

**Associação entre o uso de contraceptivo oral e a geração de trombina:
evidência do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil)**

Autora principal: Thaís Resende Batista

Autores colaboradores: Ana Paula Ferreira Silva, Chams
Bicalho Maluf, Antônio Luiz Pinho Ribeiro, Sandhi Maria
Barreto, Maria das Graças Carvalho, Roberta Carvalho de
Figueiredo, Danyelle Romana Alves Rios.

Categoria: Farmacêutico

Dados de correspondência da autora principal:

- E-mail: thais123batista@gmail.com



Título: Associação entre o uso de contraceptivo oral e a geração de trombina: evidência do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil).

Resumo: *Objetivo:* Investigar a associação entre o uso (atual e passado) de contraceptivos orais (COs) e a geração de trombina. *Metodologia:* Estudo transversal, realizado com mulheres, em idade fértil, do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil) do Estado de Minas Gerais (N=641). As participantes foram categorizadas quanto ao uso de COs em não usuárias, ex-usuárias e usuárias atuais. Utilizou-se a técnica de geração de trombina (TGT) para avaliação da coagulação sanguínea das participantes. Os parâmetros avaliados foram: *lag time*, *time to peak*, *peak* e potencial de trombina endógena (ETP). A resistência adquirida à proteína C ativada (PCa) foi determinada através da relação normalizada de sensibilidade à proteína C ativada (nAPCsr). O p-valor de 0,05 foi considerado significativo. *Resultados:* Observamos um valor menor de *lag time* e *time to peak* e um valor maior de *peak*, ETP e nAPCsr nas usuárias atuais em relação as não usuárias e ex-usuárias de COs. Esses achados ocorreram nas condições da TGT que avaliam as vias intrínseca e extrínseca da coagulação. Não houve diferença em nenhum dos parâmetros da TGT entre ex-usuárias e não usuárias de COs. *Conclusão:* O uso atual de COs mostrou-se associado a uma maior geração de trombina e nAPCsr. Tais resultados sugerem o potencial da técnica em refletir estados de hipercoagulabilidade, tendo em vista que os testes de coagulação sanguínea disponíveis na clínica avaliam a coagulação apenas de forma superficial. Outros estudos já demonstraram que a interrupção do uso de COs parece anular o efeito protrombótico e nossos resultados demonstraram que ex-usuárias de COs apresentaram geração de trombina e nAPCsr semelhantes a não usuárias. Diante disso, é possível perceber o potencial da TGT em refletir estados de hipercoagulabilidade, o que pode contribuir para o rastreamento precoce de doenças cardiovasculares e trombofilias hereditárias ou adquiridas em mulheres que desejem usar COs.

Palavras chaves: contraceptivos orais, geração de trombina, proteína C ativada, doenças tromboembólicas.

1. Introdução

Aproximadamente 100 milhões de mulheres em todo o mundo utilizam contraceptivos orais (COs) [11]. Estudos têm mostrado aumento do risco de desenvolvimento de doenças tromboembólicas (DTE) em mulheres que utilizam COs em relação àquelas que não utilizam [11,13]. O uso de COs causa um estado de hipercoagulabilidade que parece ser devido ao aumento da produção de fatores da coagulação (fibrinogênio, fatores VII, VIII, IX, X, XII e XIII), redução dos anticoagulantes naturais (proteína S e antitrombina) e desenvolvimento de resistência à proteína C ativada (PCa) [15, 19].

O desenvolvimento de DTE em usuárias de COs é um evento raro, entretanto, causa graves complicações de curto e longo prazo e desfechos clínicos graves e potencialmente fatais [9]. Por essa razão o rastreamento de mulheres que possuam trombofilias hereditárias ou adquiridas antes da indicação do uso de COs deveria ser indicado. No entanto, os testes de coagulação sanguínea disponíveis na clínica (tempo de protrombina - TP, tempo de tromboplastina parcial ativada - TTPa e dímero D) avaliam a coagulação apenas de forma superficial e não são capazes de identificar estados de hipercoagulabilidade [10]. Nesse sentido, a técnica de geração de trombina (TGT) tem emergido como uma possibilidade de rastreio e identificação de trombofilias em mulheres usuárias ou candidatas ao uso de COs.

A TGT vem sendo desenvolvida e aprimorada há décadas, e tem como objetivo avaliar de forma mais ampla o processo de coagulação [12]. É uma técnica capaz de avaliar a hemostasia de forma global, abrangendo as etapas de iniciação, amplificação e propagação da coagulação. Dessa forma, consegue refletir o risco de desenvolvimento de eventos hemorrágicos ou trombóticos por meio da avaliação conjunta de todos os componentes

e/ou condições do processo hemostático, incluindo os fatores de coagulação, os anticoagulantes naturais, a fibrinólise e a resistência à PCa [3].

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo investigar a associação entre o uso (atual e passado) de COs e a geração de trombina, em mulheres em idade fértil, do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil) do Estado de Minas Gerais.

