



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA

Lilian Rodrigues Orsolini

**Anticoncepcionais hormonais orais
de baixa dose na adolescência e
repercussões sobre a massa
óssea: dois anos de uso**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Titular Tamara Beres Lederer Goldberg

Botucatu

2020

Lilian Rodrigues Orsolini

**Anticoncepcionais hormonais orais
de baixa dose na adolescência e
repercussões sobre a massa
óssea: dois anos de uso**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Titular Tamara Beres Lederer Goldberg

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Orsolini, Lilian Rodrigues.

Anticoncepcionais hormonais orais de baixa dose na
adolescência e repercussões sobre a massa óssea : dois
anos de uso / Lilian Rodrigues Orsolini. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Tamara Beres Lederer Goldberg
Capes: 40101150

1. Adolescentes. 2. Anticoncepcionais. 3. Densidade
óssea. 4. Remodelação óssea.

Palavras-chave: Adolescentes; Anticoncepcional;
Contraceptivos; Densidade óssea; Remodelação óssea.

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pelo seu imenso amor e misericórdia.
Todo-Poderoso, que era, é e há de vir.
Porto seguro nos momentos de aflição.

Aos meus amados pais, **Eduardo e Mariza**, pelo apoio e incentivo,
sempre em busca da felicidade e do conhecimento.

À minha irmã querida e melhor amiga, **Fernanda**, presente de Deus,
participando em todos os momentos, sempre com as perfeitas palavras de
encorajamento.

Ao meu querido irmão, **Fábio** e sua linda família, que me alegra a cada
dia e me ensina a enxergar o lado positivo em tudo e a agradecer sempre.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Prof^a. Titular Tamara Beres Lederer Goldberg** por sua paixão inspiradora pela ciência, sua busca incansável do conhecimento e por seus enriquecedores questionamentos e correções sempre buscando o meu melhor, sem esquecer da paciência de uma mãe.

A Enf^a. **Mestre Talita Domingues Caldeirão**, parceira na execução do trabalho.

Ao Departamento da Pediatria representado pela **Dr^a. Anapaula da Conceição Bisi Rizzo**, pela **Dr^a. Talita Poli Biason** e pela **Prof^a. Dra. Carla Cristiane da Silva** que construíram os pilares desse projeto.

Ao **Paulo César Lopes** e ao **Fabiano Luís Michelin**, funcionários do Departamento de Pediatria, pela editoração deste trabalho.

Ao Departamento de Ginecologia, pela aproximação e aperfeiçoamento da docência.

Aos funcionários da Radiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu pela realização dos exames de idade óssea e densitometria.

Ao **Prof. Altamir Santos Teixeira**, colaborador nos laudos dos exames de imagem.

Ao UNIPEX, representado pela **Prof^a Dr^a. Cilmary Suemy Kurokawa**, pela **Mestre Márcia Tenório Delneri** e pela **Mestre Maria Regina Moretto de Oliveira**, pela organização das coletas e imenso cuidado com o manejo e armazenamento das amostras, pela realização das análises dos

marcadores, e pelas correções sempre pertinentes à pesquisa.

Ao Departamento de Estatística representado pelo **Prof. Dr. Hélio Nunes** que, com seu conhecimento e questionamento, contribuiu para o crescimento e conclusão do trabalho.

A **Cynthia Scolástico C. de Souza** do Escritório de Apoio à Pesquisa, pela disponibilidade para ajudar.

À nutricionista doutoranda **Sarah Maria Barneze Costa** pela realização da análise do recordatório alimentar.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Unesp de Botucatu.

À Unimed Assis pelo patrocínio e incentivo à pesquisa, indispensáveis para a realização desta pesquisa.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; número 2007/07731-0, 2011/05991-0, e 2015/04040-2) pelo financiamento e apoio a pesquisa.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP pelo apoio a pesquisa.

Aos laboratórios de análises clínicas de Assis Dr. Joelson e Bioanálise e da Faculdade de Medicina de Botucatu pelas coletas de sangue das adolescentes do projeto.

Ao Instituto de Atendimento Médico de Assis (IAM) e **Prof. Dr. Waldir Modotti** pela parceria na coleta dos exames.

Às adolescentes, aos pais e responsáveis por confiarem suas filhas aos meus cuidados.

À aluna **Maria Paula**, por me inspirar na caminhada da docência.

Ao **Bruno Henrique**, por embarcar nessa aventura ao meu lado e incentivar sempre meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos e familiares, pela paciência quando da minha ausência e pelo incentivo à vitória.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Introdução: A adolescência representa um período de extrema importância, em razão do intenso processo de transformações biológicas e psicossocioemocionais. Destacam-se, na puberdade, o ganho expressivo de massa óssea e o despertar da sexualidade - importante descoberta do adolescente - que implica muitas vezes no início da atividade sexual e na prescrição precoce de métodos contraceptivos. As evidências quanto aos efeitos do uso de contraceptivos hormonais sobre a aquisição de massa óssea, durante a adolescência, são limitadas e a literatura é contraditória quanto aos resultados observados.

Objetivo: Avaliar o comportamento do metabolismo ósseo de dois grupos de adolescentes saudáveis, usuárias de anticoncepcional hormonal oral (ACHO), ACHO 1: Etinilestradiol (EE) 20 µg / Desogestrel 150 µg ou ACHO 2: EE 30 µg / Drospirenona 3 mg, durante um período de dois anos de uso, comparativamente a um grupo-controle de adolescentes não-usuárias de ACHO.

Métodos: Trata-se de um estudo longitudinal controlado não-randomizado (quase experimental) com a participação de 168 adolescentes, divididas nos três grupos. As adolescentes foram submetidas ao exame de Densitometria Óssea por atenuação de raio X de dupla energia (DXA) e dosagem de biomarcadores ósseos, Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) e Osteocalcina (OC) no momento basal e 24 meses da inclusão no estudo.

Resultados: As não-usuárias incorporaram mais massa óssea em todos os sítios analisados, quando comparadas com os grupos ACHO 1 e ACHO 2 ($p < 0,05$). Os três grupos apresentaram redução nas concentrações dos marcadores de formação óssea sem diferença estatística.

Conclusão: Observa-se prejuízo na aquisição de massa óssea em adolescentes saudáveis, usuárias de anticoncepcionais hormonais combinados comparadas ao grupo-controle, sendo mais evidente o impacto negativo no grupo das adolescentes usuárias de anticoncepcionais que continham EE 30µg.

Palavras-chave: adolescentes, anticoncepcional, contraceptivos, densidade óssea, reabsorção óssea, remodelação óssea.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as variáveis antropométricas, densitométricas e os marcadores de formação óssea, no momento basal, observados nos três grupos de adolescentes (o grupo-controle e os dois grupos de usuárias de contraceptivos).

Tabela 2. Comparação entre as variáveis antropométricas, densitométricas e os marcadores de formação óssea, após 24 meses, observados nos três grupos de adolescentes (o grupo-controle e os dois grupos de usuárias de contraceptivos).

Tabela 3. Variação evolutiva, em valores absolutos, dos parâmetros antropométricos, densitométricos e de marcadores ósseos nos três grupos acompanhados por 24 meses.

Tabela 4. Comparação entre as variáveis antropométricas, densitométricas e os marcadores de formação óssea, das adolescentes que permaneceram no estudo por 24 meses frente as excluídas. Momento basal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxo das participantes incluídas na pesquisa e sua permanência após vinte e quatro (24) meses de acompanhamento.

ABREVIATURAS

ACHO Anticoncepcional combinado hormonal oral

EE Etinilestradiol

IO Idade óssea

DXA Densitometria óssea

FAO Fosfatase alcalina óssea

OC Osteocalcina

S-CTx Telopectídeo-carboxiterminal

DMO Densidade mineral óssea

GnRH Hormônio liberador de gonadotrofinas

LH Hormônio luteinizante

FSH Hormônio folículo estimulante

GH Hormônio de crescimento

IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina

TRH Terapia de reposição hormonal

IL Interleucina

OPG Osteoprotegerina

TNF Fator de necrose tumoral

PVC Pico de velocidade de crescimento

CMO Conteúdo mineral óssea

IST Infecções sexualmente transmissíveis

IMC Índice de massa corpórea

TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido

DMPA Acetato de medroxiprogesterona

ISCD *International Society for Clinical Densitometry*

LARC Métodos contraceptivos de longa duração

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Revisão de Pesquisas sobre Densitometria e Marcadores Ósseos em Adolescentes e Jovens que utilizam Anticoncepcionais Hormonais	27
2. OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. SUJEITOS E MÉTODOS	34
3.1 CÁLCULO AMOSTRAL	41
3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3.3 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	42
3.4 FINANCIAMENTO	42
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	43
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
7. ANEXOS	82

1. INTRODUÇÃO

A adolescência constitui-se um período de muitas transformações físicas (anatômicas), hormonais, sociais e psicológicas. A puberdade marca essa transição fisiológica com alterações puberais que se iniciam, geralmente, com a aceleração do crescimento, desenvolvimento das mamas, seguidos do aparecimento dos pelos pubianos e, por fim, a menarca (1).

A população brasileira de adolescente é composta por aproximadamente 35 milhões de pessoas (2). Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 18% da população estão entre os limites etários de 10 a 20 anos incompletos (3).

A puberdade é caracterizada por uma cascata de eventos ativada por um eixo neuroendócrino, que engloba o hipotálamo, a hipófise e as gônadas, inicialmente suprimido durante a infância. O exato sinal que desencadeia esses eventos ainda não está completamente elucidado, mas pesquisadores buscam esclarecer os fenômenos envolvidos (4). A literatura aponta o papel central dos neurônios kisspeptina, presentes no hipotálamo e responsáveis pela ativação do eixo neuroendócrino (5). Estudos em modelos animais demonstram aumento de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e hormônio luteinizante (LH) com a administração de kisspeptinas (6). Mutações nos genes *KISS1* ou *KISS1R*, também

conhecidos como GPR54, acarretam-lhes a sua inativação, da qual resulta hipossecreção de gonadotrofinas e consequente hipogonadismo hipogonadotrófico (7). Outro importante fator envolvido nesse complexo fenômeno da puberdade é a leptina, produzida pelos adipócitos, em interação com a kisspeptina (8). A diminuição da expressão de receptores de leptina, presentes em neurônios KISS 1 do núcleo arqueado, resulta em falha no desencadeamento da puberdade (5).

Por outro lado, a puberdade de adolescentes do sexo feminino inicia-se mais precocemente quando elas apresentam concentrações mais elevadas de leptina e aumento do percentual de gordura corporal (9).

O hipotálamo secreta o GnRH que estimula a hipófise anterior, através da circulação do sistema porta-hipofisário, a produzir os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O GnRH é um decapeptídeo de meia vida curta liberado de forma pulsátil. Durante a infância, os pulsos de GnRH apresentam-se baixos. A pulsatilidade aumenta em diferentes amplitudes e frequências, principalmente à noite, no período de sono e dos sonhos, quando ocorrem os movimentos oculares rápidos (MOR), estabelecendo-se, então, a puberdade inicial (4)(10).

