide concentration, was 1.7 times higher. According to the authors, this result might be explained by the greater oxidative stress induced by the ethinyl oestradiol present in oral contraceptives, as well as by the high values of copper and selenium in the plasma of these women (6). Considering these studies, we can suggest that the women using COCs exhibited higher oxidative stress (5,6). This hypothesis can be justified by the significant increase of oxLDLs in the COCG. Thus, it has been shown that the estrogenic and androgenic properties of COCs influence oxidative stress. These hormones increase the bioavailability of nitric oxide in the vascular endothelium, which in turn harms the endothelium due to higher oxidative stress (27).

Similar to other studies, our results also showed that oxLDLs exhibited a moderate and positive correlation with the variables of the fasting lipid profile, such as total cholesterol, TGs, and LDLs (11,15). This relationship can be partially justified by findings showing that an increase of 1 mg/dL in the serum levels of total cholesterol or LDLs and of one unit in the total cholesterol to HDL relationship, can predict increments of 0.22, 12.21, and 15.78 U/L in the concentrations of oxLDLs, respectively (28). Moreover, triglycerides can predict high values of oxLDLs independently of lipid variables, such as LDLs (29).

Our study also showed that there was a significant increase in the serum values of TGs, HDLs, and CRPs, and the values of systolic blood pressure in COCG, while no difference was detected in the LDL values (30-32). The increase in HDLs while none in LDLs can be explained

by the beneficial effects of COCs on the lipid profile of women of reproductive age despite elevated TGs (30). However, caution is required when analysing this result since the TG/HDL ratio is significantly higher in this group and the effects of COCs on the HDL subfractions are still unknown (33).

It is also interesting to note that use of COCs has been suggested as an independent factor for the increase of plasma CRPs in women of reproductive age. According to some authors, the current use of COCs may independently represent 20% to 32% of the variation of the CRPs in these women (34,35). Furthermore, it has been shown that one in three women using COCs exhibited CRPs >3 mg/L, which may significantly increase the risk of cardiovascular events (34).

In addition, previous studies have demonstrated a significant increase in blood pressure of women using COCs (36-38). The use of COCs may be related to mild and moderate arterial hypertension, with increases that vary between 20 and 40 mmHg in systolic blood pressure and 10 to 20 mmHg in diastolic blood pressure. Furthermore, this increase can be reversed in a period of three months after discontinuing use of COC (37). This increased blood pressure may occur due to changes in the concentrations of electrolytes, oxidative stress, insulin resistance, and greater production of renin and angiotensinogen in these women (36,38).

Oxidized LDLs emerge as a non-traditional risk factor for cardiovascular events in women after menopause (17) and its deposition in the arterial walls of young adults have started even before the initial formation of atheromatous plaque (39). Therefore, it is suggested that women using COCs show higher cardiovascular risk than women who do not use these drugs. LDL oxidation is closely tied to endothelial dysfunction in a positive feedback process. Endothelial dysfunction associated with the arterial vascular inflammation process is the main factor responsible for LDL oxidation that, in turn, cause toxicity of the endothelial cells and

chemotactic attraction of monocytes/macrophages, feeding back into endothelial dysfunction. This mechanism is known as the oxidative theory of atherogenesis (40,41).

The results presented here indicate mechanisms that may elucidate the results of a meta-analysis that showed that use of COCs is associated with a risk of myocardial infarction that is increased by five times in Europe and more than four times in non-European countries (42). It is interesting to note that COCs may considerably increase the risk of cardiovascular events and susceptibility to cerebral ischemia (43).

In summary, the findings of this study indicated that women who use COCs exhibit a significant increase in the plasma values of oxLDLs and higher concentrations of the small and dense subfractions of LDLs. We also identified a moderate and positive correlation of oxLDLs with the atherogenic variables of the lipid profile, which implies greater vascular aggression and, consequently, greater cardiovascular risk. Lastly, we can also suggest greater oxidative stress, represented indirectly by the higher concentration of oxLDLs.

REFERENCES

1. Kim, C., D. S. Siscovick, S. Sidney, C. E. Lewis, C. I. Kiefe, and T. D. Koepsell. 2002. Oral contraceptive use and association with glucose, insulin, and diabetes in young adult women: the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Diabetes Care.* **25**: 1027–1032.
2. Frempong, B. A., M. Ricks, S. Sen, and A. E. Sumner. 2008. Effect of low-dose oral contraceptives on metabolic risk factors in African-American women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**: 2097–2103. doi: 10.1210/jc.2007-2599.
3. Abdel-Barry, J. A., M. S. Flaf, L. M. Al-Namaa, and N. A. Hassan. 2011. Lipoprotein changes in women taking low-dose combined oral contraceptive pills: A cross-sectional study in Basra, Iraq. *East Mediterr. Health J.* **17**: 684–688.