2. Materiais e métodos:

2.1 Delineamento

Trata-se de um estudo transversal que utilizou dados da linha de base (2008-2010) do ELSA-Brasil, que é composta por 15.105 participantes com idade entre 35 e 74 anos. O ELSA-Brasil é uma coorte prospectiva que acompanha servidores públicos efetivos, ativos ou aposentados, de instituições públicas de ensino superior e/ou pesquisa localizadas em seis capitais das regiões Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil. Maiores informações sobre o ELSA-Brasil podem ser obtidas em outras publicações [1].

2.2 População de estudo

Do total de 671 mulheres em idade fértil participantes do ELSA-Brasil, do Estado de Minas Gerais, foram excluídas 30 (4,5%) que não souberam informar sobre uso de COs ou não possuíam plasma armazenado disponível para a realização da TGT (Figura 1). Foram consideradas em idade fértil aquelas mulheres que ainda menstruavam.

Participantes com história pregressa de trombose ou embolia [N=14 (2,2%)], presença de doença hepática [N=46 (7,2%)] ou uso de medicamentos antiplaquetários e/ou anticoagulantes orais [N=5 (0,8%)], geralmente são excluídas de estudos que investigam a associação entre uso de COs e marcadores hemostáticos, entretanto, após análise com e sem essas participantes, não observamos diferença nos resultados, e dessa forma optamos por mantê-las neste estudo.

Além disso, a TGT foi avaliada em três condições diferentes. Na condição com baixa concentração de fator tissular (FT) (*Low FT*), na condição com alta concentração de FT (*High FT*) e na condição com alta concentração de FT na presença de PCa (*High FT + PCa*). Por questões inerentes a TGT, houve perda de informação nas três condições e o número de participantes analisados em cada condição diferiu, conforme pode ser observado na Figura 1.

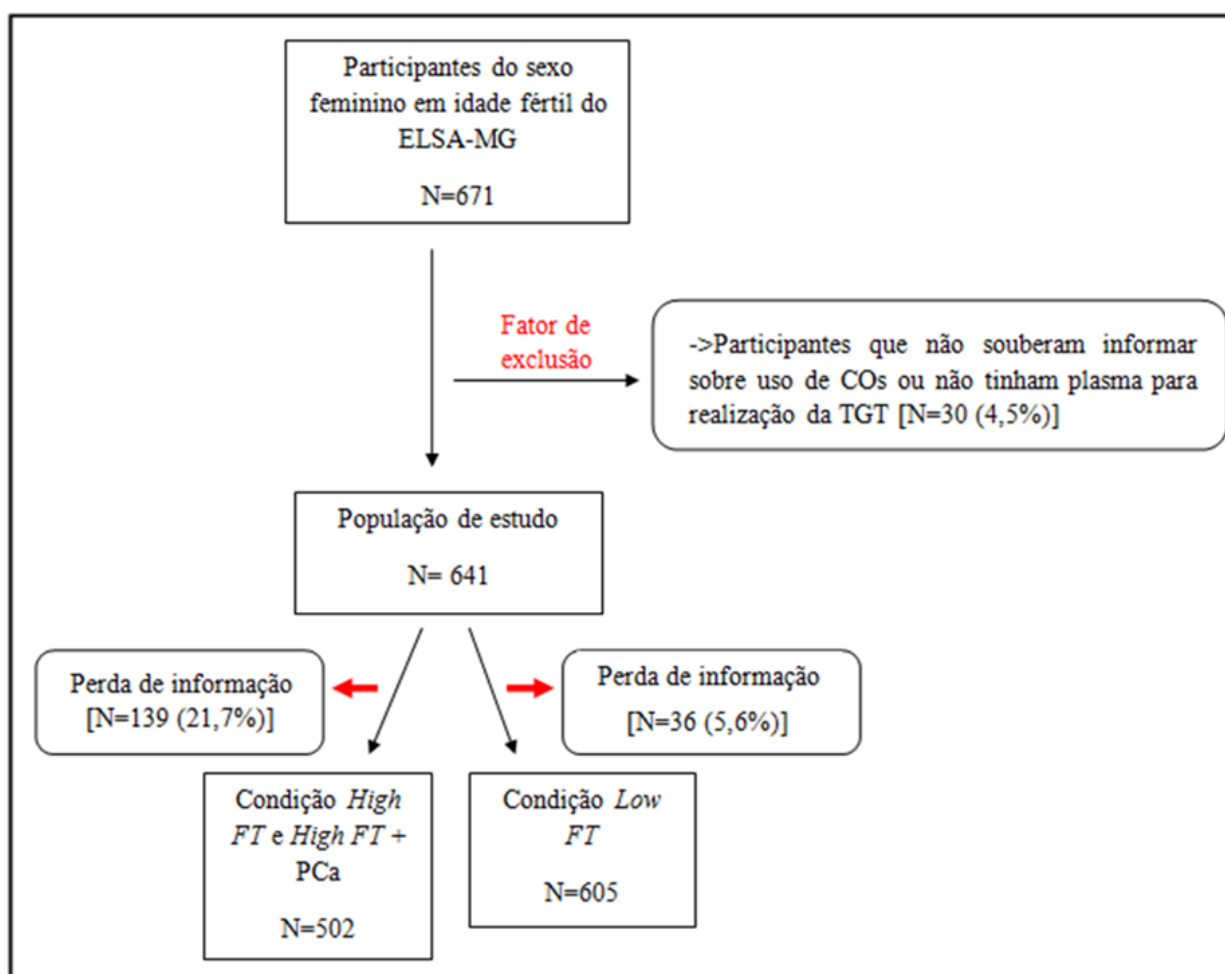


Figura 1: Participantes do estudo.