As gonadotrofinas estimulam a maturação ovariana e a síntese gonadal de esteróides sexuais. O LH estimula as células da teca a produzirem precursores androgênicos, e o FSH estimula a enzima aromatase, presente nas células da granulosa, a converter androgênios em estrogênios (teoria das duas células – duas gonadotrofinas) (11)(12).

O estrogênio em sinergia com o hormônio de crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) desencadeiam o crescimento longitudinal.

O estirão de crescimento ocorre, comumente, mais cedo em adolescentes do sexo feminino, que em meninos. Em geral, acontece dois anos após o desenvolvimento das mamas e antecede, em um ano, à menarca, ocorrendo o pico máximo de velocidade de crescimento (PVC), quando as meninas estão em estágio M3 de mamas pelos critérios de Tanner (4). A massa óssea adquirida por um indivíduo inicia-se desde a fase embrionária e atinge um platô próximo aos 18 anos (13)(14), alcançando 92% da massa óssea total até essa idade (15). O pico de massa óssea de um indivíduo é definido pela aquisição máxima de massa óssea durante a juventude, após estabelecido seu crescimento longitudinal (16). A perda dessa janela de oportunidade exerce influência negativa sobre a saúde óssea na idade adulta e senil, com maior risco de osteopenia/osteoporose e, conseqüentemente, de fraturas (17). A cada 10% de incremento de massa óssea na adolescência, diminui em 50% o risco de fraturas e atrasa-se em 13 anos o surgimento da osteoporose (18)(19).

A osteoporose afeta mais de 10 milhões de pessoas no Brasil. Trata-se de uma doença ósteometabólica caracterizada pela deterioração da microarquitetura e fragilidade ósseas. É responsável por um gasto

financeiro expressivo do sistema de saúde, consequente a fraturas, seu principal desfecho.

Estima-se, nos Estados Unidos, um custo anual de aproximadamente 18 milhões de dólares com gastos relacionados aos cuidados com a saúde dos pacientes que sofreram fraturas osteoporóticas (20).

A prevalência de fratura por fragilidade óssea nas mulheres acima de 40 anos, que se distribuem por todo território nacional, é de 15,1%, segundo o estudo BRAZOS, cujos dados foram obtidos em 2006 (21).

As fraturas aumentam o risco de morbidade e mortalidade entre os acometidos, principalmente mulheres na menopausa, podendo ser responsáveis por 21 % dos óbitos de mulheres no primeiro ano após o evento (20). A baixa densidade mineral óssea (DMO) é o principal preditor do risco de fraturas (22).

Yilmaz e colaboradores evidenciaram que a aquisição de massa óssea se relaciona ao avanço do estadiamento puberal de Tanner, sendo mais significativo entre os estadiamentos 3 e 4 (23), como observado num estudo brasileiro, em que foram incluídas 101 adolescentes, selecionadas com critérios precisos (24).

Matkovic e colaboradores conduziram um estudo sobre a massa óssea, realizando a densitometria óssea (DXA) de 265 mulheres, de oito a 50 anos, e observaram a evolução desse processo (17). A maior taxa de incremento ósseo (fêmur proximal e coluna) foi encontrada ao final da

adolescência, quando atingiu a estabilidade após os 18 anos e daí até a perimenopausa. Baxter-Jones e pesquisadores, em 2011, apoiaram os achados acima descritos, ao analisarem uma coorte de participantes de oito a trinta anos, indicando o período de maior aquisição de massa óssea nos dois primeiros anos após o pico de velocidade de crescimento, com pequena variação entre os sítios analisados. A aquisição se deu relativamente com mais precocidade no colo do fêmur do que em outros locais, a saber, na coluna e no corpo total (25).

Sabe-se que o osso possui funções biomecânicas, como a locomoção, a sustentação e a proteção de órgãos internos, o sistema nervoso e a medula óssea; possui ainda a função metabólica, inclusive a da regulação do pH sérico e a da concentração de minerais, além de ser considerado um órgão endócrino. Produz Osteocalcina, um marcador biologicamente ativo no metabolismo da glicose e da gordura, sendo capaz de influenciar nos mecanismos de liberação, sensibilidade e resistência à insulina (26).

O tecido ósseo é composto de estruturas macroscópicas de osso compacto e esponjoso. O osso compacto encontra-se principalmente na diáfise e forma uma camada externa de proteção à medula óssea. O osso esponjoso constitui-se de cavidades intercomunicantes; é frequentemente encontrado nas epífises e constitui a maior parte de ossos curtos e planos. A matriz óssea é formada de material orgânico, sendo 90% dele colágeno, e de material inorgânico, principalmente cristais de hidroxiapatita (27). O

metabolismo ósseo é marcado pelo equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção. A remodelação óssea envolve ciclos orquestrados por duas células principais: os osteoblastos, células de linhagem mesenquimal, responsáveis pela formação óssea, e os osteoclastos, células de reabsorção provenientes da linhagem hematopoiética (13)(14).

Os osteoclastos são ativados, recrutados e degradam a matriz óssea, mediante enzimas proteolíticas, liberando fragmentos de colágeno. As lacunas formadas na superfície óssea recebem inicialmente os macrófagos e, na sequência, os osteoblastos, que preencherão essas lacunas, por meio de síntese e depósito de matriz óssea, efetuando a mineralização.

A saúde óssea sofre influência de fatores endógenos como os transmitidos pela genética e exposição aos hormônios sexuais e, fatores exógenos, como atividade física, nutrição, tabagismo e uso de medicamentos (14)(28)(29).

Boot e colaboradores observaram relação entre a menarca, que ocorre em idades mais precoces, e maior densidade óssea, destacando o relevante papel do estrogênio na aquisição de massa óssea (30). Os mecanismos exatos, que explicam essa relação, ainda não estão totalmente compreendidos.

A deficiência estrogênica, observada no período pós-menopausa, provoca aumento na reabsorção em detrimento da formação óssea, com consequente perda da massa óssea (31)(32). Resultados do grande estudo

observacional *Women's Health Initiative* reforçam essa afirmação, quando mulheres, no climatério, tratadas por meio de Terapia de Reposição Hormonal (TRH) com estrogênio conjugado equino, obtiveram aumento de densidade mineral óssea e redução do risco de fraturas (33).

Os resultados da metanálise de Wells e colaboradores, em 2002, acrescentaram a essas evidências um aumento de 6,8% na DMO da coluna lombar de mulheres tratadas, em período pós-menopausa, com TRH, aumento que contribuiu para enfatizar o importante papel do estrogênio na massa óssea (34).

O estrogênio age diretamente em receptores presentes nas células de formação e reabsorção ósseas. Sua ação consiste tanto na inibição da produção de interleucinas (IL-1 β , IL-6) e prostaglandinas (E₂), importantes reguladores da reabsorção, como no estímulo da produção de osteoprotegerina (OPG), membro da família fator de necrose tumoral (TNF), conhecido, também, como fator inibidor da osteoclastogênese (31)(35)(36).

Estudos experimentais realizados com células osteoblásticas demonstram o estímulo da secreção de OPG na presença de 17 beta Estradiol, assim como um aumento de sua expressão gênica (36).

Para a compreensão da fisiologia óssea e, principalmente, da avaliação da massa óssea, o acompanhamento da densidade mineral óssea (DMO) é considerado uma ferramenta importante, sendo seu emprego sugerido nessa avaliação em todas as faixas etárias, da infância à senilidade. A absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) é

considerada o método mais adequado para avaliação de conteúdo mineral ósseo (CMO) e DMO de crianças e adolescentes. Trata-se de método rápido, reprodutível, seguro, não-invasivo, preciso e de baixa exposição à radiação (37)(38). A coluna lombar e o corpo total, com e sem o segmento da cabeça, são os sítios esqueléticos considerados ideais, para avaliação do CMO e para medidas de DMO, na maioria dos pacientes pediátricos e nos da faixa etária da adolescência (16)(38).

Entretanto, sabemos que a DMO é uma medida pontual estática e, portanto, não reflete as alterações dinâmicas que o tecido ósseo está sofrendo na ocasião da realização do exame e do período próximo que antecede sua realização. Para suprir essa limitação e, dessa forma, melhorar a sensibilidade e especificidade na avaliação do risco de fraturas, marcadores bioquímicos de remodelação óssea vêm sendo analisados.

A análise e acompanhamento dos níveis séricos dos biomarcadores ósseos são úteis para o entendimento do processo de remodelação, investigação de doenças ósseas, além de permitirem avaliar a resposta ao tratamento dessas doenças (39)(24). São moléculas derivadas da síntese ou da degradação de matriz óssea e dividem-se em duas categorias: a de formação óssea, como a Osteocalcina (OC) e a Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), e a de reabsorção, como o fragmento telopeptídeo-carboxiterminal (S-CTx) (40).

O S-CTx é considerado um dos interligadores do colágeno, produtos da degradação do colágeno tipo I pela ação dos osteoclastos. Níveis

elevados de S-CTx indicam rápida perda óssea e se correlacionam com risco de osteoporose e fraturas (22).

A OC é a proteína não-colágena da matriz óssea mais abundante e produzida por osteoblastos diferenciados. Relaciona-se à mineralização da matriz osteoide e as vitaminas D e K1 são importantes cofatores. Imunoensaios demonstram correlação entre valores elevados de OC com aumento da formação óssea como no hipertireoidismo e nas metástases ósseas (24). A FAO consiste numa enzima específica encontrada na membrana plasmática de osteoblastos e está envolvida nos processos de formação e mineralização óssea (41).

A literatura aponta para correlações negativas significativas entre as concentrações de biomarcadores de remodelação óssea e a idade cronológica, idade óssea, desenvolvimento das mamas e valores de DMO, durante a segunda década de vida, indicando que, quanto mais maduras são essas meninas e maior a aquisição de massa óssea verificada nesse período, menores são as concentrações de seus marcadores ósseos (23)(24)(43). Além disso, Tuchman e colaboradores destacam a relação dos biomarcadores ósseos e o pico de velocidade de crescimento (PVC) (42).

van Coeverden e colaboradores observaram concentrações de biomarcadores progressivamente maiores e coincidentes com o PVC e as mais baixas concentrações ao final da puberdade, período no qual se observa uma queda na velocidade de crescimento, sendo os níveis dos

biomarcadores muito semelhantes àqueles observados na idade adulta (44).

Callegari e colaboradores definiram valores de referências para marcadores ósseos em jovens de 16 a 25 anos e evidenciaram queda nas concentrações de CTX e PINP (propeptídeo colágeno tipo 1) com a progressão da idade (45), ressaltando que, ao avaliarem os marcadores selecionados ao término da adolescência, os resultados apresentaram comportamento semelhante aos descritos por van Coeverden (44).

A adolescência também é marcada pelo despertar da sexualidade. Uma pesquisa realizada pelo *Projeto Sexualidade* (ProSex) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), entre 2000 e 2004, revela que adolescentes iniciam sua atividade sexual na faixa entre os 13 e os 17 anos de idade (46). Segundo uma pesquisa realizada em 2015 pelo IBGE (47), 19,5% das meninas e 36% dos meninos, todos eles escolares, que frequentavam o 9º ano do ensino fundamental, de escolas públicas e privadas, já tinham tido relação sexual alguma vez.