4. Petto, J., L. M. Vasques, R. L. Pinheiro, B. de A. Giesta, A. C. N. Santos, M. Gomes Neto, and A. M. Ladeia. 2014. Comparison of postprandial lipemia between women who are on oral contraceptive methods and those who are not. *Arq. Bras. Cardiol.* **103**: 245–250.
5. Chen, J. T., and K. Kotani. 2012. Oral contraceptive therapy increases oxidative stress in premenopausal women. *Int. J. Prev. Med.* **3**: 893–896.
6. Pincemail, J., S. Vanbelle, U. Gaspard, G. Collette, J. Haleng, J. P. Cheramy-Bien, C. Charlier, J.P. Chapelle, D. Giet, A. Albert, R. Limet, and J. O. Defraigne. 2007. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Liège, Belgium. *Hum. Reprod.* **22**: 2335–2343.
7. Sørensen, C. J., O. B. Pedersen, M. S. Petersen, E. Sørensen, S. Kotzé, L. W. Thømer, H. Hjalgrim, A. S. Rigar, B. Møller, K. Rostgaard, M. Riiskjaer, H. Ullum, and C. Erikstrup. 2014. Combined oral contraception and obesity are strong predictors of low-grade inflammation in healthy individuals: Results from the Danish Blood Donor Study (DBDS). *PLoS ONE*. **9**: e88196. doi:10.1371/journal.pone.0088196.
8. Petto, J., L. S. Pereira, A. C. N. Santos, B. A. Giesta, T. A. Melo, and A. M. T. Ladeia. 2013. Inflamação subclínica em mulheres que utilizam contraceptivo oral. *Rev. Bras. Cardiol.* **26**: 465–471.
9. de Graaf, J., D. W. Swinkels, P. N. Demacker, A. F. de Haan, and A. F. Stalenhoef. 1993. Differences in the low density lipoprotein subfraction profile between oral contraceptive users and controls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**: 197–202. doi.org/10.1210/jcem.76.1.8421088.
10. Seema, B., M. Amna, Z. Memon, and M. Bibi. 2008. Contraceptives knowledge and the practices in two districts of Sindh, Pakistan: a hospital based study. *J. Pak. Med. Assoc.* **58**: 254–258.
11. Holvoet, P., D. De Keyzer, and D. R. Jacobs Jr. 2008. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol.* **3**: 637–649.

12. Liao, J. K., W. S. Shin, W. Y. Lee, and S. L. Clark. 1995. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **270**: 319–324. doi:10.1074/jbc.270.1.319.
13. Yang, H., A. S. S. Mohamed, and S. Zhu. 2012. Oxidized low-density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* **11**: 85. doi:1186/1476-511–85.
14. Xavier, H. T., D. S. P. Abdalla, T. L. R. Martinez, J. A. F. Ramires, and A. R. T. Gagliardi. 2004. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea in vitro de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq. Bras. Cardiol.* **83**: 488–492. doi.org/10.1590/S0066-782X2004001800007.
15. Holvoet, P., S. B. Kritchevsky, R. P. Tracy, A. Mertens, S. M. Rubin, J. Butler, B. Goodpaster, and T. B. Harris. 2004. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes.* **53**: 1068–1073.
16. Rietzschel, E. R., M. Langlois, M. L. De Buyzere, P. Segers, D. De Bacquer, S. Bekaert, L. Cooman, P. Van Oostveldt, P. Verdonck, G. G. De Backer, and T. C. Gillebert. 2008. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol is associated with decreases in cardiac function independent of vascular alterations. *Hypertension.* **52**: 535–541.
17. Mascarenhas-Melo, F., J. Sereno, E. Teixeira-Lemos, S. Ribeiro, P. Rocha-Pereira, E. Cotterill, F. Teixeira, and F. Reis. 2013. Markers of increased cardiovascular risk in postmenopausal women: Focus on oxidized-LDL and HDL subpopulations. *Dis Markers.* **35**: 85–96. doi: 10.1155/2013/724706
18. US Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Division of Nutrition and Physical Activity. [Internet]. Physical activity and health: a report of the Surgeon General. Executive Summary. 1996. [cited 2014 Dec 20]. Available from: <<http://www.cdc.gov/nccdphp/sgr/summary.htm>>

19. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2007. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da SBC. *Arq. Bras. Cardiol.* **88**(supl. 1): 2–19.
20. World Health Organization. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **894**: i-xii, 1–253.
21. Friedewald, W. T., R. I. Levy, and D. S. Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**: 499–502.
22. Casazza, G. A., S. H. Suh, B. F. Miller, F. M. Navazio, and G. A. Brooks. 1985. Effects of oral contraceptives on peak exercise capacity. *J. Appl. Physiol.* **93**: 1698–1702.
23. Casella, M. 2003. Home monitoring of blood glucose by owners of diabetic cats and dogs: technical problems and evaluation of differences between home and hospital blood glucose curves. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de Zurique.
24. Burtis, C. A., D. E. Bruns, and E. R. Ashwood. 1998. Tietz. Fundamentos de Química Clínica. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan.
25. van der Zwan, L. P., T. Teerlink, J. M. Dekker, R. M. Henry, C. D. Stehouwer, C. Jakobs, R. J. Heine, P. G. Scheffer. 2009. Circulating oxidized LDL: determinants and association with brachial flow-mediated dilation. *J. Lipid Res.* **50**: 342–349. doi: 10.1194/jlr.P800030-JLR200.
26. Maruyama, C., K. Imamura, and T. Teramoto. 2003. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. *J. Atheroscler. Thromb.* **10**: 186–191.
27. Andozia, M. B., C. S. Vieira, S. A. Franceschini, M. R. Torqueti Tolloi, M. F. Silva de Sá, and R. A. Ferriani. 2010. Ethinylestradiol and estradiol have different effects on oxidative stress and nitric oxide synthesis in human endothelial cell cultures. *Fertil. Steril.* **94**: 1578–1582. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.08.052.