2.3 Coleta de dados

A coleta de dados da linha de base do ELSA-Brasil foi realizada em duas etapas. A primeira incluiu a assinatura do termo de consentimento livre esclarecido e a realização de uma primeira entrevista. A segunda incluiu entrevistas, exames clínicos, laboratoriais e

medidas antropométricas com foco em fatores de risco cardiovasculares. Todas as medidas e avaliações foram realizadas por profissionais treinados e certificados conforme protocolos pré-estabelecidos [4].

Além disso, as participantes do sexo feminino responderam a um questionário específico sobre a saúde da mulher, o qual tinha dentre outros objetivos coletar informações referentes ao uso de métodos contraceptivos.

2.4 Geração de trombina

A coleta das amostras de sangue venoso foi realizada pela manhã após 12-14 h de jejum, seguindo os procedimentos do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) [5]. A punção venosa foi realizada em tubos a vácuo de polietileno contendo citrato de sódio. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração (4°C) a 3.000 rpm por 15 minutos até uma hora após a coleta do sangue. O sobrenadante do plasma, correspondente ao plasma pobre em plaquetas (PPP), foi separado e armazenado em ultrafreezer a -80°C na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Posteriormente as amostras foram transferidas para a Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), onde foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até que a TGT fosse realizada.

Para a realização da TGT foi preparado um *pool* de plasma controle para calcular a Relação de Sensibilidade à PCa normalizada (nAPCsr), bem como para utilizar como controle de qualidade interno. Esse *pool* foi obtido a partir de 100 amostras de participantes do sexo feminino de Minas Gerais do ELSA-Brasil que atendiam aos seguintes critérios: proteína C reativa (PCR) \leq 3mg/dL (para excluir doenças agudas), sem uso de hormônios e medicamentos antitrombóticos. A amostra do *pool* controle foi adicionada em duplicata em todas as placas da TGT.

A TGT foi feita utilizando placas de 96 poços, onde foram adicionados em cada poço 80 μL de plasma pobre em plaquetas (PPP) da amostra a ser testada ou do *pool* de amostras controle e 5 μL do tampão HNBSA nos poços em que não foi testada a sensibilidade à PCa. Em paralelo, para cada amostra, foi adicionado um poço para o calibrador, constituído de 80 μL de PPP, 5 μL de HNBSA e 20 μL do reagente *Thrombin Calibrator* (STAGO®). Uma vez preenchida a placa com as amostras de plasma a serem testadas e seus respectivos calibradores, a placa foi colocada no fluorímetro (*Fluoroskan Ascent, Thermo Laboratories*®) para incubação a 37°C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados, somente nos poços com as amostras-teste de PPP e do *pool* de amostras-controle, 20 μL do FT em alta e baixa concentração: *PPP Reagent High* (STAGO®) ou o *PPP-Reagent Low* (STAGO)®, respectivamente. Em seguida, nos poços em que foram adicionados alta concentração de FT destinados a avaliar a sensibilidade a PCa, foram adicionados também 5 μL de PCa. Posteriormente, 20 μL do substrato fluorescente (*Fluca-Kit – STAGO*®) foram dispensados em todos os poços pelo dispenser do fluorímetro perfazendo um total de 125 μL em cada poço. Imediatamente, foi realizada a leitura da placa por 60 minutos. O *software Thrombinoscope*® foi utilizado para construção da curva de tempo (min) *versus* concentração de trombina (nM) e para o cálculo dos parâmetros de geração de trombina.

Os quatro parâmetros da TGT são:

- Tempo de latência (*lag time*): que corresponde ao tempo para se iniciar a formação de trombina;
- Pico de geração de trombina (*peak*): que corresponde à concentração máxima de trombina formada;
- Tempo para se atingir o pico de geração de trombina (*time to peak*);

- Potencial de trombina endógena (ETP): que corresponde à área sobre a curva da TGT, ou seja, toda trombina formada durante os 60 minutos de avaliação, representando o equilíbrio entre as forças pró e anticoagulantes.

Em nosso estudo a TGT foi realizada em três condições:

- *Low TF*: utilizou como desencadeador da reação baixa concentração de fator tecidual (FT);
- *High TF*: utilizou como desencadeador da reação alta concentração de FT;
- *High TF + PCa*: utilizou como desencadeador da reação alta concentração de FT e foi acrescentada à PCa.

2.5 Relação normalizada de sensibilidade à PCa (nAPCsr)

Foi utilizada a concentração de 15nM de PCa (necessária para inibir 90% da geração de trombina) na TGT para determinação do ETP com e sem PCa da amostra testada e do *pool* controle de amostras.

A nAPCsr foi então calculada através da seguinte fórmula:

$$nAPCsr = \frac{(ETP + PCa / ETP - PCa) \text{ amostra}}{(ETP + PCa / ETP - PCa) \text{ pool controle}}$$

Onde o ETP + PCa, corresponde ao valor de ETP com a adição da PCa e ETP – PCa, o valor de ETP sem a adição da PCa.