Os dados do IBGE também são alarmantes quanto aos elevados índices de gravidez na adolescência. Segundo dados apresentados pelo Ministério da Saúde, do total de partos ocorridos em 2018 - quase três milhões - , 15,1% eram de menores de 19 anos, 0,6% dos quais foram de adolescentes entre 10 e 14 anos, e 14,5%, entre 15 e 19 anos (48).

Não podemos deixar de citar que as complicações relacionadas à gravidez na adolescência estão entre as principais causas de morte de mulheres de 15 a 19 anos e que 15% das mortes maternas ocorrem em menores de 19 anos (49).

Esses dados, apesar de extremamente graves, apresentaram uma queda em relação aos de 2017; destaca-se a importância de expandir projetos de educação em saúde na faixa etária referida e de divulgar os resultados atingidos. Mais de 80% dos escolares do 9º ano recebem orientação sobre Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) e prevenção de gravidez nas escolas (47). Entretanto, muitas adolescentes não têm expectativas de uma carreira promissora, ou mesmo metas a serem alcançadas, sendo a maternidade a única possibilidade que surge como opção de vida, ou como uma escolha ou desejo pessoal.

Com o propósito de reduzir esses índices inquietantes, métodos contraceptivos são prescritos para mulheres cada vez mais jovens. O mais utilizado pelas adolescentes é o anticoncepcional combinado hormonal oral (ACHO) por ser livre o acesso a ele e fácil o uso.

Um estudo canadense observou redução, na idade de iniciar o uso de anticoncepcionais, de 19 anos, em 1997, para 16 anos, em 2014 (50). Vale ressaltar, também, seu uso com o objetivo de tratamento de doenças, como dismenorreia, irregularidade menstrual, síndrome dos ovários policísticos e acne em idades cada vez mais precoces, não se enfatizando apenas a contracepção.

Os métodos hormonais estão entre os mais seguros, mas a dupla proteção, que combina contracepção de barreira e método hormonal, deve ser sempre encorajada com o objetivo de evitar a gravidez e a transmissão de IST.

Diante de todos esses pontos colocados em destaque, na introdução deste estudo, restam dúvidas e indagações, que nos levam a propor esta questão: Que efeitos tem, a longo prazo, sobre a massa óssea, um início mais precoce do uso de ACHO, na adolescência?

A maioria dos anticoncepcionais hormonais orais são combinações de diferentes progestágenos e estrogênios e possuem mais comumente, em sua composição, o Etinilestradiol (EE), estrogênio sintético, componente responsável pela estabilidade do endométrio e por potencializar o efeito supressor do progestágeno. Ambos os hormônios, Estradiol e Etinilestradiol, agem em receptores estrogênicos, através dos mesmos mecanismos biológicos, sendo reconhecida a potência maior do EE sobre os tecidos alvo (51). Porém, os efeitos dos contraceptivos hormonais sobre a saúde óssea das adolescentes não parecem refletir a potente atividade estrogênica do EE.

As evidências são conflitantes quanto à influência do uso de contraceptivos hormonais orais sobre a massa óssea dessas jovens mulheres. Entretanto, não há discordância entre os especialistas quanto à prescrição de ACHO, compostos de doses cada vez menores de Etinilestradiol, para a redução de complicações tromboembólicas (52).

A heterogeneidade dos estudos referentes ao número de participantes, ao tipo de contraceptivo, à randomização dos grupos, aos critérios de seleção, ao período de observação, e à interferência de fatores, como atividade física e ingestão de cálcio e vitamina D, dificulta a compreensão dos possíveis efeitos relacionados, exclusivamente, ao uso de ACHO sobre o incremento da massa óssea de adolescentes e sobre seu impacto quanto ao risco de osteoporose na vida senil (53).

1.1. Revisão de Pesquisas sobre Densitometria e Marcadores Ósseos em Adolescentes e Jovens que utilizam Anticoncepcionais Hormonais

Segundo recomendações da *National Osteoporosis Foundation* (16), o uso de acetato de medroxiprogesterona (DMPA) injetável trimestral lista-se como categoria B entre os critérios de elegibilidade e de evidência sobre o impacto negativo na massa óssea. Sua ação principal é mediada pela deficiência estrogênica; entretanto, sabe-se que seu uso pode alterar a expressão de genes de receptores de glicocorticóides. Lange e colaboradores avaliaram, recentemente, a perda de massa óssea em exposição a diferentes concentrações de DMPA, constatando ser ela mais significativa em usuárias de 150 mg comparadas às que fazem uso de 75 mg. Nesse estudo, as concentrações séricas de Estradiol nos três grupos analisados foram estatisticamente semelhantes ($p = 0,50$); avaliam-se

outras hipóteses que justifiquem a causa da perda óssea verificada no grupo de usuárias de concentrações mais elevadas de DMPA (54).

Rome e colaboradores, em 2004, conduziram um estudo prospectivo com adolescentes divididas em grupo-controle e grupo de usuárias de anticoncepcional oral, no qual se combinam Etinilestradiol 20 µg / Levonorgestrel 100 µg ou injetável com medroxiprogesterona, e verificaram concentrações mais elevadas de marcadores ósseos em não-usuárias, o que sugere haver metabolismo ósseo suprimido em adolescentes expostas a ambos os contraceptivos estudados, após 12 meses de acompanhamento (55).

Em 2009, Lattakova e colaboradores avaliaram os marcadores ósseos e a densidade mineral óssea em adolescentes usuárias de contraceptivos de baixa (30 µg EE) e muito baixa dose (15 µg EE) e não identificaram diferença significativa quanto a DMO, S-CTx e OC após um ano de uso (15). Deve-se ressaltar que utilizaram progestágenos diferentes em cada grupo; nesse estudo não houve grupo-controle.

Estudo prospectivo, realizado por Jackowski e colaboradores, permitiu verificar que, numa coorte de adolescentes e adultas jovens, a exposição a anticoncepcionais hormonais combinados pode apresentar um efeito idade dependente, cujo impacto é negativo no desenvolvimento do CMO e da DMO, quando esses anticoncepcionais são utilizados após cinco anos do pico máximo de crescimento em estatura, ou seja, no final da adolescência; o mesmo, porém, não foi observado na mesma intensidade,

quando utilizados imediatamente após o PVC, descrito no estudo, ao redor dos 12 anos de idade (56).

Polatti e colaboradores evidenciaram um ganho de 7,8% de massa óssea, avaliada pelo DXA, em não usuárias de contraceptivos acompanhadas durante cinco anos, mas não observaram mudança significativa na densidade mineral óssea no grupo que fazia uso de ACHO (Etinilestradiol 20 µg / Desogestrel 150 µg) (57). A idade média das participantes era de 20 anos, o que comprova a ação desse medicamento sobre a massa óssea, mesmo quando utilizado anos após o estirão de crescimento.

Gai e colaboradores acompanharam um grupo de 450 adolescentes, entre 16 e 18 anos, por dois anos e não constataram diferença estatística, entre o grupo das usuárias de ACHO e o grupo-controle, na avaliação da densidade óssea da coluna lombar e fêmur proximal; observaram, no entanto, uma DMO menor, após terem estudado o grupo das usuárias do progestágeno Desogestrel, quando as compararam com as que utilizaram ACHO com Ciproterona, as quais, por sua vez, foram comparadas com as do grupo-controle (58).

No estudo de Pikkarainen e demais pesquisadores (59), que, durante quatro anos, acompanharam adolescentes de 12 a 19 anos, evidenciou-se, em decorrência do uso de ACHO, um efeito negativo sobre a massa óssea, o qual se tornou mais evidente, após dois anos de uso do medicamento.

Cibula e pesquisadores, em 2012, realizaram um estudo “*cross over*” com um grupo-controle e dois grupos de usuárias de anticoncepcionais do mesmo progestágeno e duas concentrações diferentes de Etinilestradiol (30 e 15 mcg); após nove meses, inverteram as doses de Etinilestradiol por mais nove meses. Ao final, notaram que o grupo-controle havia obtido um ganho de DMO, ao passo que os grupos de usuárias não alcançaram o mesmo resultado. Apesar da diferença de desenho entre esse estudo e os demais apresentados anteriormente, o efeito do anticoncepcional sobre o incremento de massa óssea permaneceu negativo, impedindo que as usuárias dos medicamentos não obtivessem o ganho esperado, como ocorreu com as do grupo-controle (18).

Em estudo prospectivo multicêntrico canadense, 168 adolescentes, entre 16 e 19 anos, foram acompanhadas e, após dois anos, as usuárias de contraceptivos apresentaram menor ganho de DMO que as do grupo-controle, porém sem diferença significativa. Perdas de seguimento ao longo do tempo e diferentes combinações hormonais podem justificar resultados não estatisticamente significativos (60).

Em uma revisão, Ziglar e demais autores avaliaram estudos que selecionaram adolescentes usuárias de diferentes composições hormonais, para avaliar o efeito dos contraceptivos sobre a massa óssea, e concluíram que doses menores de EE podem afetar a aquisição do pico de massa óssea (61).

Em estudo brasileiro, prospectivo, com critérios rígidos de seleção, pesquisadores constataram um menor incremento na massa óssea de adolescentes usuárias de ACHO, com EE 20 µg / Desogestrel 150 µg, após 12 meses de observação (62). Em novo projeto, o mesmo grupo de pesquisadores, verificando os resultados provenientes do acompanhamento de 61 adolescentes, que utilizaram EE 30 µg / Drospirenona 3mg, pelo período de um ano, comparativamente aos resultados de DXA e marcadores de formação obtidos das adolescentes do grupo-controle, constatou efeito negativo sobre a remodelação óssea, no período mencionado (63).

Diante dos resultados e conclusões apresentados por essa seleção de estudos, surgem vários questionamentos, um dos quais se poderia investigar se o impacto negativo nas adolescentes usuárias desses medicamentos, pelo período de 12 meses, persistiria quando utilizassem esses mesmos contraceptivos por tempo mais prolongado. Ou seria o impacto negativo ainda mais acentuado? Ou ainda, ocorreria uma estabilização na densidade mineral óssea e nos biomarcadores ósseos de adolescentes usuárias de dois medicamentos, por período de dois anos? Assim, o presente estudo foi delineado para possibilitar a elaboração de respostas aos questionamentos acima propostos e, dessa forma, continuar numa busca incessante a fim de compreender os possíveis efeitos dos anticoncepcionais hormonais orais no incremento e metabolismo ósseos de adolescentes que deles se utilizam.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar e analisar o comportamento do metabolismo ósseo de adolescentes saudáveis usuárias de duas formulações de anticoncepcional hormonal oral de baixa dosagem, durante um período de dois anos, comparando-as com adolescentes híidas não-usuárias de métodos contraceptivos.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a densidade mineral óssea mediante análise da Densitometria Óssea por atenuação de raio X de dupla energia sobre as regiões da coluna lombar, entre L1- L4, densitometria de corpo total e subtotal, de adolescentes saudáveis do sexo feminino e de um grupo de usuárias de anticoncepcionais hormonais, também híidas, no momento zero e após 24 meses.

Descrever o comportamento de marcadores ósseos de formação Osteocalcina e Fosfatase Alcalina Óssea coletados dos grupos de adolescentes selecionadas no momento zero e após 24 meses.