28. Barbosa, K. B., A. C. Vol, H. H. Hermsdorff, I. Navarro-Blasco, M. Á. Zulet, J. A. Martínez, and J. Bressan. 2011. Relationship of oxidized low density lipoprotein with lipid profile and oxidative stress markers in healthy young adults: a translational study. *Lipids Health Dis.* **10**:61. doi: 10.1186/1476-511X-10-61.
29. Holvoet, P. 2004. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol.* **59**: 479–484.
30. Cauci ,S., M. Di Santolo, J. F. Culhane, G. Stel, F. Gonano, and S. Guaschino. 2008. Effects of third-generation oral contraceptives on high-sensitivity C-reactive protein and homocysteine in young women. *Obstet. Gynecol.* **111**: 857–864. doi: 10.1097/AOG.0b013e31816a2476.
31. Godsland, I. F., D. Crook, R. Simpson, T. Proudler, C. Felton C, B. Lees, V. Anyaoku, M. Devenport, and V. Wynn. 1990. The effects of different formulations of oral contraceptive agents on lipid and carbohydrate metabolism. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1375–1381.
32. Sherif, K. 1999. Benefits and risks of oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**: S343–8.
33. Oravec, S., E. Dostal, A. Dukát, P. Gavorník, M. Kucera, and K. Gruber. HDL subfractions analysis: a new laboratory diagnostic assay for patients with cardiovascular diseases and dyslipoproteinemia. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **32**: 502–509.
34. Raitakari, M., K. Mansikkaniemi, J. Marniemi, J. S. Viikari, and O. T. Raitakari. 2005. Distribution and determinants of serum high-sensitive C-reactive protein in a population of young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J. Intern. Med.* **258**: 428–434.
35. Dreon, D. M., J. L. Slavin, and S. D. Phinney. 2003. Oral contraceptive use and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Life Sci.* **73**: 1245–1252.
36. Seema, B., M. Amna, Z. Memon, and M. Bibi. 2008. Contraceptives knowledge and the practices in two districts of Sindh, Pakistan: a hospital based study. *J. Pak. Med. Assoc.* **58**: 254–258.

37. Lubianca, J. N., L. B. Moreira, M. Gus, and F. D. Fuchs. 2005. Stopping oral contraceptives: an effective blood pressure-lowering intervention in women with hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **19**: 451–455.
38. Haroon, S., and K. A. Naveed. 2014. Effect of hormonal contraceptives on serum electrolytes and blood pressure. *J. Post Med. Inst.* **28**: 409–413.
39. Uchida, Y., Y. Maezawa, Y. Uchida, N. Hiruta, E. Shimoyama and S. Kawai. 2013. Localização de Oxidado lipoproteína de baixa densidade e sua relação com Plaque Morfologia em artérias coronárias humanas. *PLoS ONE.* **8**: e55188. doi: 10.1371 / journal.pone.0055188.
40. Ross, R. 1999. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* **340**: 115–26.
41. Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* **420**: 868–874.
42. WHO (1997) Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Acute myocardial infarction and combined oral contraceptives: results of an international multicentre case-control study. *Lancet.* **349**: 1202–1209.
43. Baillargeon, J. P., D. K. McClish, P. A Essah, and J. E. Nestler. 2005. Association between the current use of low-dose oral contraceptives and cardiovascular arterial disease: a meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**: 3863–3870.

Table 1. Clinical and antropometric characteristics of women who used and did not use combined oral contraceptives (n=42).

Variables	COCG (n=21)	CG (n=21)	p Value
Age (years)	23 ± 3.1	23 ± 3.4	0.98
Body Mass Index (kg/m ²)	20 ± 2.1	19 ± 2.8	0.07 ^a
Waist Circumference (cm)	73 ± 7.8	70 ± 5.9	0.32
Systolic Blood Pressure (mmHg)	118 ± 8.8	111 ± 9.7	0.02 ^a
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	77 (74 – 80)	70 (70 – 80)	0.18
C-Reactive Protein (mg/L)	2.7 (1.8 – 6.4)	0.9 (0.5 – 1.1)	< 0.01 ^b
Glucose (mg/dL)	82 ± 6.9	83 ± 5.7	0.57
Glutamic-Pyruvic Transaminase (U/L)	15 ± 4.2	14 ± 3.4	0.16
Time of Use of COCs (years)	3.7 ± 2.3	-	-

COCG – Combined Oral Contraceptive Group; CG – Control Group; COCs – Combined Oral Contraceptives.

^aTwo-way Student t test for independent samples.

^bTwo-way Mann-Whitney test.

Table 2. Comparison of fasting lipids (mg/dL) between the groups studied.

Variables	COCG (n=21)	CG (n=21)	p Value
TGs	95 (73 – 112)	49 (40 – 64)	< 0.01 ^a
Total Cholesterol	210 ± 38.6	183 ± 29.7	0.01 ^b
HDLs	58 ± 19.3	48 ± 11.5	0.04 ^a
LDLs	134 ± 35.1	126 ± 27.7	0.42
VLDLs	19 (15 – 22)	10 (8 – 13)	< 0.01 ^a
TG/HDL Ratio	1.7 ± 0.5	1.1 ± 0.5	< 0.01 ^b

COCG – Combined Oral Contraceptive Group; CG – Control Group .

^aTwo-way Mann-Whitney test.

^bTwo-way Student t test for independent samples.

Table 3. Correlation analysis between oxLDLs (mU/mL) and the variables of the fasting lipid profile (mg/dL) and CRPs (mg/dL).

Crossings	Correlation Coefficient (rs)	<i>p</i> Value
oxLDLs and TGs	0.32	0.03 ^a
oxLDLs and TC	0.47	< 0.01 ^a
oxLDLs and LDLs	0.29	0.05 ^a
oxLDLs and HDLs	0.26	0.08
oxLDLs and CRPs	0.20	0.19

oxLDLs – Oxidized LDLs; TC – Total Cholesterol; CRPs – C-Reactive Proteins.

^aSpearman correlation test.