2.6 Uso de contraceptivo oral

Todas as participantes foram questionadas sobre o uso atual e passado de contraceptivos orais. Aquelas que responderam que usavam COs atualmente foram questionadas sobre o nome dos COs. Os nomes comerciais foram relacionados aos fármacos por meio de

pareamento com produtos registrados na ANVISA (CMED) e com o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF).

- As participantes que usavam COs no momento da entrevista foram classificadas como: usuárias atuais;
- Aquelas que no passado usaram COs, mas no momento da entrevista não usavam mais, foram classificadas como: ex-usuárias;
- E aquelas que relataram nunca terem usado COs foram classificadas como: não usuárias.

2.7 Análise estatística

O software utilizado foi o *Stata* versão 14.0. A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada por meio de análise de histogramas. As variáveis contínuas com distribuição simétrica foram descritas por meio de média±desvio padrão. Para a comparação de médias das categorias de uso de COs, utilizou-se o teste ANOVA e o pós-teste de Bonferroni. As variáveis contínuas com distribuição assimétrica foram descritas por meio de mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3). Para a comparação entre as categorias de uso de COs, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram descritas por meio de proporções. Para comparação de proporções entre os diferentes grupos de uso de CO, utilizou-se o teste de Qui-quadrado. Foi investigada, por meio de regressão linear, a associação entre a geração de trombina e a nAPCsr e as características sociodemográficas (idade e escolaridade), as condições de saúde (diabetes, hipertensão arterial, DCV, obesidade e uso de hipolipemiantes e perfil lipídico) e os hábitos de vida relacionados à saúde (tabagismo, uso excessivo do álcool e atividade física no lazer), para identificação de potenciais fatores de confusão. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

2.8 Considerações éticas

O ELSA-Brasil foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições de ensino e pesquisa participantes e também pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 976/2006) do Ministério da Saúde. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da realização de entrevistas, exames e medidas.

3. Resultados

Do total das 641 participantes deste estudo, 151 (23,5%) nunca usaram COs, 437 (68,2%) usaram COs no passado e 53 (8,3%) usam atualmente. As características sociodemográficas, condições de saúde, hábitos de vida relacionados à saúde e história de ocorrência de eventos trombóticos e doença hepática dessas participantes estão apresentadas na tabela 1. Foram comparados os valores médios e as frequências dessas variáveis entre as categorias de uso de COs e não foi observada diferença significativa, com exceção da idade ($p < 0,0001$) e dos níveis séricos de colesterol LDL-LDLc ($p = 0,0011$) que foram significativamente menores e dos níveis séricos de colesterol HDL-HDLc ($p = 0,0003$) e triglicérides ($p = 0,0189$) que foram significativamente maiores nas usuárias atuais comparados as ex-usuárias e as não usuárias de COs.

Não foi encontrada associação da geração de trombina e a nAPCsr com as características sociodemográficas (idade e escolaridade), as condições de saúde (diabetes, hipertensão arterial, DCV, obesidade e dislipidemia) e os hábitos de vida relacionados à saúde (tabagismo, uso excessivo do álcool e atividade física no lazer) (resultados não apresentados).

Tabela 1: Características sociodemográficas, condições de saúde, hábitos de vida relacionados à saúde e história pregressa de evento trombotico e doença hepática das mulheres em idade fértil da linha de base do ELSA-Brasil (2008-2010), do estado de Minas Gerais de acordo com o uso de contraceptivos orais (COs) (N=641).