Comparar os resultados da densidade mineral óssea e marcadores ósseos no momento zero e após dois anos entre os grupos de adolescentes saudáveis não usuárias e usuárias de contraceptivos hormonais orais.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo longitudinal controlado não-randomizado (quase experimental) em que foram incluídas adolescentes do sexo feminino de 12 a 20 anos incompletos, saudáveis, voluntárias, que já apresentaram menarca, estadiamento de desenvolvimento puberal de Mamas M4 ou M5, de acordo com os critérios de Tanner, atendidas em ambulatórios das regiões de Assis, e avaliadas pela autora do presente estudo e, em Botucatu, as adolescentes matriculadas no ambulatório de Medicina de Adolescentes e no Ambulatório de Convênios - Adolescentes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

As pacientes às quais não estava indicado nenhum método contraceptivo, por não terem vida sexual ativa, foram direcionadas para o grupo-controle. Todos os métodos contraceptivos utilizados pelos profissionais da saúde, para essa faixa etária, foram expostos a todas as adolescentes, com indicação para uso de algum método. Aquelas que escolheram ACHO foram incluídas no estudo. Os ACHOs definidos para o estudo são combinações de EE 20 µg / Desogestrel 150 µg caracterizado como grupo ACHO 1 e EE 30µg / Drospirenona 3mg, como grupo ACHO 2.

Todas foram orientadas e estimuladas ao uso de dupla proteção para prevenção de IST mediante o uso do preservativo masculino concomitantemente ao uso do ACHO.

As adolescentes, submetidas a minuciosa anamnese, não eram tabagistas, etilistas, usuárias de drogas ou medicamentos que pudessem interferir no incremento da massa óssea, nem praticantes de modalidade esportiva extraescolar, exceto duas horas de aulas de Educação Física oferecidas na própria escola, e não apresentavam histórico prévio de uso de contraceptivos hormonais ou de gestação.

As adolescentes com histórico de prematuridade ou baixo peso ao nascimento, e as submetidas à terapia prolongada com corticóides ou que estivessem usando suplementação com cálcio e /ou ferro não foram elegíveis. Adolescentes portadoras de: *diabetes mellitus*, desnutrição aguda ou crônica, doenças ósseas congênitas ou adquiridas, doenças gastrintestinais acompanhadas de má absorção, histórico de nefropatia, com ou sem insuficiência renal crônica, endocrinopatias, puberdade precoce ou atrasada, fibrose cística, doença celíaca, ou usuárias de medicamentos que, sabidamente, afetam o metabolismo ósseo de maneira negativa, como anticonvulsivantes, anticoagulantes, antirretrovirais e antiácidos com alumínio, não foram incluídas.

Para aquelas que não compareceram no dia agendado para realizarem sua densitometria ou coleta sanguínea, foram oferecidos novos agendamentos, em dias próximos aos definidos para realização dos exames. Caso não comparecessem nas três oportunidades oferecidas, para realização dos exames, ou se, os resultados obtidos em algum dos momentos de acompanhamento prospectivo, no caso, aos 12 meses com

finalização aos 24, estivessem incompletos, as adolescentes seriam incluídas nas análises estatísticas até o momento em que permanecessem em acompanhamento.

Algumas adolescentes dos grupos de ACHO, por motivos pessoais, desistiram do uso de contraceptivos hormonais orais, passando a utilizar outros métodos de contracepção, e, assim como adolescentes do grupo-controle, também foram excluídas da coleta de exames, por necessitarem de prescrição de algum método contraceptivo, o que invalidaria sua permanência no grupo-controle.

A todas foram oferecidos os mesmos cuidados prestados às que permaneceram no acompanhamento pelo tempo proposto e, de acordo com as normas dos Serviços de Saúde que utilizavam. A todas as adolescentes foi informado o número de *Whatsapp* das pesquisadoras e, a qualquer dúvida, poderiam fazer contato ou enviar mensagens.

As adolescentes assinaram um Termo de Assentimento, quando menores de 18 anos, e seus pais ou responsáveis foram orientados a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) para autorizarem a participação na pesquisa. Aquelas com idade igual ou superior a 18 anos assinaram o TCLE.

Todas foram submetidas à consulta médica, a exames físicos gerais e exames específicos, foram-lhes coletados os dados antropométricos e feita avaliação dos caracteres sexuais secundários, através da inspeção

visual das mamas e pelos pubianos, classificados segundo os critérios de Tanner.

As adolescentes participantes do estudo eram saudáveis, tinham estatura entre o 5º e o 95º percentil para cada faixa de idade e índice de massa corporal (IMC) variando entre o 5º e 95º percentil, segundo curvas elaboradas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (2002).

Para caracterização dietética, os adolescentes registraram um diário alimentar (Anexo 2) de três dias, sendo dois dias da semana e um de final de semana, com informações sobre o consumo, preferências, recusas de alimentos e realização das principais refeições relacionadas ao Cálcio procurando possíveis fatores que pudessem interferir na biodisponibilidade desse mineral.

A idade óssea (IO) para a avaliação do grau de maturação esquelética foi solicitada a todas as adolescentes. O método escolhido foi o de Greulich & Pyle (1959) chamado de método GP, em que se faz a radiografia de mão e punho para ser posteriormente comparada com o Atlas. A interpretação foi realizada por um único avaliador habilitado (AST), mas sem saber previamente a que grupo a adolescente pertencia - cegamento do avaliador.

As adolescentes foram submetidas à avaliação da massa óssea no momento de iniciarem o uso do ACHO, após 12 e após 24 meses de seu uso, mediante um exame de densitometria óssea, em uma unidade de Densitometria Óssea por atenuação de raio X de dupla energia e com o uso

de um aparelho Hologic QDR 4500 Discovery A (Hologic Inc., Bedford, MA). Para a adequada avaliação da massa óssea, foi utilizado um *software* pediátrico e os resultados do conteúdo ósseo foram expressos em gramas (g) e os da densidade, em g/cm². Foram mensuradas as regiões da coluna lombar entre L1-L4, densitometria de corpo total e subtotal, sem o segmento da cabeça. Todas as avaliações foram realizadas por apenas um profissional habilitado (AST) que, ao realizar o exame de densitometria, não foi informado (avaliador cego) se a adolescente estava ou não usando algum ACHO. Segundo atualizadas orientações da *International Society for Clinical Densitometry* (ISCD) de 2019, os relatórios DXA contêm as seguintes informações: idade do paciente, peso e altura, história médica relevante, resultados do estágio de Tanner e da idade óssea.

Amostras de sangue foram coletadas, nos três momentos, por punção venosa e centrifugadas por 15 minutos a 1.500 g para a separação do soro; foram armazenadas a -70°C até a análise dos biomarcadores FAO e OC.

A OC foi dosada pelo método Micro Vue Osteocalcin EIA (enzyme immuno assay) kit da QUIDEL® (USA, CA, San Diego), como indicador de “turnover” ósseo. O imunoensaio é um teste de ELISA competitivo, que quantifica somente a OC intacta e não detecta fragmentos de tecido ósseo reabsorvido. Para realização desse teste utilizaram-se microplacas de 96 alvéolos previamente tratadas com Osteocalcina e, sobre esses alvéolos já tratados, foram adicionados 25µL de cada padrão reconstituído, controles

e amostras de soro dos indivíduos testados. Em seguida, adicionaram-se 125µl de anticorpo anti-Osteocalcina, com posterior incubação de 120 minutos à temperatura ambiente e lavagem da placa com 300 µL de tampão de lavagem, por três vezes. Após lavagem da placa e retirada do anticorpo anti-Osteocalcina, foi-lhe adicionada a IgG anti- camundongo conjugada com a enzima fosfatase alcalina e, com posterior incubação, por 60 minutos, à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente, conforme descrito, e adicionado o substrato com p-Nitrofenil fosfato (pNPP) para o desenvolvimento de cor, por um período de 35-40 minutos. A reação foi bloqueada com NaOH 0,5N e a leitura realizada em leitor de Elisa TP Reader, Thermo Plate, no comprimento de onda de 405 nm. As concentrações de Osteocalcina nas amostras de soro foram obtidas, usando-se a fórmula $y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$. O intervalo de concentração utilizado para o teste foi de 2 a 32 ng/mL, com limite mínimo de detecção de 0,45 ng/mL, sendo determinado por três vezes o valor do desvio, para o padrão zero. O coeficiente de variação obtido para a precisão do ensaio descrito pelo fabricante foi de 5 a 10% para o intra-assay e inter-assay.

A FAO foi dosada utilizando-se o Micro Vue BAP EIA (enzyme immuno assay) kit da QUIDEL® (USA, CA, San Diego), como indicador de atividade osteoblástica. O imunoensaio é um teste que utiliza um anticorpo monoclonal anti-FAO, como captura, e é adsorvido à superfície dos alvéolos da microplaca de 96 orifícios. Esse anticorpo monoclonal, que é adsorvido

à placa, captura a FAO presente nas amostras de soro, padrão e controles, sendo possível determinar a atividade da FAO com o substrato p-Nitrofenil fosfato (pNPP). Para isso, um volume de 125µL de tampão de ensaio foi acrescido conjuntamente à placa, seguido de 20 µL de volume de soro, controles e padrão. Após a retirada das amostras de soro, padrão e controles, a placa foi, então, lavada quatro vezes com tampão de lavagem e foram adicionados 150 µL do pNPP. O desenvolvimento de cor ocorreu dentro de um período de 30-35 minutos à temperatura ambiente, a reação foi bloqueada com NaOH 0,5N e a leitura realizada em microleitor de Elisa TP Reader, Thermo Plate, em comprimento de onda de 405 nm. As concentrações de FAO nas amostras de soro foram obtidas através da fórmula $y = A + Bx + Cx^2$. O intervalo de concentração utilizado para o teste e montagem da curva-padrão compreendeu concentrações entre 2 a 140 U/L. O limite mínimo de detecção para esse ensaio fornecido pelo fabricante era de 0,7U/L, sendo determinado por três vezes o valor do desvio para o padrão zero. O coeficiente de variação obtido para a precisão do ensaio era de 4,0 a 6,0% para o intra-assay e 5,0 a 8,0% para o inter-assay.

3.1 Cálculo amostral

Para o cálculo amostral das adolescentes a serem incluídas em cada um dos grupos propostos, desfecho DMO, considerando-se um desvio-padrão semelhante entre os grupos e igual a 2, com erros tipo I e tipo II iguais a 0,05 e 0,20, respectivamente, estimou-se uma amostra de 37 adolescentes em cada grupo, o ACHO 1, o ACHO 2 e grupo-controle. Os cálculos foram obtidos através de pré-testes e estudos prévios realizados com adolescentes sob as mesmas condições do presente estudo, admitindo-se nível de significância de 5% para o intervalo de confiança de 95%, determinados para uma distribuição normal.