ANEXO IV

Artigo de Revisão



Ilmo(a) Sr.(a)
Prof(a), Dr(a) ALAN CARLOS NERY DOS SANTOS
Referente ao código de fluxo: 514
Classificação: Artigo de revisão

Tenho prazer de informar que o manuscrito PROTEÍNA C REATIVA EM USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVO ORAL: FATORES RELACIONADOS E RISCO CARDIOVASCULAR foi aprovado pelo Conselho Editorial da International Journal of Cardiovascular Sciences e será publicado em breve.

Vale lembrar que algumas modificações poderão ser solicitadas até a publicação do artigo.

Comentário enviado: Aprovado.

Parabenizo os autores.

O manuscrito será publicado em tempo hábil.

atenciosamente,

Editor.

Obrigado por submeter seu trabalho à International Journal of Cardiovascular Sciences.

Atenciosamente,

Dr. Cláudio Tinoco Mesquita
Editor Chefe

ARTIGO DE REVISÃO

PROTEÍNA C REATIVA EM USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVO ORAL: FATORES RELACIONADOS E RISCO CARDIOVASCULAR

C-REACTIVE PROTEIN IN ORAL CONTRACEPTIVE USERS: RELATED FACTORS AND CARDIOVASCULAR RISK

RESUMO

Estudos demonstram associação entre o uso de contraceptivo oral combinado (COC) e a elevação da Proteína C Reativa (PCR). Entretanto, é pouco claro quais são os mecanismos envolvidos nessa associação. Assim, nosso objetivo foi revisar evidências sobre a associação entre os valores da PCR e o uso de COC, bem como, descrever os mecanismos fisiológicos que explicam essa associação. Para tal, desenhamos uma revisão sistemática, na qual foram considerados elegíveis os estudos indexados nas bases de dados EBSCOhost, LILACS/BIREME, PUBMED/MEDLINE e SCIELO, que avaliaram a PCR de usuárias de COC, publicados entre 2004 e 2015. A busca eletrônica consistiu no cruzamento dos descritores: Contraceptives, Oral, Combined; C-Reactive Protein e Inflammation. A qual resultou em 136 estudos, dos quais, doze foram elegíveis. Esses demonstraram elevação da PCR, mesmo após dez dias de uso de COC. Os valores da PCR mais frequentes foram entre 1-3mg/L e >3mg/L e em alguns estudos os valores foram superiores a 10mg/L. Por outro lado, os principais mecanismos envolvidos na elevação dessa proteína foram os hormonais, principalmente estrogênicos e androgênicos, sendo documentadas modificações na função e níveis dos receptores β do estrogênio e níveis elevados de cortisol. Outros achados também indicam elevação do TNF- α , hipometilação no DNA de macrófagos e alterações na produção hepática da PCR. Por fim, o COC representa assim como a obesidade, 20% da variação da PCR em mulheres em idade reprodutiva.

Palavras-chave: Anticoncepcionais; Inflamação; Doenças Cardiovasculares; Metabolismo.

INTRODUÇÃO

Estudos têm indicado associação direta entre o uso de contraceptivo oral combinado (COC) e aumento de parâmetros inflamatórios, especialmente da Proteína C Reativa (PCR) em mulheres saudáveis em idade reprodutiva¹⁻³. Também tem sido indicado que, cerca de uma em cada três mulheres usuárias de COC, apresentam valores da PCR superior a 3 mg/L. Assim, em linha com outros estudos^{1,4,5}, esse resultado pode indicar risco elevado para doenças cardiovasculares e metabólicas nessa população.

Esse pensamento é reforçado pelos estudos que mostram que os valores da PCR apresentam associação com a hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias, eventos coronarianos, acidente vascular cerebral isquêmico, mortalidade vascular e não-vascular^{1,6,7,8}. Outro dado interessante, é a associação entre a PCR e a resistência à insulina e com alguns marcadores de disfunção endotelial, independente das medidas antropométricas⁹.

Assim, em virtude da ausência de estudos de revisão, da relevância do tema e da lacuna a respeito da associação e dos mecanismos envolvidos na elevação da PCR em usuárias de COC, nosso estudo objetivou revisar pesquisas que investigaram a associação entre os valores da PCR e o uso de COC, bem como, descrever os mecanismos fisiológicos que explicam essa associação.

MÉTODOS

Estudo de revisão sistemática para identificar evidências sobre os efeitos do COC sobre os valores plasmáticos da PCR, bem como, os mecanismos envolvidos nessa elevação. Consideramos elegíveis estudos originais com delineamento observacional ou experimental, com grupo controle, publicados entre 2004 e 2015, que avaliaram mulheres em idade reprodutiva, >18 anos, saudáveis, usuárias de COC a pelo menos dez dias, sendo esse, o menor período reportado como capaz de induzir alteração na PCR na população¹⁰.

Não foram considerados elegíveis: artigos que se reportassem a outros tipos de contraceptivos a base de hormônios, estudos com animais, com mulheres na menopausa ou acometidas por enfermidades cardiovasculares ou metabólicas. Também foram excluídos os trabalhos que selecionaram apenas mulheres obesas,

tabagistas, etilistas, fisicamente ativas, ou, em algum tratamento medicamentosos ou em restrição alimentar.