Características	Total (N=641)	Uso de CO			p-valor
		Não usuárias (N=151)	Ex-usuárias (N=437)	Usuárias atuais (N=53)	
Idade média (anos)^a	45,06±4,98	45,82±5,27	45,15±4,82	42,23±4,56	<0,0001 ^{§¶}
Escolaridade^b					-
Superior completo	401 (62,6%)	94 (62,3%)	271 (62,0%)	36 (67,9%)	
Médio completo	231 (36,0%)	55 (36,4%)	159 (36,4%)	17 (32,1%)	
Fundamental completo	9 (1,4%)	2 (1,3%)	7 (1,6%)	0	
Condições de saúde*^b					
Diabetes	49 (7,6%)	13 (8,6%)	32 (7,3%)	4 (7,5%)	0,876
Hipertensão Arterial	136 (21,2%)	28 (18,5%)	97 (22,2%)	11 (20,7%)	0,636
Doença Cardiovascular	5 (0,8%)	0	5 (1,1%)	0	-
Obesidade	108 (16,8%)	27 (17,9%)	73 (16,7%)	8 (15,1%)	0,550
Perfil Lipídico^a					
Colesterol LDL (mg/dL)	119,93±30,85	123,71±30,08	120,34±31,04	105,81±27,86	0,0011 ^{§¶}
Colesterol HDL (mg/dL)	59,48±13,57	57,19±13,51	59,51±12,99	65,89±16,43	0,0003 ^{§¶}
Triglicérides (mg/dL)	104,71±57,48	103,70±55,90	102,49±56,87	125,92±63,46	0,0189 ^{§¶}
Uso de hipolipemiante^b					-
Não	612 (95,5%)	143 (94,7%)	416 (95,1%)	53 (100,0%)	
Sim	29 (4,5%)	8 (5,3%)	21 (4,8%)	0	
Tabagismo^b					0,858
Não	592 (92,4%)	141 (93,4%)	402 (92,0%)	49 (92,4%)	
Sim	49 (7,6%)	10 (6,6%)	35 (8,0%)	4 (7,6%)	
Consumo excessivo de bebida alcóolica^b					-
Não	621 (96,8%)	144 (95,5%)	424 (97,1%)	53 (100,0%)	
Sim	20 (3,1%)	7 (4,5%)	13 (2,9%)	0	
Atividade física no lazer^b					0,779
Inatividade física	480 (75,3%)	115 (76,7%)	327 (75,4%)	38 (71,7%)	
Atividade física moderada	112 (17,6%)	26 (17,3%)	77 (17,7%)	9 (17,0%)	
Atividade física forte	45 (7,1%)	9 (6,0%)	30 (6,9%)	6 (11,3%)	
História pregressa de evento trombotico^b					-
Não	627 (97,8%)	146 (96,7%)	428 (97,9%)	53 (100,0%)	
Sim	14 (2,2%)	5 (3,3%)	9 (2,1%)	0	
História pregressa de doença hepática^b					0,291
Não	595 (92,8%)	140 (92,7%)	403 (92,2%)	52 (98,1%)	
Sim	46 (7,2%)	11 (7,3%)	34 (7,8%)	1 (1,9%)	

^aANOVA: valores expressos em média e desvio padrão. ^bQui-quadrado: valores expressos em proporções.

*Categoria de referência é a ausência de doença. [§]Diferença estatisticamente significativa entre as categorias: usuárias atuais e ex-usuárias de CO. [¶] Diferença estatisticamente significativa entre as categorias: usuárias atuais e não usuárias de CO.

Os parâmetros avaliados na condição *Low TF* podem ser observados na tabela 2. As usuárias atuais de COs apresentaram médias de *lag time* e *time-to-peak* menores (3.93min±1.61 e 7.00min±2.35) que as ex-usuárias de COs (5.04min±1.63 e 8.93min±2.53; p<0,0001) e as não usuárias (5.12min±1.71 e 8.97min±2.57; p<0,0001). Em relação aos valores médios de *peak* e ETP, observamos valores maiores nas usuárias atuais de COs (358.54nM±82.59 e 2272.32nM.min±421.03; p<0,0001) em relação às ex-usuárias (272.78nM±80.82 e 1945.15nM.min±359.15; p<0,0001) e as não usuárias de COs (275.79nM±87.48 e 1961.1nM.min±355.42; p<0,0001). Não houve diferença significativa dos parâmetros avaliados entre as ex-usuárias e as não usuárias de COs.

Tabela 2: Comparação dos parâmetros da geração de trombina, na condição *Low FT*, segundo as categorias de uso de contraceptivo oral (N=605).

Parâmetros	Uso de CO			p-valor
	Não usuárias (N=139)	Ex-usuárias (N=415)	Usuárias atuais (N=51)	
Lagtime (min)	5.12±1.71	5.04±1.63	3.93±1.61	<0.0001 ^{§¶}
Time to Peak (min)	8.97±2.57	8.93±2.53	7.00±2.35	<0.0001 ^{§¶}
Peak (nM)	275.79± 87.48	272.78±80.82	358.54±82.59	<0.0001 ^{§¶}
ETP (nM.min)	1961.15±355.42	1945.15±359.15	2272.32±421.03	<0.0001 ^{§¶}

ANOVA: valores expressos em média e desvio padrão. [§]Diferença estatisticamente significativa entre as categorias: usuárias atuais e ex-usuárias. [¶]Diferença estatisticamente significativa entre as categorias: usuárias atuais e não usuárias.

Os parâmetros avaliados na condição *High TF* estão demonstrados na tabela 3. As usuárias atuais de COs apresentaram valores médios de *lag time* e *time to peak* menores [1.69min (1.67-2.00) e 3.82min±0.44] que as ex-usuárias [2.00min (1.67-2.33) e 4.28min±0.69; p=0,0001] e as não usuárias [2.29min (1.67-2.33) e 4.40min±0.65; p<0,0001]. Em relação aos valores médios de *peak* e ETP observamos valores maiores nas usuárias atuais de COs (441.17nM±46.40 e 2323.01nM.min±362.93) em relação às ex-usuárias (390.32nM±53.29 e 2056.79nM.min±340.23; p<0,0001) e as não usuárias de COs (394.31nM±48.46 e

2072.88nM.min±343.16; $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa dos parâmetros avaliados entre as ex-usuárias e as não usuárias de COs.

Para avaliar o desenvolvimento de resistência adquirida à PCa analisamos à nAPCsr. Observamos que ela foi maior nas usuárias atuais de COs [2.05 (1.45-2.83)] em relação às ex-usuárias [1.14 (0.74-1.67); ($p=0,0001$)] e as não usuárias de COs [0.99 (0.65-1.57); ($p=0,0001$)]. Não foi observada diferença entre ex-usuárias e não usuárias de COs.