3.2 Análise estatística

Iniciou-se pela verificação da homogeneidade entre os grupos. As pressuposições de homocedasticidade e normalidade foram investigadas pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. A comparação entre os três grupos estudados, nos diferentes momentos (momento basal, momento 12 meses e momento vinte e quatro (24) meses) foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Para as análises utilizou-se o SPSS v22.0

3.3 Comitê de ética em pesquisa

O presente projeto foi apresentado ao CEP, em janeiro de 2016, quando de seu envio à FAPESP sob o número CAAE: 52928416.6.0000.5411 (Anexo 3) e foi aprovada uma emenda no ano de 2018 junto à Plataforma Brasil sob o número 2.766.807 (Anexo 4) para dar continuidade à coleta de dados.

3.4 Financiamento

O projeto de pesquisa possui financiamento através de auxílio pesquisa FAPESP número 15/04040-2 e patrocínio da Unimed – Assis (Anexo 5).

4.ARTIGO CIENTÍFICO

Original Article

Bone impact after two years of low-dose oral contraceptive use during adolescence

Lilian Rodrigues Orsolini ^a, Tamara Beres Lederer Goldberg ^{a*}, Talita Costa Domingues Caldeirão ^a, Carla Cristiane da Silva ^b, Anapaula da Conceição Bisi Rizzo ^a, Talita Poli Biason ^a, Altamir Santos Teixeira ^c, Helio Rubens Carvalho Nunes ^d

^aPostgraduate Program in Tocogynecology, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, 18618-970, Brazil; E-mail addresses: lrorsolini@yahoo.com.br; tamara.goldberg@unesp.br; talita.obstetriz@hotmail.com; anapaula.rizzo@uol.com.br; talitapoli@uol.com.br; ccsilva@uenp.edu.br

^bDepartment of Physical Education, University of North Paraná, Jacarezinho, Paraná, Brazil; E-mail address: ccsilva@uenp.edu.br

^c Department of Tropical Diseases and Diagnostic Imaging, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil; E-mail address: altamirsteixeira@gmail.com

^d Statistical Consultant, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil; E-mail address: hrcn@outlook.com.br

The authors declare no conflict of interest and compliance with the journal's requirements for authorship.

*Corresponding author: Tamara B. L. Goldberg. E-mail: tamara.goldberg@unesp.br
Telephone: 55 14 3880-1467. Address: Botucatu School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Botucatu City, São Paulo State, Brazil. Zip Code:18618-970

Abbreviations

BAP, bone alkaline phosphatase; BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density; COC, combined oral contraceptives; COC1, EE/desogestrel; COC2, EE/drospirenone; CTX, carboxy-terminal telopeptide; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; EE, ethinylestradiol; PHV, peak height velocity.

Highlights

1. We evaluated the effects of hormonal contraceptives on bone markers and density in adolescents.
2. Bone mass acquisition was compromised in adolescents using hormonal contraceptives.
3. Negative impact on bone mass was more pronounced in the 30 µg EE group after 24 months.
4. All groups exhibited a reduction in the concentrations of bone formation markers.
5. Reduction in the mean concentrations of the markers was lower in the 30 µg EE group.

ABSTRACT

Objective: To evaluate bone metabolism in two groups of healthy adolescents using combined oral contraceptives (COC). Methods: A total of 168 adolescents were recruited from 2014 to 2020 in a non-randomized (quasi-experimental), controlled longitudinal study and divided into three groups. The COC1 group used 20 µg ethinylestradiol (EE)/150 µg desogestrel and the COC2 group used 30 µg EE/3 mg drospirenone over a period of two years. These groups were compared to a control group of adolescent non-COC users. The adolescents were submitted to bone densitometry by dual-energy X-ray absorptiometry and measurement of bone biomarkers (bone alkaline phosphatase and osteocalcin) at baseline and 24 months after inclusion in the study. The three groups studied were compared at the different time points (baseline and 24 months) by ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Results: Incorporation of bone mass was greater in non-users at all sites analyzed when compared to adolescents of the COC1 and COC2 groups ($p<0.05$). The three groups exhibited a reduction in the concentrations of bone formation markers, without a significant difference. The reduction in the mean concentrations of the markers was lower in the COC2 group receiving 30 µg EE compared to the control and COC1 groups. Conclusion: Bone mass acquisition was compromised in healthy adolescents using combined hormonal contraceptives when compared to controls. This negative impact was more pronounced in the group that used contraceptives containing 30 µg EE. CLINICAL TRIAL REGISTRATION: <http://www.ensaiosclnicos.gov.br>, RBR-5h9b3c. "Bone mineral density in adolescents using combined oral contraceptives".

Keywords: adolescents, bone mineral density, bone formation, bone remodeling, contraception, contraceptive agent

1.1 INTRODUCTION

Adolescence represents a period of extreme importance in the life of a human, which is characterized by intense biological and socio-psychoemotional transformations. Puberty is a landmark of this phase. In females, puberty is characterized by the acceleration of longitudinal growth, development of secondary sexual characteristics, and the occurrence of menarche. Simultaneously, there is an expressive gain in bone mass [1][2].

Bone mass acquisition begins in the embryonic phase. A significant increase is observed between Tanner pubertal stages 3 and 4 [1][3] and a plateau is reached in late puberty around 18 years of age [4][5]. About 92% of the total bone mass is attained during this period of the second decade of life [6]. The loss of this window of opportunity for increasing bone mass during adolescence has a negative impact on bone health in adulthood and old age [7]. Bone health is influenced by endogenous factors such as inherited genetic factors and exposure to sex hormones, as well as by exogenous factors such as physical activity, smoking, and medication use [4][8][9].

Adolescence is characterized by the awakening of sexuality, which often implies the onset of sexual activity and the early prescription of contraceptive methods. In many situations experienced by the adolescent, the use of hormonal contraceptives may be recommended for dysmenorrhea, irregular menstruation, polycystic ovary

1 syndrome, and acne. The prescription of contraceptives occurs at increasingly younger
2
3 ages and they are therefore not only used as a contraceptive method [10].
4

5
6 Literature data regarding the use and effect of hormonal contraceptives on bone
7
8 mass acquisition during the critical years are contradictory. Hormonal contraceptives
9
10 seem to negatively interfere with bone mass acquisition when used in adolescence
11
12 [11][12][13][14]. However, in some studies, contraceptive use apparently did not
13
14 reduce the rate of bone gain [6] or the differences observed between users and
15
16 controls were not significant to characterize this effect [15][16].
17
18

19
20 Therefore, to determine the effect of combined oral contraceptives (COC) on
21
22 bone mass in adolescents, the present study was designed to evaluate bone mineral
23
24 density and the concentrations of bone formation markers in healthy adolescent girls
25
26 who had used two low-dose COC over a period of two years and to compare the
27
28 findings with those observed in healthy adolescent girls not using contraceptive
29
30 methods.
31
32
33
34
35
36

37 **1.2 METHODS**

38
39
40
41
42

43 This was a non-randomized (quasi-experimental), controlled, longitudinal study
44
45 that included healthy adolescent girls aged 12 to 20 incomplete years, recruited from
46
47 2014 to 2020. The girls were volunteers seen on an outpatient basis and classified as
48
49 Tanner stages B4 or B5 who already had their first menstruation and who had regular
50
51 menstrual cycles.
52
53

54
55 Patients without an indication for use of a contraceptive method because they
56
57 had no active sexual life were allocated to the control group. For girls with an indication,
58
59
60
61
62
63
64
65

1 all contraceptive methods appropriate for this age group were presented by the health
2 professionals and those who chose to use COC were included in the study. The COC
3 methods defined were combinations of 20 µg ethinylestradiol (EE)/150 µg desogestrel
4
5
6
7
8 (COC1 group) and 30 µg EE/3 mg drospirenone (COC2 group).
9

10 All participants were advised and encouraged to use dual protection (male
11 condom concomitantly with the contraceptive method) in order to prevent sexually
12 transmitted infections. The adolescents were submitted to thorough anamnesis. All of
13 them were healthy, were non-smokers and non-alcohol drinkers, and did not use illicit
14 drugs or medications such as anticonvulsants, anticoagulants, antiretroviral agents,
15 antacids containing aluminum, corticosteroids, or calcium or iron supplements that
16 could interfere with bone mass gain. They did not practice sports outside the school
17 and the participation in school sports did not exceed 2 h per week. Adolescents with
18 chronic renal, gastrointestinal or endocrine diseases such as diabetes mellitus, early
19 or late puberty or polycystic ovary syndromes and those with a history of oral
20 contraceptives use or pregnancy were not eligible.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 The adolescents and their legal representative signed the free informed consent
38 form for authorization and participation in the study. The project was submitted to the
39 Research Ethics Committee of the Botucatu School of Medicine, São Paulo, Brazil
40 (ethical clearance certificate number 52928416.6.0000.5411) and an amendment was
41 approved by Plataforma Brasil under number 2.766.807.
42
43
44
45
46
47
48
49

50 All adolescents underwent a medical consultation and general and specific
51 physical examination. Anthropometric data were collected and secondary sexual
52 characteristics were evaluated by visual inspection of the breasts and pubic hair and
53 classified according to the criteria of Tanner [2]. The adolescents participating in the
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 study were healthy and had a height and body mass index (BMI) between the 5th and
2
3 95th percentile for each age group according to the Centers for Disease Control and
4
5 Prevention growth charts [17].
6

7
8 Bone age for evaluation of the degree of skeletal maturation was obtained from
9
10 all adolescents using the method of Greulich & Pyle [18]. The data were interpreted by
11
12 a single trained evaluator who was unaware to which group the adolescent belonged
13
14 (evaluator blinding).
15
16

17
18 Bone mineral density (BMD) was evaluated in all adolescents (controls and
19
20 COC users) at the time of inclusion in the study and after 12 and 24 months of follow-
21
22 up by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) using a Hologic QDR 4500 Discovery
23
24 A densitometer (Hologic Inc., Bedford, MA). Lumbar spine (L1-L4) and total and
25
26 subtotal (without head segment) BMD measurements were obtained [19]. All
27
28 assessments were performed by a trained professional, who was unaware whether or
29
30 not the adolescent used some COC (evaluator blinding). The results obtained after 12
31
32 months will not be reported in the present study.
33
34
35
36

37
38 Blood samples were collected by venipuncture and centrifuged for 15 min at
39
40 1,500 *g* for the separation of serum. The samples were stored at -70°C until the time
41
42 of analysis of the biomarkers [bone alkaline phosphatase (BAP) and osteocalcin].
43
44 Osteocalcin and BAP were measured using the MicroVue Enzyme Immunoassay (EIA)
45
46 (Quidel®, San Diego, CA, USA). This immunoassay is a competitive ELISA test that
47
48 quantifies only intact osteocalcin (ng/mL) as an indicator of bone turnover and does
49
50 not detect fragments of reabsorbed bone tissue. The intra- and interassay coefficients
51
52 of variation obtained as a measure of precision of the assay ranged from 5 to 10%, as
53
54 recommended by the manufacturer. For BAP, expressed in U/L, the intra-assay
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

coefficient of variation ranged from 4 to 6% and the interassay coefficient of variation ranged from 5 to 8%.