As buscas nas bases de dados previamente selecionadas, foram realizadas por dois revisores independentes entre o período de setembro a dezembro de 2015, sendo que, a consulta a base de dados eletrônica PUBMED/MEDLINE se deu por meio do seguinte cruzamento de termos *Medical Subject Headings* (MeSH): “Contraceptives, Oral, Combined”; “C-Reactive Protein”; “Inflammation”, “Premenopause” and “Women”.

```
((("contraceptives, oral"[Pharmacological Action] OR "contraceptives, oral"[MeSH Terms] OR ("contraceptives"[All Fields] AND "oral"[All Fields]) OR "oral contraceptives"[All Fields] OR ("contraceptives"[All Fields] AND "oral"[All Fields]) OR "contraceptives, oral"[All Fields]) AND Combined[Title/Abstract]) AND C-Reactive Protein[Title/Abstract]) AND Inflammation[Title/Abstract]
```

Já para a base dados LILACS/BIREME utilizou-se como descritores cruzados, nos campos "palavras", "descritores de assuntos", "palavras do título", "título" e "resumo", as seguintes palavras-chave em inglês: "Contraceptive Agents" AND “C-Reactive Protein” AND “Inflammation” AND “Premenopause”.

O processo de triagem dos artigos foi realizado por dois revisores e se deu inicialmente por meio da leitura dos títulos e resumos. Em seguida, foram excluídos os estudos em duplicidade e realizada nova checagem quanto aos critérios de elegibilidade. Na etapa seguinte, os artigos que não atenderam aos critérios de seleção para o presente estudo também foram excluídos. Assim, os artigos que contemplaram os critérios estabelecidos foram recuperados para leitura do texto completo, nova avaliação quanto aos critérios de elegibilidade e extração dos desfechos de interesse da presente revisão.

Seguindo os critérios metodológicos pré-estabelecidos foram identificadas 136 referências, das quais apenas uma foi publicada em língua portuguesa. 64 referências foram excluídas por duplicidade entres as bases de dados selecionadas. Outras 61 referências foram excluídas pela por não se enquadrarem nos critérios estabelecidos ou por não possuírem relação com o tema, sendo que, os principais motivos de exclusão foram: estudos envolvendo grupos de risco cardiovascular e metabólico, experimentação com animais e mulheres na menopausa. Portanto, foram

selecionados 11 estudos^{1,2,3,8,10,11,12,13,14,21,22}. A **Figura 1** resume o processo de triagem e seleção dos estudos que compõe o escopo desta revisão sistemática.

DESENVOLVIMENTO

Muito embora não exista uma relação de causa e efeito perfeita em virtude da metodologia observacional empregada na maioria dos estudos^{1,2,3,8,13,14,18,19}, tem sido sugerida elevação da PCR em mulheres que utilizam COC.

Estudo finlandês composto por 2.283 participantes com idade entre 24 e 39 anos, identificou que 9 a 10% das mulheres da pesquisa tinham PCR acima de 3 mg/L. Nesse estudo os autores destacaram que a prevalência foi maior entre as mulheres que utilizavam COC, onde 35% dessas apresentavam PCR >3mg/L. Segundo os autores, em adultos jovens a obesidade é responsável por 20% de aumento da PCR, sendo que, uso do COC é também responsável por 20%¹. Já no estudo de Dreon et al.¹⁸, os autores identificaram que o COC foi responsável por 32% na elevação da PCR.

No mesmo sentido, outro interessante estudo com 822 participantes na faixa etária dos 20 anos, identificou a obesidade como a principal variável relacionada a elevação da PCR em indivíduos de ambos os sexos. Entretanto, novamente o uso de COC foi o principal responsável pela elevação da PCR nas mulheres⁸. Corroborando com esses dados, Buchbinder et al.¹⁹, em uma amostra de 850 doadores de sangue também identificaram a obesidade e o COC como variáveis independentes para elevação da PCR em mulheres jovens. Nesse estudo, os pesquisadores evidenciaram que as mulheres eutróficas em uso de COC apresentavam a PCR tão elevada quanto as mulheres obesas que não utilizavam COC e aumento 3 vezes maior que mulheres eutróficas que não utilizavam COC. Também foi demonstrado que o uso de COC em mulheres obesas resultou em um aumento de 6 vezes na PCR, em comparação com as não-obesas.

Mais especificamente alguns estudos^{3,13} com mulheres jovens, sem outros possíveis fatores que poderiam induzir aumento da PCR, observaram valores da PCR duas vezes maior no grupo COC. Outro ponto interessante, foi a relação moderada positiva entre a PCR e os triglicédeos, o que pode sugerir um perfil inflamatório com risco aumentado de doenças cardiovasculares. Buchbinder et al.¹⁹ identificaram que variáveis lipídicas como os triglicédeos, colesterol total, lipoproteína de baixa e de

alta densidade tiveram efeitos menores que os COC na elevação da PCR, sugerindo alto impacto dos COC na elevação dessa proteína. Os autores também sugeriram que a elevação da PCR induzida pelo uso do COC se devia aos hormônios sintéticos presentes nos COC, o etinilestradiol e as progestinas.

Ainda que não esteja clara a relação entre o uso atual de COC e a elevação dos valores plasmáticos da PCR em mulheres em idade reprodutiva, o que se sabe, é que esse evento acontece tanto com contraceptivos de segunda como de terceira geração¹¹. Outro ponto que nos chama a atenção é que já em curto período de uso, 10 dias, pode se observar essa elevação, como mostra o estudo de Campesi et al. Ampliando está informação, Divani et al.¹² relatam ainda que quanto maior o tempo de uso dos COC, maior a chance de elevação da PCR.