Tabela 3: Comparação dos parâmetros da geração de trombina, na condição *High FT*, segundo as categorias de uso de contraceptivo oral (N=502).

Parâmetros	Uso de CO			p-valor
	Não usuárias (N=113)	Ex-usuárias (N=352)	Usuárias atuais (N=37)	
Lagtime (min)	2.29 (1.67-2.33)	2.00 (1.67-2.33)	1.69 (1.67-2.00)	<0.0001
Time to Peak (min)	4.40±0.65	4.28±0.69	3.82±0.44	<0.0001 ^{§¶}
Peak (nM)	394.31±48.46	390.32±53.29	441.17±46.40	<0.0001 ^{§¶}
ETP (nM.min)	2072.88±343.16	2056.79±340.23	2323.01±362.93	<0.0001 ^{§¶}
nAPCsr*	0.99 (0.65-1.57)	1.14 (0.74-1.67)	2.05 (1.45-2.83)	0.0001

*nAPCsr: Relação normalizada de sensibilidade a proteína C ativada (ETP com PCa/ETP sem PCa do participante / ETP com PCa/ETP sem PCa do *pool* controle). Kruskal-Wallis: valores expressos em mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3). ANOVA: valores expressos em média e desvio padrão. [§]Diferença estatisticamente significativa entre as categorias: usuárias atuais e ex-usuárias. [¶] Diferença estatisticamente significativa entre as categorias: usuárias atuais e não usuárias.

4. Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre o uso (atual e passado) de COs e a geração de trombina, em mulheres em idade fértil, do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil) do Estado de Minas Gerais.

Pretendíamos avaliar o potencial da TGT em refletir estados de hipercoagulabilidade, tendo em vista que os testes de coagulação sanguínea disponíveis na clínica (TP, TTPa e dímero D) apresentam boa sensibilidade para estados de hipocoagulabilidade moderado a grave, mas não para o estado de hipercoagulabilidade. Isto pode ser explicado, pelo fato de serem capazes de avaliar apenas o tempo de coagulação, que corresponde à fase de

iniciação do processo hemostático. O ponto final destes exames é determinado após a formação de apenas cinco por cento do total de trombina gerado. Portanto, os testes convencionais não são capazes de fornecer informações sobre as fases de amplificação e propagação do sistema hemostático e por esta razão, são capazes de fornecer apenas uma avaliação superficial da hemostasia [3].

Observamos que tanto a geração e trombina como a resistência adquirida à PCa entre as usuárias atuais de COs foram maiores em comparação às ex-usuárias e às não usuárias. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre as não usuárias e as ex-usuárias de COs.

Estudos já demonstraram que o uso de COs causa um estado de hipercoagulabilidade, que parece ocorrer devido ao aumento da produção de fatores da coagulação (fibrinogênio, fatores VII, VIII, IX, X, XII e XIII), redução dos anticoagulantes naturais (proteína S e antitrombina) e desenvolvimento de resistência à proteína C ativada (PCa) [15, 19]. Nossos resultados demonstraram através da TGT um estado de hipercoagulabilidade em usuárias atuais de COs, que foi caracterizado pelo encurtamento do *lag time* e do *time to peak* e aumento do *peak* e do ETP. O encurtamento do *lag time* e do *time to peak* em usuárias de COs em relação às ex-usuárias e não usuárias reflete a produção acelerada de trombina, enquanto o aumento do *peak* e ETP expressa a maior quantidade de trombina gerada durante o processo de coagulação. Embora o ETP seja o parâmetro que mais se correlacione com a clínica, por ser um parâmetro capaz de refletir todo o processo de coagulação sanguínea (iniciação, amplificação, propagação e ação de anticoagulantes naturais), em nosso estudo, os demais parâmetros também se mostraram associados ao uso de COs e conseqüentemente ao estado de hipercoagulabilidade. Zia *et al.* [20] e Glintborg *et al.* [7] em estudos de intervenção, também já haviam demonstrado a associação entre o

estado de hipercoagulabilidade e os parâmetros *lag time*, ETP e *peak*, entretanto, não avaliaram o *time to peak*.

É importante destacar que a maior geração de trombina nas participantes em uso de COs foi observada tanto na condição *Low FT*, como na condição *High TF*. Portanto, nossos achados sugerem que o efeito dos COs sobre a coagulação sanguínea ocorre de forma conjunta sobre ambas às vias, intrínseca e extrínseca e/ou sobre a via comum. Este achado corrobora com resultados de outros estudos que já demonstraram que o uso de COs está associado com o aumento de fatores da coagulação tanto da via intrínseca, (fatores XII, IX e VIII), como da via extrínseca, (fator VII), e via comum, (fator X) [15, 19].