All adolescents were evaluated at intervals of 3 months during the proposed follow-up period of two years. On this occasion, the continuity of use of the prescribed COC was analyzed, as well as the permanence of the adolescent in the study according to the strict criteria proposed for their inclusion. In the case of adolescents who did not appear on the scheduled day for densitometry or blood collection, new appointments were offered close to the days defined for the examinations. If the adolescents did not show up on any of the three scheduled days for the examinations at each proposed time point, or if the results obtained at 12 or 24 months were incomplete, the adolescent was included in the statistical analyses up to her participation in the follow-up. The same care was provided to all adolescents who continued in the follow-up for the proposed period according to the guidelines of the health services they attended.

1.2.1 Statistical Analysis

First, the homogeneity of the groups was verified. The assumptions of homoscedasticity and normality were tested using the Levene and Shapiro-Wilk tests, respectively. Comparison between the three groups studied at the different time points (baseline, 12 months, and 24 months) was performed by ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Based on the summary of the results obtained, the comparisons had a test power above 80% assuming a simple random sampling, 0.05 type I error, 20% type II error, probabilistic normality of the outcomes, absence of

1 confounding factors, and a 1:1 allocation ratio. Statistical differences were considered
2
3 significant when $p < 0.05$. The SPSS v22.0 program was used for the analyses.
4
5
6
7

8 **1.3 RESULTS**

9

10
11
12
13 A total of 168 adolescents were included. Twelve of the 31 adolescents of the
14 control group were excluded due to different personal reasons. Twenty-three of the 55
15 adolescents included in the COC1 group and 34 of the 82 included in the COC2 group
16 completed two years of COC use (Figure 1).
17
18
19
20
21
22

23 At baseline, no significant differences in chronological age, bone age, or lumbar
24 spine or subtotal body densitometric values were observed between the three groups.
25
26 The mean age was 15.26 years in the control group, 15.80 years in the COC1 group,
27 and 15.78 years in the COC2 group ($p = 0.294$) (Table 1).
28
29
30
31
32

33 Regarding the anthropometric data, users of EE/drospirenone (COC2) were in
34 the 62nd percentile for BMI, a value slightly higher than that observed for users of
35 EE/desogestrel (COC1) (54.1th percentile). Both groups were situated in higher
36 percentiles than controls (53.3th percentile) but the difference was not statistically
37 significant ($p = 0.065$). Analysis of the densitometric measurements showed similar
38 lumbar spine bone mineral content (BMC) and BMD in the three groups ($p = 0.119$ and
39 $p = 0.133$, respectively). The three groups were also homogenous in terms of subtotal
40 BMD and BMC ($p = 0.063$ and $p = 0.305$, respectively) (Table 1).
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 With respect to bone markers at baseline, there was no difference in BAP
53 concentrations between the three groups (control: 44.49 ± 22.10 U/L; COC1: $49.21 \pm$
54 25.96 U/L, and COC2: 41.58 ± 16.15 U/L) ($p = 0.172$). In contrast, osteocalcin
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 concentrations were significantly higher ($p<0.05$) in non-users at baseline ($15.69 \pm$
2
3 7.69 ng/mL) when compared to COC users (COC1: 9.94 ± 6.03 ng/mL and COC2:
4
5 10.41 ± 6.26 ng/mL).
6
7

8 After two years of follow-up, the groups did not differ significantly in terms of
9
10 bone age or anthropometric data. An average bone mass gain in all segments was
11
12 observed in the control group, with a gain of 4.85 g in lumbar BMC and of 0.051 g/cm²
13
14 in lumbar BMD. Different results were obtained for the COC2 group, with a reduction
15
16 of 0.012 g/cm² in lumbar BMD and of 0.43 g in lumbar BMC ($p=0.001$). An increase in
17
18 the lumbar spine densitometric parameters was observed among users of
19
20 EE/desogestrel (COC1) but this increase was lower than that detected in adolescents
21
22 of the control group (2.15 g in lumbar BMC and 0.019 g/cm² in lumbar BMD; $p=0.258$
23
24 and $p=0.342$, respectively). Analysis of total body BMD and BMC after 24 months
25
26 showed an increase in the control group but not in the groups of COC users ($p<0.05$).
27
28 Subtotal BMC decreased in the COC2 group after 24 months (reduction of 1.47 g),
29
30 while the control group exhibited an increase of 100.83 g and the COC1 group of 21.56
31
32 g over the same follow-up period ($p=0.005$) (Table 3).
33
34
35
36
37
38
39

40 With respect to bone markers (BAP and osteocalcin), there was a similar
41
42 significant decrease in the three groups studied, with no significant difference in BAP
43
44 ($p=0.686$) or osteocalcin ($p=0.909$) over the follow-up period of 24 months (Table 3).
45
46
47
48
49

50 **1.4 DISCUSSION**

51
52
53
54

55 The present study demonstrated significant differences in the evolution of
56
57 densitometric parameters between healthy adolescent non-COC users and the two
58
59
60
61
62
63
64
65

groups of COC users over the same two-year follow-up period. In contrast to adolescents of the COC1 and COC2 groups, those of the control group exhibited an increase in BMD and BMC at all sites analyzed (lumbar, subtotal and total body). In particular, a reduction in lumbar BMC and BMD was observed in the COC2 group. These results indicate that adolescent COC users do not exhibit the same bone mass acquisition during a period of life that is considered extremely important for bone growth, compromising the window of opportunity and possibly resulting in irreversible damage in future years [3].

A Canadian prospective multicenter study conducted by Brajic et al. included young adults and adolescents. Despite its multicenter design, the final sample did not differ from the number of adolescents included in the current study (168 adolescents). The participants were followed up for two years and COC users showed lower BMD gain than controls, but the difference was not significant. Adolescents of the control group exhibited a gain of 0.004 g/cm² in lumbar BMD, while a loss of 0.007 g/cm² was observed among COC users. Losses to follow-up over time and different combinations and doses of the hormonal components may explain the nonsignificant and less relevant results compared to those observed in our study [16].

The results of the present study corroborate data of a recent systematic review with meta-analysis [20] regarding the lumbar site. Data referring to the total body segment were not analyzed in that review because of the heterogeneity of the few published studies [21][22].

The present study demonstrated a reduction in lumbar BMD of 0.01 g/cm² in the COC2 group. This result was statistically significant ($p < 0.05$) compared to the control group that exhibited an increase of 0.05 g/cm² at this site. These results corroborate

1 those reported in a systematic review with meta-analysis conducted by Goshtasebi et
2
3 al. [20]. The authors concluded that the use of COC by adolescents for one and two
4
5 years has a negative influence on bone mass. The results of the meta-analysis showed
6
7 a reduction of 0.02 g/cm² in lumbar BMD after both one year and two years of
8
9 medication use. This meta-analysis included five studies classified as good quality,
10
11 although the authors highlighted the difficulties faced by various investigators in
12
13 following up adolescents using contraceptive methods for a long period. An important
14
15 heterogeneity of the studies was the control group that was initially younger than the
16
17 users [21] or the fact that young adults and adolescents who had previously used COC
18
19 were not excluded from the analysis of the results [22], which certainly influenced the
20
21 odds ratio of the meta-analysis.
22
23
24
25
26

27
28 A significant increase in total body bone mass was observed in the control group
29
30 compared to the lower-than-expected changes in the groups of COC users (Table 3).
31
32 Lloyd et al. [8] followed up adolescents aged 12 to 20 years over a period of 7 years
33
34 and did not observe the same negative effect on bone mass. Despite the long follow-
35
36 up period, the study had some limitations that were related to the small number of
37
38 adolescents comprising the sample, differences in physical activity between groups
39
40 since users of contraceptives exercised more than controls, and the age of onset of
41
42 contraceptive use and dose. Thus, these confounders may explain the lack of
43
44 differences in BMD in that study.
45
46
47
48
49

50 Although unlike the present study, Gai et al. [15] found no significant differences
51
52 in lumbar BMD between COC users and controls after two years of follow-up. BMD
53
54 was lower among users compared to controls. The mean age of the groups was 17
55
56 years, an age more distant from menarche and peak height velocity (PHV), while the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 mean age in the present study was 15.8 years, a fact that may have influenced the
2
3 results regarding bone mass acquisition [15] since peak bone mass gain is known to
4
5 occur on average 7 months after PHV [23][24].
6
7

8 In a study that also evaluated bone mass, Polatti et al. [25] demonstrated a gain
9
10 of 7.8% among non-users of contraceptives during the five-year observation period
11
12 and found no significant change in BMD in the group using COC (20 µg EE/150 µg
13
14 desogestrel). The mean age of the participants was 20 years. The results indicate
15
16 persistence of the effect of this drug on bone mass even when used years after the
17
18 growth spurt.
19
20
21

22 It should be noted that our study design is based on strict inclusion criteria for
23
24 all adolescents of the sample. This fact can increase the risk of loss to follow-up over
25
26 a long observation period, in this case 24 months, which was observed in the three
27
28 groups studied, especially among COC users. The CHOICE study [26] highlights that
29
30 only 46.7% of adolescents aged 14 to 19 years continue to use hormonal
31
32 contraceptives for more than 6 to 12 months. Adherence to the method may even be
33
34 less than 32.7% within one year of follow-up despite instructions and reinforcement
35
36 regarding their importance given by physicians [27]. Considering factors such as
37
38 personal decisions, interruption of sexual activity or side effects of contraceptives that
39
40 interfere with the discontinuation of the chosen and prescribed method, it is noteworthy
41
42 that in the present study more than 70% of adolescents continued in the groups after
43
44 12 months of follow-up (Figure 1).
45
46
47
48
49
50
51

52 It should be highlighted that there were no significant differences in the mean
53
54 baseline values of each variable analyzed between adolescents who remained in the
55
56 study during the 24-month follow-up and those who were excluded or lost to follow-up
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(Table 4). This fact reinforces the results obtained despite a high percentage of losses in the groups after 24 months of follow-up, ruling out interference or bias in the results (Table 4 and Figure 1).

Assessment of BMD is a static parameter and does therefore not reflect dynamic changes in bone tissue that are occurring at the time of measurement or shortly before. Bone resorption and formation are intimately linked processes in bone remodeling and estrogen is an important regulator of both processes [28][29]. Progesterone exerts an osteoanabolic effect, stimulating bone formation in women with normal estrogen levels [30]. Both estradiol and EE act on estrogen receptors through the same biological mechanisms and EE has been recognized to exert a more potent effect on target tissues [31]. However, little is known about the molecular mechanisms of synthetic hormones, either progestogens or estrogens, involved in bone remodeling.