Interessante notar que todos os estudos selecionados para esta revisão mostraram valores mais elevados da PCR em mulheres em uso de COC quando comparadas a mulheres que não utilizam este grupo de medicamentos^{1,2,3,8,10,11,12,13,14,18,19}. Destaca-se também que a associação entre o uso de COC e a elevação da PCR se mantém significativa mesmo após ajuste para fatores de confusão como a obesidade⁷. Apesar de ser sugerido que valores <1, 1-3 e >3 mg/L, são indicadores respectivamente de baixo, moderado e de alto risco para futuros eventos cardiovasculares^{15,16}, Zieske et al.¹⁷ apontam que pequenas elevações dessa proteína estão associadas com aumento do risco de aterotrombose mesmo após 20 anos da coleta das amostras sanguíneas.

Até o presente, ainda existem lacunas sobre os mecanismos que promovem a elevação da PCR em mulheres que utilizam COC, como nos próprios artigos que compuseram essa revisão. No entanto, alguns mecanismos são sugeridos. Um deles indica que a elevação da PCR seja induzida pela ação direta dos hormônios do COC na síntese hepática dessa proteína¹¹.

Outro fator seria a elevação de substâncias pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo. Embora van Rooijen et al.¹¹ apontem que a elevação da PCR não tem associação com o aumento da interleucina 6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α), Divani et al.¹² observaram associação positiva entre os valores da PCR e os do TNF- α e a da IL-6 com o uso de COC. Esse achado é reforçado no estudo de Campesi et al.¹⁰ que apontou que usuárias de COC apresentavam valores mais elevados de cortisol, resultado que induz maior liberação do TNF- α . Ainda segundo

Divani et al.¹², o uso de COC promove alterações hematológicas, endoteliais e hipometilação no DNA total dos monócitos. Essa hipometilação do DNA, é um importante mecanismo de elevação da PCR, induzida por alterações funcionais nos macrófagos, a qual pode ocorrer independente da ação dos hormônios androgênicos¹⁰. Segundo Yudkin et al.⁹, modificações na relação e atividade dos receptores α e β do estrogênio, representada por menor expressão dos receptores β nos macrófagos derivados de monócitos, provocam aumento significativo na liberação do TNF- α , o que pode estar associado a maiores valores plasmáticos da PCR.

Outro forte mecanismo sugerido, para explicar a elevação da PCR em mulheres que utilizam COC, seja, o da diminuição da sensibilidade insulínica provocado pelas progestinas contidas nesse grupo de medicamentos. Segundo o estudo de Beck²⁰ de 1977, as progestinas, hormônios sintéticos que simulam os efeitos da progesterona, promovem diminuição da sensibilidade à insulina. A diminuição da sensibilidade a insulina desencadeia alterações metabólicas que vão desde o aumento dos triglicerídeos de jejum até o aumento da inflamação vascular²¹.

A diminuição da sensibilidade insulínica provoca diminuição da produção e atividade da lipase lipoproteica, no tecido adiposo e muscular esquelético, já que, a lipase lipoproteica é estimulada diretamente pela ligação da insulina aos seus receptores de membrana nesses tecidos. A lipase lipoproteica é responsável pela clivagem dos triglicerídeos contidos nas moléculas de quilomícrons e VLDL. Dessa forma ocorre conseqüente diminuição na captação e utilização dos triglicerídeos pelo tecido muscular e adiposo que representam 50% da massa corporal. Isso eleva a quantidade dos triglicerídeos plasmáticos, da VLDL e LDL circulantes²². Como mostrado por O'Meara et al.²², triglicerídeos de jejum mais elevados induzem o aumento da lipemia pós-prandial. Tal mecanismo explica o porquê mulheres em uso de COC apresentam valores de triglicerídeos e LDL de jejum e lipemia pós-prandial mais elevados que mulheres que não utilizam COC, mesmo na ausência de outros fatores que sabidamente poderiam alterar essas variáveis²³. Tanto a elevação dos triglicerídeos e lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade e também da lipemia pós-prandial provocam lesão endotelial. O resultado final é maior atividade inflamatória observada pelo aumento da PCR. Dados recentes mostram que o endotélio pode produzir a PCR em decorrência de sua disfunção, criando assim uma

retroalimentação positiva entre os mecanismos que levam a lesão endotelial e a elevação da PCR²⁴.

Essa hipótese é reforçada pelos achados do estudo de Josse et al.²⁵ que não observaram diferenças no Índice de Homa, um dos métodos utilizados para avaliar a resistência insulínica, mas, verificaram diferença significativa no Homa Beta, que avalia a atividade das células beta pancreáticas, entre usuárias e não usuárias de COC. Ou seja, mesmo não apresentando glicemia elevada ou Índice de Homa maior as mulheres em uso de COC produzem mais insulina para manter em homeostase a glicemia, devido a menor sensibilidade insulínica. Esse mecanismo também foi evidenciado por um estudo recente desenvolvido pelo nosso grupo. Nesse estudo, verificamos que mulheres em uso de COC sem nenhum outro fator conhecido que induz a diminuição da sensibilidade insulínica, apresentaram no Índice de Homa, Homa Beta e insulina mais elevados que mulheres que não utilizavam COC²⁶.

No entanto, apesar do destaque aos mecanismos hormonais e metabólicos na indução da elevação da PCR, não podemos ignorar que também o estresse oxidativo é outro mecanismo que pode elevar a PCR em mulheres que utilizam COC, como apontado por Dreon et al.¹⁸. Finalmente, acreditamos que não exista apenas um mecanismo que resulte na elevação da PCR, mas sim, um conjunto de alterações metabólicas e hormonais, como as anteriormente mencionadas. A Figura 2 apresenta os vários mecanismos envolvidos na elevação da PCR pelo COC. Cabe ainda ressaltar que nosso estudo é a primeira revisão sobre o tema.