Por outro lado, um mecanismo proposto para explicar o aumento da geração de trombina em usuárias atuais de COs, refere-se ao desenvolvimento de resistência adquirida à PCa, a qual pode ser avaliada, através da TGT, pelo cálculo da nAPCsr (relação de sensibilidade a proteína C ativada normalizada). Em nosso estudo, a nAPCsr foi maior entre as usuárias atuais em relação as ex-usuárias e as não usuárias de COs. Este achado é capaz de explicar, pelo menos em parte, a maior geração de trombina em usuárias atuais de COs, pois a ação dos COs sobre a geração de trombina pode ocorrer devido ao seu efeito sobre a diminuição dos níveis de proteína S (PS), um cofator não enzimático da PCa, levando a uma inibição ineficiente dos fatores Va e VIIIa [17]. Os COs também podem levar a uma diminuição dos níveis do inibidor da via do fator tecidual (TFPI), aumentando o potencial procoagulante do plasma e dificultando a inibição da geração de trombina via ação da PCa. E além disso, a inibição inadequada do fator FXa por níveis diminuídos de TFPI pode gerar um aumento dos níveis desse fator, que também é responsável por proteger o fator FVa da inativação pela PCa [16].

Nossos resultados também mostraram que as ex-usuárias de COs apresentam geração de trombina e nAPCsr semelhantes às não usuárias. Esse achado sugere que o aumento da

geração de trombina e o desenvolvimento de resistência adquirida à PCa provocados pelo uso de COs permanece apenas durante o período de uso, ou seja, é reversível. Este resultado concorda com estudos anteriores que investigaram o uso passado de COs no desenvolvimento de eventos tromboembólicos. Vessey *et al.* [18], em um estudo de coorte relatou que não houve diferença nas incidências de TVP e TEP entre os grupos de ex-usuárias e não usuárias de COs. Posteriormente em revisões da literatura, Hannaford [8] e Rosendaal *et al.* [14] concluíram que o risco de DTE é rapidamente anulado após a interrupção do uso dos COs.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, é importante destacar que, ao contrário de um ensaio clínico randomizado, participantes de estudos observacionais em uso de COs (atual ou passado) podem apresentar valores maiores de geração de trombina e nAPCsr por razões não relacionadas ao uso do hormônio. Entretanto, os três grupos, segundo o uso de COs, foram bastante homogêneos, uma vez que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à escolaridade, às condições de saúde e aos hábitos de vida relacionados à saúde. Apenas a idade foi diferente entre os grupos, uma vez que devido à média de idade da nossa população de estudo, era esperado que as usuárias de COs fossem mais jovens que as ex-usuárias. Além disso, os níveis de LDL-c foram menores e os níveis HDL-c e triglicérides foram maiores nas usuárias atuais de COs em relação às ex-usuárias e não usuárias. Poderíamos ter ajustado nossos resultados por essas variáveis e pelos outros possíveis fatores de confusão. Entretanto, na análise univariada, nenhum dos possíveis fatores de confusão, incluindo idade e perfil lipídico, foi associado estatisticamente aos valores de geração de trombina e nAPCsr, o que não configura, assim, confundidores. Nesse sentido, não acreditamos que as diferenças encontradas em relação à idade e ao perfil lipídico possam comprometer os resultados encontrados.

Ainda sobre o desenho de estudo, o caráter transversal não permite fazer qualquer inferência causal, uma vez que este desenho não garante temporalidade. Em segundo lugar, nós não investigamos a resistência hereditária à PCa, causada pela mutação do fator V da coagulação (Fator V Leiden). Dessa forma, não é possível afirmar que a resistência à PCa encontrada é somente adquirida pelo uso de COs. Entretanto, no Brasil essa mutação está presente em apenas 2% da população, e por esta razão não acreditamos que esse tenha sido um problema [2]. Em terceiro lugar é importante destacar que Dargaud *et al.* [6], em um estudo de padronização e normalização da TGT pelo método de CAT® (método calibrado automatizado de trombograma®), preconiza o preparo da amostra através de dupla centrifugação por 15 minutos a 2.500 g para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Entretanto, em estudos epidemiológicos de grande porte, como o ELSA-Brasil, uma parte das amostras é armazenada para a realização de novos procedimentos em estudos suplementares, como a TGT apresentada no presente estudo. Assim, era feita uma centrifugação padrão que seguia os critérios de garantia e controle de qualidade do estudo, que era por meio de uma única centrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm. Entretanto, como a condição de processamento das amostras biológicas foi idêntica para todos os grupos analisados, acreditamos que esse parâmetro não tenha influenciado em nossos resultados.

Por outro lado, o presente estudo também apresenta o ponto forte, de ser um dos primeiros trabalhos a avaliar a TGT pelo método CAT® em usuárias de COs em amostra de mulheres adultas brasileiras. Como a trombina é uma proteína que apresenta papel chave no processo hemostático, pois desempenha funções pró-coagulantes, anticoagulantes e anti-fibrinolíticas, a TGT permite avaliar o processo de iniciação, amplificação e propagação da coagulação, sendo capaz de refletir o risco de desenvolvimento de eventos

hemorrágicos e trombóticos através da avaliação de todos os componentes e/ou condições do processo hemostático [12].

Assim sendo, nossos resultados sugerem o potencial da TGT em refletir o estado de hipercoagulabilidade decorrente do uso de COs, e por esta razão, caso venha a ser inserida na prática clínica poderá contribuir com o rastreamento precoce do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e trombofilias hereditárias ou adquiridas em mulheres que desejam usar COs, garantindo-lhes uma maior segurança.