Callegari et al. [32] evaluated young women aged 16 to 25 years and identified the influence of contraceptives on markers of bone formation (P1NP) and resorption (carboxy-terminal telopeptide, CTX), whose concentrations were 22% lower than those observed in non-users of hormonal contraceptives. A literature review conducted by Herrmann et al. [33] supports the above findings; however, most of the included articles did not exclusively analyze adolescents. Despite this observation, the authors were unable to provide evidence of the influence of these findings on the fracture risk in adolescent girls. In contrast, Lattakova et al. [6] did not detect the same impact of COC use on markers of bone formation (osteocalcin) and resorption (CTX) over a period of one year. In a recent study, Almstedt et al. [34] demonstrated elevated bone turnover

1 in adolescents aged 19 to 20 years using COC, with a more pronounced impact if
2
3 contraceptive use was initiated early after menarche.
4

5
6 Studies investigating bone markers in adolescence related to the use of
7
8 contraceptives are still scarce in the scientific literature. Within this context, the results
9
10 of the present study intend to contribute to the understanding of bone turnover in these
11
12 adolescent users. The concentrations of the bone markers (BAP and osteocalcin)
13
14 decreased in the three groups but no statistically significant differences were found
15
16 (p=0.686 and p=0.909, respectively); however, the reduction in the mean
17
18 concentrations of the markers was lower in the COC2 group receiving 30 µg EE
19
20 compared to the control and COC1 groups. Furthermore, mean osteocalcin
21
22 concentrations after 24 months differed between the COC1 (50% lower) and control
23
24 groups, but no significant difference was found compared to the COC2 group. The
25
26 control group exhibited higher osteocalcin concentrations than COC users at baseline
27
28 (approximately 36% higher compared to COC1 and 30% higher compared to COC2).
29
30 The higher concentrations of bone formation markers at baseline observed in the
31
32 control group (Table 1) may be explained by the fact that these adolescents were 6
33
34 months younger than COC users (mean age of 15.26 years), although the differences
35
36 were not significant. Studies involving healthy adolescents revealed higher
37
38 concentrations of bone formation markers between 12 and 13 years of age and an
39
40 important reduction in these concentrations after 16 years, followed by a substantial
41
42 decline until the end of adolescence [1][3].
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 It should be noted that blood collection in the control group was not performed
53
54 systematically during the same phase of the menstrual cycle at baseline and after 12
55
56 and 24 months. There is no consensus in the literature regarding the influence of the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 phases of the menstrual cycle on bone markers [35]. Furthermore, regular intervals of
2
3 25 to 35 days are not predictors of ovulation during the period of adolescence,
4
5 emphasizing that adolescents closer to menarche may have anovulatory cycles,
6
7 especially in the first two years [36][37].
8
9

10 Rome et al. [38] evaluated a cohort of adolescent users of oral and injectable
11
12 contraceptives over 12 months compared to a control group. Serum BAP and urinary
13
14 deoxypyridinoline levels were higher in the non-user group; however, the mean age of
15
16 this group was one year less than that of users of contraceptives, a fact impairing any
17
18 conclusion regarding the effect of these drugs on bone metabolism.
19
20
21
22

23 The current discussion is centered around the question is whether a reduction
24
25 in the estrogenic component of oral contraceptives would have a negative impact on
26
27 the bone health of adolescents, including reduced bone metabolism, since some
28
29 studies point to a not yet defined ideal/physiological concentration of endogenous
30
31 estrogen (window of action) that would exert an optimal effect on bone remodeling and
32
33 peak bone mass [39]. However, there is consensus among specialists regarding the
34
35 prescription of COC that are composed of increasingly lower doses of EE in order to
36
37 reduce thromboembolic complications [40]. Although challenging, studies involving
38
39 adolescents who receive different options of available contraceptive methods,
40
41 including long-acting reversible contraceptives, are necessary to identify the most
42
43 appropriate oral contraceptive composition and to clarify doubts about the deleterious
44
45 effects on bone health.
46
47
48
49
50

51 In conclusion, bone mass acquisition was compromised in healthy adolescents
52
53 using combined hormonal contraceptives for two years when compared to controls.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

This negative impact was more pronounced in the group that used contraceptives containing 30 µg EE.

Acknowledgements: The authors thank Prof. Cilmary Suemi Kurokawa and the technicians Maria Regina Moretto (MSc) and Marcia Tenorio Delneri (MSc) of the Center for Pediatric and Experimental Research, Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista.

Funding: This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Grants 2007/07731-0, 2011/05991-0, and 2015/04040-2) and Pro-Rector for Research at UNESP and UNIMED ASSIS. The Funding had no involvement in the study design, collection, interpretation of data or writing of the report.

REFERENCES

- [1] D. Yilmaz, B. Ersoy, E. Bilgin, G. Gümüşer, E. Onur, E.D. Pinar, Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers, and growth parameters, *J. Bone Miner. Metab.* 23 (2005) 476–482. <https://doi.org/10.1007/s00774-005-0631-6>.
- [2] W.A. Marshall, J.M. Tanner, Variations in Pattern of Pubertal Changes in Girls, *Arch. Dis. Childh.* 44 (1969) 291–303.
- [3] C.M.T. Fortes, T.B.L. Goldberg, C.S. Kurokawa, C.C. Silva, M.R. Moretto, T.P. BIASON, A.S. Teixeira, H.R. de Carvalho Nunes, Relationship between chronological and bone ages and pubertal stage of breasts with bone biomarkers and bone mineral

- density in adolescents, *J. Pediatr. (Rio. J)*. 90 (2014) 624–631.
<https://doi.org/10.1016/j.jped.2014.04.008>.
- [4] K.L. Troy, M.E. Mancuso, T.A. Butler, J.E. Johnson, Exercise Early and Often: Effects of Physical Activity and Exercise on Women’s Bone Health., *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15 (2018) 878. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050878>.
- [5] L. Raisz, Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling., *Clin. Chemistry*. 45 (1999) 1353–1358.
- [6] M. Lattakova, M. Borovsky, J. Payer, Z. Killinger, Oral contraception usage in relation to bone mineral density and bone turnover in adolescent girls., *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care*. 14 (2009) 207–14. <https://doi.org/10.1080/13625180902838828>.
- [7] V. Matkovic, T. Jelic, G.M. Wardlaw, J.Z. Ilich, P.K. Goel, J.K. Wright, M.B. Andon, K.T. Smith, R.P. Heaney, Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model., *J. Clin. Invest*. 93 (1994) 799–808. <https://doi.org/10.1172/JCI117034>.
- [8] T. Lloyd, D.S. Taylor, H.M. Lin, A.E. Matthews, D.F. Eggi, R.S. Legro, Oral contraceptive use by teenage women does not affect peak bone mass : a longitudinal study, *Fertil. Steril*. 74 (2000) 734–8. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00719-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00719-6).
- [9] T. Hosoi, Genetic aspects of osteoporosis., *J. Bone Miner. Metab*. 28 (2010) 601–7. <https://doi.org/10.1007/s00774-010-0217-9>.
- [10] J.C. Prior, Adolescents’ Use of Combined Hormonal Contraceptives for Menstrual Cycle – Related Problem Treatment and Contraception: Evidence of Potential Lifelong Negative Reproductive and Bone Effects, *Women’s Reprod. Heal*. 3 (2016) 73–92. <https://doi.org/10.1080/23293691.2016.1196080>.
- [11] D. Cibula, J. Skrenkova, M. Hill, J.J. Stepan, Low-dose estrogen combined oral

- contraceptives may negatively influence physiological bone mineral density acquisition during adolescence, *Eur. J. Endocrinol.* 166 (2012) 1003–1011.
<https://doi.org/10.1530/EJE-11-1047>.
- [12] S.A. Jackowski, A.D.G. Baxter-Jones, A.J. McLardy, R.A. Pierson, C.D. Rodgers, The associations of exposure to combined hormonal contraceptive use on bone mineral content and areal bone mineral density accrual from adolescence to young adulthood: A longitudinal study, *Bone Reports.* 5 (2015) e333–e341.
<https://doi.org/10.1016/j.bonr.2015.06.001>.
- [13] E. Pikkarainen, M. Lehtonen-Veromaa, T. Möttönen, H. Kautiainen, J. Viikari, Estrogen-progestin contraceptive use during adolescence prevents bone mass acquisition: a 4-year follow-up study, *Contraception.* 78 (2008) 226–231.
<https://doi.org/10.1016/j.contraception.2008.05.002>.
- [14] A. da C.B. Rizzo, T.B.L. Goldberg, T.P. Biazon, C.S. Kurokawa, C.C. da Silva, J.E. Corrente, H.R.C. Nunes, One-year adolescent bone mineral density and bone formation marker changes through the use or lack of use of combined hormonal contraceptives., *J. Pediatr. (Rio. J).* 95 (2018) 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2018.05.011>.
- [15] L. Gai, Y. Jia, M. Zhang, P. Gai, S. Wang, H. Shi, X. Yu, Y. Liu, Effect of two kinds of different combined oral contraceptives use on bone mineral density in adolescent women, *Contraception.* 86 (2012) 332–336.
<https://doi.org/10.1016/j.contraception.2012.01.009>.
- [16] T.S. Brajic, C. Berger, K. Schlammerl, H. Macdonald, S. Kalyan, D.A. Hanley, J.D. Adachi, C.S. Kovacs, J.C. Prior, CaMos Research Group, Combined hormonal contraceptives use and bone mineral density changes in adolescent and young women in a prospective population-based Canada-wide observational study., *J. Musculoskelet.*

- Neuronal Interact. 18 (2018) 227–236.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29855445>.
- [17] R. Kuczmarski, C. Ogden, S. Guo, 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development., *Natl. Cent. Heal. Stat. Vital Heal. Stat.* 11 (2002).
- [18] P.S. Dahlberg, A. Mosdøl, Y. Ding, Ø. Bleka, V. Rolseth, G.H. Straumann, M. Skjerven-Martinsen, G.J.M. Delaveris, G.E. Vist, A systematic review of the agreement between chronological age and skeletal age based on the Greulich and Pyle atlas., *Eur. Radiol.* 29 (2019) 2936–2948. <https://doi.org/10.1007/s00330-018-5718-2>.
- [19] C.R. Shuhart, S.S. Yeap, P.A. Anderson, L.G. Jankowski, E.M. Lewiecki, L.R. Morse, H.N. Rosen, D.R. Weber, B.S. Zemel, J.A. Shepherd, Executive Summary of the 2019 ISCD Position Development Conference on Monitoring Treatment, DXA Cross-calibration and Least Significant Change, Spinal Cord Injury, Peri-prosthetic and Orthopedic Bone Health, Transgender Medicine, and Pediatrics., *J. Clin. Densitom.* 22 (2019) 453–471. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2019.07.001>.
- [20] A. Goshtasebi, T. S. Brajic, D. Scholes, T. B. L. Goldberg, A. Berenson, J.C. Prior, Adolescent use of combined hormonal contraception and peak bone mineral density accrual: A meta-analysis of international prospective controlled studies., *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 90 (2019) 517–524. <https://doi.org/10.1111/cen.13932>.
- [21] B.A. Cromer, A.E. Bonny, M. Stager, R. Lazebnik, E. Rome, J. Ziegler, K. Camlin-Shingler, M. Secic, Bone mineral density in adolescent females using injectable or oral contraceptives: a 24-month prospective study., *Fertil. Steril.* 90 (2008) 2060–7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.070>.
- [22] A.B. Berenson, M. Rahman, C.R. Breitkopf, L.X. Bi, Effects of Depot Medroxyprogesterone Acetate and 20 µg Oral Contraceptives on Bone Mineral