Em suma, apesar da literatura a respeito do assunto ser escassa, os artigos aqui apresentados e discutidos indicam que o uso de COC provoca elevação da PCR em mulheres em uso de COC, bem como, apoiam a hipótese de que essa população esteja mais sujeita a desenvolver distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares^{3-5,13}. Entretanto, muito embora os resultados apontem para nessa direção, ainda são necessários estudos clínicos controlados de corte longitudinal para que se possa estabelecer relação de causa-efeito e confirmar essas hipóteses.

Por fim, esta revisão apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, a busca limitada por algumas das principais bases de dados não permite afastar possíveis vieses de publicação. Em segundo lugar, a não avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos, fato que não nos permite afastar potenciais vieses da nossa amostra de estudos. Por outro lado, nosso estudo possui como pontos fortes a

originalidade, tendo em vista que de acordo com as nossas buscas, está é a primeira revisão sobre o tema. Também vale ressaltar que nossos resultados podem contribuir para o melhor entendimento da elevação da PCR em mulheres que utilizam COC, uma vez que, mesmo se tratando de um grupo de medicamentos, todas as referências apresentam resultados similares.

CONCLUSÃO

Com base nos estudos analisados, mulheres em idade reprodutiva que utilizam COC, tanto a curto quanto a longo prazo, apresentam valores mais elevados da PCR o que sugere maior risco de eventos cardiovasculares nessa população. Segundo os estudos vários são os fatores que induzem a esse aumento, sendo que, as alterações na síntese hepática da PCR, a diminuição da sensibilidade à insulina e a hipometilação no DNA de macrófagos, possivelmente sejam os principais mecanismos promotores dessa elevação.

CONFLITO DE INTERESSE

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

VINCULAÇÃO ACADÊMICA

Este estudo é parte da dissertação de mestrado de Alan Carlos Nery dos Santos pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP, Salvador, BA – Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Raitakari M, Mansikkaniemi K, Marniemi J, Viikari JS, Raitakari OT. Distribution and determinants of serum high-sensitive C-reactive protein in a population of young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J Intern Med.* 2005;258(5):428-34.

2. Sørensen CJ, Pedersen OB, Petersen MS, Sørensen E, Kotzé S, Thørner LW, et al. Combined Oral Contraception and Obesity Are Strong Predictors of Low-Grade Inflammation in Healthy Individuals: Results from the Danish Blood Donor Study (DBDS). *PLoS ONE*. 2014;9(2):e88196. doi:10.1371/journal.pone.0088196.
3. Petto J, Pereira LS, Santos ACN, Giesta BA, Melo TA, Ladeia AMT. Inflamação Subclínica em Mulheres que Utilizam Contraceptivo Oral. *Rev Bras Cardiol*. 2013;26(6):465-71.
4. Acute myocardial infarction and combined oral contraceptives: results of an international multicentre case-control study. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet*. 1997;349(9060):1202-9.
5. Koenig W1, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, et al. C-Reactive Protein, a Sensitive Marker of Inflammation, Predicts Future Risk of Coronary Heart Disease in Initially Healthy Middle-Aged Men. *Circulation*. 1999;99(2):237-42.
6. Baillargeon JP, McClish DK, Essah PA, Nestler JE. Association between the current use of low-dose oral contraceptives and cardiovascular arterial disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):3863-70.
7. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9709):132-40. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61717-7.
8. Williams MJ, Williams SM, Milne BJ, Hancox RJ, Poulton R. Association between C-reactive protein, metabolic cardiovascular risk factors, obesity and oral contraceptive use in young adults. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(8):998-1003.
9. Yudkin JS1, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):972-8.
10. Campesi I, Sanna M, Zinellu A, Carru C, Rubattu L, Bulzomi P, et al. Oral contraceptives modify DNA methylation and monocyte-derived macrophage function. *Biol Sex Differ*. 2012 Jan 27;3:4. doi: 10.1186/2042-6410-3-4.
11. van Rooijen M, Hansson LO, Frostegård J, Silveira A, Hamsten A, Bremme K. Treatment with combined oral contraceptives induces a rise in serum C-reactive

protein in the absence of a general inflammatory response. *J Thromb Haemost.* 2006;4(1):77-82.

12. Divani AA, Luo X, Datta YH, Flaherty JD, Panoskaltzis-Mortari A. Effect of Oral and Vaginal Hormonal Contraceptives on Inflammatory Blood Biomarkers. *Mediators of Inflammation.* 2015;1-8. doi:10.1155/2015/379501.

13. Petto J, Silveira DW, Santos ACN, Seixas CR, Santo DGCE, Oliveira FTO, et al. Lipemia pós-prandial e inflamação subclínica em mulheres ativas que utilizam contraceptivo oral. *Int J Cardiovasc Sci.*2015;28(3):215-223. doi.org/10.5935/2359-4802.20150031.

14. Cauci S, Di Santolo M, Culhane JF, Stel G, Gonano F, Guaschino S. Effects of third-generation oral contraceptives on high-sensitivity C-reactive protein and homocysteine in young women. *Obstet Gynecol.* 2008;111(4):857-64. doi: 10.1097/AOG.0b013e31816a2476.

15. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003;107(3):363-9.

16. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Tracy RP. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol.* 2002;55(5):445-51.

17. Zieske AW, Tracy RP, McMahan CA, Herderick EE, Homma S, Malcom GT, et al. Elevated serum C-reactive protein levels and advanced atherosclerosis in youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1237-43.

18. Dreon DM, Slavin JL, Phinney SD. Oral contraceptive use and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Life Sci.* 2003;73(10):1245-52.