5. Conclusão

Foi encontrada associação entre o uso atual de COs e a geração de trombina, bem como com a resistência a PCa. Estes resultados sugerem a capacidade da TGT em refletir estados de hipercoagulabilidade. Com relação ao uso passado, ex-usuárias de COs apresentaram geração de trombina e resistência à PCa semelhantes as não usuárias, o que parece demonstrar a capacidade da técnica de refletir também o efeito pró-coagulante reversível dos COs.

Portanto, nossos resultados parecem evidenciar a capacidade da TGT em avaliar a coagulação sanguínea de forma global e por esta razão, caso venha a ser inserida na prática clínica poderá contribuir com a segurança de mulheres que desejam fazer uso de COs, uma vez que poderá permitir o rastreio precoce de doenças cardiovasculares e trombofilias hereditárias ou adquiridas.

6. Referências bibliográficas:

1. AQUINO, EM, BARRETO, SM, BENSENOR, IM, CARVALHO, MS, CHOR, D, DUNCAN, B. et al. Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): objectives and design, *Am J Epidemiol*, v.4, p.315-24, 2012.

2. ARRUDA VR, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, COSTA FF, REITSMA PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population, *American Journal of Hematology*, v. 49, p. 242-243, 1955.
3. BRUMMEL-ZIEDINS KE, WOLBERG AS. Global assays of hemostasis. *Curr Opin Hematol*, v. 21, n. 5, p. 395–403, 2004.
4. CHOR, D, ALVES, MG, GIATTI, L, CADE, NV, NUNES, MA, MOLINA, M C. BENSEÑOR, I.M.; AQUINO, E.M.; PASSOS, V.; SANTOS, S.M.; FONSECA, M. J.; OLIVEIRA, L.C. Questionnaire development in ELSA-Brasil: challenges of a multidimensional instrument, *Revista de Saúde Pública*, v. 47, n. 2, p. 27-36, 2013.
5. CLSI. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; approved standard-sixth edition. CLSI Document H3-A6, Wayne (PA): CLSI, 2007.
6. DARGAUD Y, LUDDINGTON R, GRAY E, NEGRIER C, LECOMPTE T, PETROS S, HOGWOOD J, BORDET JC, REGNAULT V, SIEGEMUND A E BAGLIN T. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study, *Journal of Haematology*, n. 139, p. 303–309, 2007.
7. GLINTBORG D, SIDELMANN JJ, ALTINOK ML, MUMM H, ANDERSEN M. Increased thrombin generation in women with polycystic ovary syndrome: A pilot study on the effect of metformin and oral contraceptives, *Metabolism Clinica and Experimenta*, v. 16, n. 4, p. 1272–1278, 2015.
8. HANNAFORD P. Cardiovascular events associated with different combined oral contraceptives: a review of current data, *Drug Saf.* v. 22, n. 5, p. 361-71, 2000.
9. HEIT, JA. Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors, *J Thromb Haemost*, v.3, p. 1611–17, 2005.
10. LECUT C, PETERS P, MASSION PB, GOTHOT A. Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory? *Ann Biol Clin*, v. 73, n. 2, p. 137–49, 2005.
11. LIDEGAARD O, NIELSEN LH, SKOVLUND CW, SKJELDESTAD FE. Risk of venous thromboembolism from use of oral contraceptives containing different

progestogens and oestrogen doses: Danish cohort study, 2001-9, *BMJ*, v. 343, p. 6423, 2011.

12. MACFARLANE RG, BIGGS R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia, *J Clin Pathol*, v. 6, n. 1, p. 3–8, 1953.

13. MAFFEI, FHA, YOSHIDA, WB, LASTÓRIA, S. Venous thromboembolism in children and adolescents, *Jornal vascular brasileiro*, v. 1, n. 2, p.121-128, 2002.

4. ROSENDAAL, FR, Vlieg van H, TANISY, BC, HELMERHORST, FM. Estrogens, progestogens and thrombosis, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.1, p. 1371–1380, 2003.

15. ROSING J, TANS G, NICOLAES GAF, THOMASSEN MCLGD, et al. Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives, *Br J Haematol*, v. 97, p. 233-8, 1997.

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

17. VAN VLIET HA, BERTINA RM, DAHM AE, et al. Different effects of oral contraceptives containing different progestogens on protein S and tissue factor pathway inhibitor, *J Thromb Haemost*, v. 6, p. 346–51, 2008.

18. VESSEY M, MANT D, SMITH A, YEATES D. Oral contraceptives and venous thromboembolism: findings in a large prospective study, *BMJ*, 1986.

19. VIEIRA, CS, OLIVEIRA, LAC, SÁ, MFS. Female hormones and hemostasis, *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 29, n. 10, p. 538-47, 2007.

20. ZIA A, CALLAGHAN MU, CALLAGHAN JH, SAWNI A, BARTLETT H, BACKOS A, MARSHALL S, CHITLUR M, RAJPURKAR M. Hypercoagulability in adolescent girls on oral contraceptives: global coagulation profile and estrogen receptor polymorphisms, *Am. J. Hematol*, v. 90, p. 725–731, 2015.