19. Buchbinder S, Kratzsch J, Fiedler GM, Yar V, Brügel M, Leichtle A, et al. Body weight and oral contraceptives are the most important modulators of serum CRP levels. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(2):140-4.

20. Beck P. Effect of progestins on glucose and lipid metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 1977;1(286):434-45.

21. Martins WP, Soares GM, Vieira CS, Reis RM, Sá MFS, Ferriani RA. Resistência à insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos modifica fatores de risco cardiovascular. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009; 31(3):111-6

22. O'Meara NM, Lweis GF, Cabana VG, Iverius PH, Getz GS, Polonsky KS. Role of basal triglyceride and high-density lipoprotein in determination of postprandial lipid and lipoprotein responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(2):465-71.

23. Petto J, Vasques LMR, Pinheiro RL, Giesta BA, Santos ACN, Neto MG, Ladeia AMT. Comparison of Postprandial Lipemia between Women who are on Oral Contraceptive Methods and Those who are not. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(3):245-50.
24. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001; 158: 1039–51.
25. Josse AR, Garcia-Bailo B, Fischer K, El-Sohemy A. Novel Effects of Hormonal Contraceptive Use on the Plasma Proteome. *PLoS ONE.* 2012;7(9):e45162.
26. Petto J, Seixas CR, Feitosa LC, Bacelar JF, Cerqueira DGLES, Barbosa PRP. Índice de Homa em mulheres que utilizam e não utilizam contraceptivo oral. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104(5Supl.3):1-39.

Figura 1. Fluxograma de seleção dos artigos.

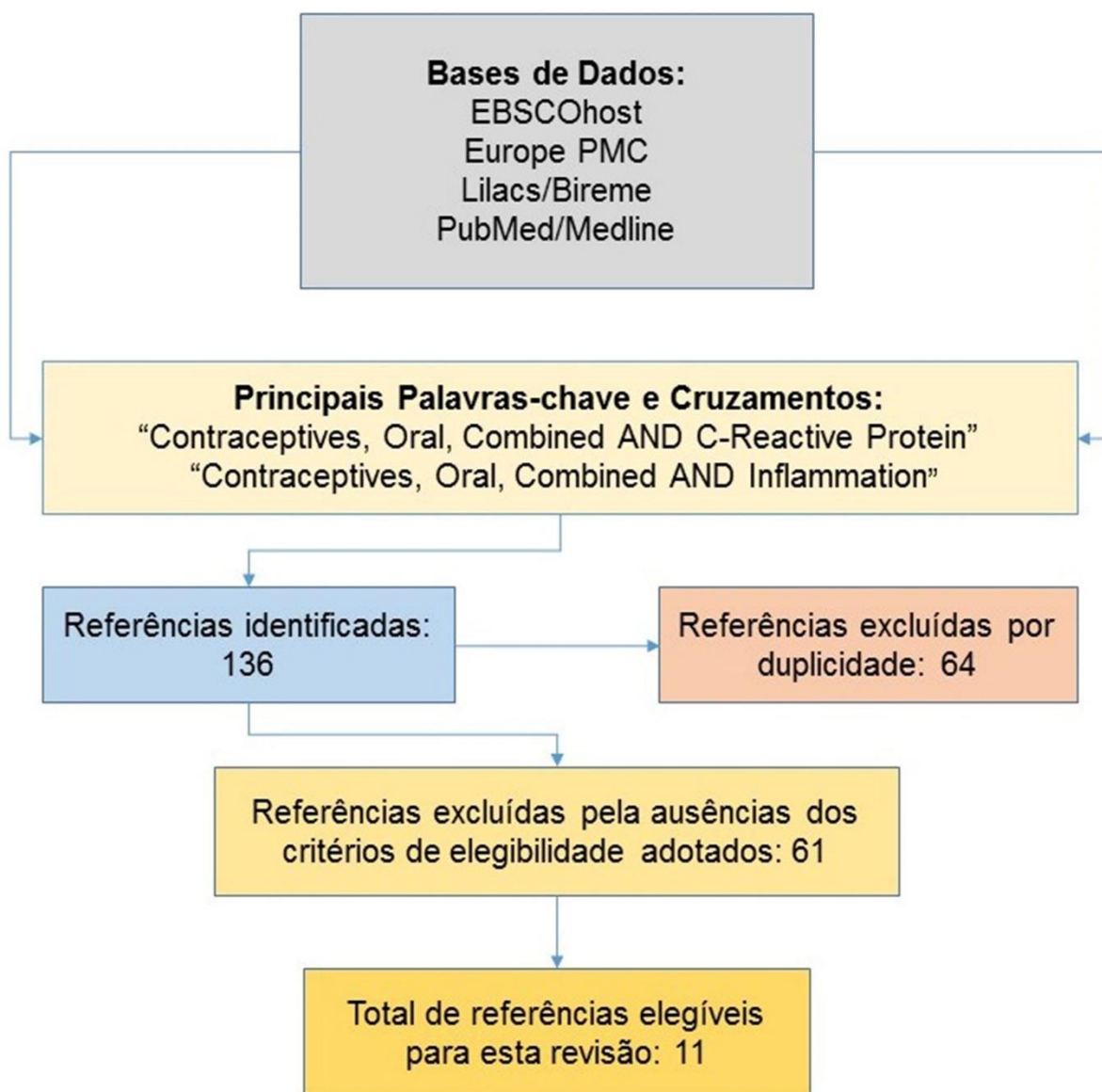


Figura 2. Fisiopatologia da elevação da PCR em usuárias de COC.