- Density, *Obstet. Gynecol.* 112 (2008) 788–799.
<https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181875b78>.
- [23] A.D.G. Baxter-Jones, R.A. Faulkner, M.R. Forwood, R.L. Mirwald, D.A. Bailey, Bone mineral accrual from 8 to 30 years of age: An estimation of peak bone mass, *J. Bone Miner. Res.* 26 (2011) 1729–1739. <https://doi.org/10.1002/jbmr.412>.
- [24] C.M. Weaver, C.M. Gordon, K.F. Janz, H.J. Kalkwarf, J.M. Lappe, R. Lewis, M. O’Karma, T.C. Wallace, B.S. Zemel, The National Osteoporosis Foundation’s position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations, *Osteoporos. Int.* 27 (2016) 1281–1386.
<https://doi.org/10.1007/s00198-015-3440-3>.
- [25] F. Polatti, F. Perotti, N. Filippa, D. Gallina, R. Nappi, Bone mass and long-term monophasic oral contraceptive treatment in young women., *Contraception.* 51 (1995) 221–4.
- [26] J.R. Rosenstock, J.F. Peipert, T. Madden, Q. Zhao, G.M. Secura, Continuation of reversible contraception in teenagers and young women., *Obstet. Gynecol.* 120 (2012) 1298–305. <https://doi.org/10.1097/aog.0b013e31827499bd>.
- [27] T.R. Raine, A. Foster-Rosales, U.D. Upadhyay, C.B. Boyer, B.A. Brown, A. Sokoloff, C.C. Harper, One-Year Contraceptive Continuation and Pregnancy in Adolescent Girls and Women Initiating Hormonal Contraceptives, *Obstet. Gynecol.* 117 (2011) 363–371. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31820563d3>.
- [28] S. Khosla, D.G. Monroe, Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8 (2018) a031211. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031211>.
- [29] P. Hadji, E. Colli, P. A. Regidor, Bone health in estrogen-free contraception., *Osteoporos. Int.* 30 (2019) 2391–2400. <https://doi.org/10.1007/s00198-019-05103-6>.

- [30] V. Seifert-Klauss, J.C. Prior, Progesterone and Bone: Actions Promoting Bone Health in Women, *J. Osteoporos.* (2010) 1–18. <https://doi.org/10.4061/2010/845180>.
- [31] F.Z. Stanczyk, D.F. Archer, B.R. Bhavnani, Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment, *Contraception.* 87 (2013) 706–727. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2012.12.011>.
- [32] E.T. Callegari, S.M. Garland, A. Gorelik, C.Y. Chiang, J.D. Wark, Bone turnover marker determinants in young women: results from the Safe-D study, *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* 55 (2018) 328–340. <https://doi.org/10.1177/0004563217719734>.
- [33] M. Herrmann, M.J. Seibel, The effects of hormonal contraceptives on bone turnover markers and bone health, *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 72 (2010) 571–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03688.x>.
- [34] H.C. Almstedt, M.M. Cook, L.F. Bramble, D. V Dabir, J.W. LaBrie, Oral contraceptive use, bone mineral density, and bone turnover markers over 12 months in college-aged females., *J. Bone Miner. Metab.* 38 (2020) 544–554. <https://doi.org/10.1007/s00774-019-01081-1>.
- [35] G. Lombardi, M. Barbaro, M. Locatelli, G. Banfi, Novel bone metabolism-associated hormones: the importance of the pre-analytical phase for understanding their physiological roles, *Endocrine.* 56 (2017) 460–484. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1239-z>.
- [36] L.J. Carlson, N.D. Shaw, Development of Ovulatory Menstrual Cycles in Adolescent Girls, *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 32 (2019) 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.jpog.2019.02.119>.

- [37] D. Li, C.L. Hitchcock, S.I. Barr, T. Yu, J.C. Prior, Negative Spinal Bone Mineral Density Changes and Subclinical Ovulatory Disturbances—Prospective Data in Healthy Premenopausal Women With Regular Menstrual Cycles, *Epidemiol. Rev.* 36 (2014) 137–147. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxt012>.
- [38] E. Rome, J. Ziegler, M. Secic, A. Bonny, M. Stager, R. Lazebnik, B.A. Cromer, Bone biochemical markers in adolescent girls using either depot medroxyprogesterone acetate or an oral contraceptive., *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 17 (2004) 373–7. <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2004.09.013>.
- [39] C. Bastianelli, M. Farris, E. Rosato, I. Brosens, G. Benagiano, Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives: 1. Effects on metabolism, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 10 (2017) 315–326. <https://doi.org/10.1080/17512433.2017.1271708>.
- [40] H. Agostino, G. Di Meglio, Low-dose Oral Contraceptives in Adolescents: How Low Can You Go?, *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 23 (2010) 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2009.11.001>.

Table 1. Comparison of anthropometric and densitometric variables and bone formation markers at baseline between adolescents receiving low-dose oral contraceptives and the control group

	Controls (n=31)				COC1 (n=55)				COC2 (n=82)				P
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	
Age (years)	15.3	1.9	12.1	19.9	15.8	1.8	12	20.2	15.8	1.5	12.4	18.8	0.294
Bone age (years)	15.76	1.75	12.50	18.00	16.17	1.32	13.50	18.00	16.50	1.12	14.00	19.00	0.056
Weight (kg)	53.87	8.61	41.00	71.00	53.38	7.85	39.00	73.40	55.68	8.03	38.50	72.20	0.228
Height (cm)	160.91	5.33	152.00	173.00	159.16	5.79	148.50	171.00	159.04	6.36	140.00	172.00	0.309
BMI (kg/m ²)	20.70 ^a	2.76	16.22	27.39	20.99 ^a	2.58	16.63	26.78	21.99 ^b	2.73	15.82	29.40	0.028
Z-score for BMI	0.1	0.7	-1.3	1.4	0.1	0.8	-1.6	1.3	0.4	0.7	-1.4	1.7	0.064
BMI (percentile)	53.34	24.69	9.18	92.21	54.14	25.88	5.16	89.78	62.78	23.54	8.18	93.90	0.065
Lumbar BMD (g/cm ²)	0.902	0.090	0.758	1.100	0.955	0.155	0.701	1.790	0.951	0.114	0.705	1.242	0.133
Lumbar BMC (g)	47.20	8.71	31.38	71.63	50.71	8.26	36.99	74.55	50.80	8.68	34.61	79.39	0.119
Z-score for lumbar	-0.3	0.8	-2.0	1.4	-0.2	1.0	-2.5	1.9	-0.2	1.1	-2.8	2.4	0.786
Total body BMD (g/cm ²)	1.138 ^a	0.081	0.971	1.318	0.995 ^b	0.079	0.818	1.295	1.015 ^b	0.076	0.839	1.240	0.000
Total body BMC (g)	1,973.27 ^a	290.59	1,456.02	2,754.08	1,806.94 ^b	235.21	1,291.25	2,456.11	1,835.79 ^b	253.12	1,240.79	2,719.86	0.015
Z-score for total body	1.5 ^a	1.0	-0.5	3.7	-0.7 ^b	1.2	-2.9	4.2	-0.5 ^b	1.0	-2.7	1.8	0.000
Subtotal BMD (g/cm ²)	0.905	0.062	0.776	1.039	0.870	0.063	0.726	1.033	0.893	0.073	0.741	1.161	0.063
Subtotal BMC (g)	1,339.08	227.51	891.25	1,987.54	1,388.21	188.34	945.38	1,995.15	1,408.52	214.40	946.64	2,254.86	0.305
Fat mass (g)	17,678.23 ^{ab}	4,244.21	10,457.60	27,394.30	16,178.48 ^a	5,522.44	7,740.60	36,443.70	18,524.59 ^b	4,782.49	10,151.70	30,170.80	0.048
Lean mass (g)	34,188.92	5,174.28	25,354.90	44,072.20	36,878.76	4,394.60	29,294.40	48,669.10	35,846.29	6,344.27	2,659.79	51,819.50	0.127
Total body fat (%)	32.69 ^a	4.49	23.90	40.90	28.56 ^b	5.01	20.00	38.50	32.33 ^a	5.00	19.60	41.40	0.000
BAP (U/L)	44.49	22.10	13.29	99.08	49.21	25.96	15.56	131.98	41.58	16.15	19.31	103.40	0.172
Osteocalcin (ng/mL)	15.69 ^a	7.69	3.85	36.19	9.94 ^b	6.03	1.71	25.10	10.41 ^b	6.26	0.27	24.35	0.000

Note: Controls: adolescents who did not use oral contraceptives.

COC1: adolescents receiving an oral contraceptive containing 20 µg EE/150 µg desogestrel.

COC2: adolescents receiving an oral contraceptive containing 30 µg EE/3 mg drospirenone.

BMI: Bone mass index

BMD: Bone mineral density

BMC: Bone mineral content

BAP: Bone alkaline phosphatase

ANOVA for comparison of means between the three groups.

Different lowercase letters indicate significant differences between the three groups (p<0.05). Bonferroni test for multiple comparisons between the three groups.

Table 2. Comparison of anthropometric and densitometric variables and bone formation markers after 24 months between adolescents receiving low-dose oral contraceptives and the control group

	Controls (n=19)				COC1 (n=23)				COC2 (n=34)				
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	P
Age (years)	17.35	2.00	14.08	21.80	18.04	2.00	14.08	21.80	17.6	1.49	14.50	20.25	0.358
Bone age (years)	17.11	0.94	15.00	18.00	17.50	1.07	15.00	18.00	17.22	0.88	15.00	18.00	0.610
Weight (kg)	59.14	9.44	45.00	77.00	56.30	10.53	40.10	90.00	56.89	8.47	42.00	72.50	0.588
Height (cm)	161.95	4.94	154.00	173.00	160.33	6.26	151.00	173.00	159.69	7.47	140.00	173.00	0.481
BMI (kg/m ²)	22.47	3.05	18.29	29.33	21.76	3.47	16.91	31.89	22.13	2.81	17.80	30.17	0.756
Z-score for BMI	0.44	0.66	-0.71	1.51	-0.03	0.92	-2.18	1.77	0.20	0.65	-1.25	1.42	0.154
BMI (percentile)	64.43	22.24	23.89	93.44	49.72	27.38	1.45	96.20	57.15	21.98	10.56	92.21	0.169
Lumbar BMD (g/cm ²)	0.950	0.070	0.826	1.082	0.932	0.083	0.798	1.115	0.932	0.111	0.670	1.129	0.790
Lumbar BMC (g)	52.31	8.31	39.37	73.57	50.64	7.89	41.02	71.25	50.24	8.30	33.90	69.34	0.683
Z-score for lumbar	-0.4	0.7	-1.2	1.1	-0.7	0.9	-2.1	1.1	-0.7	1.1	-3.1	1.2	0.494
Total body BMD (g/cm ²)	1.225 ^a	0.081	1.093	1.353	0.980 ^b	0.044	0.887	1.066	1.031 ^c	0.073	0.910	1.211	< 0.001
Total body BMC (g)	2,276.84 ^a	245.26	1,929.26	2,876.67	1,792.57 ^b	188.81	1,371.15	2,153.10	1,829.13 ^b	255.50	1,315.83	2,402.63	0.000
Z-score for total body	2.0 ^a	1.1	0.1	4.5	-1.4 ^b	0.6	-2.3	-0.4	-0.8 ^b	1.0	-3.0	1.3	0.000
Subtotal BMD (g/cm ²)	0.937 ^a	0.051	0.864	1.064	0.849 ^b	0.039	0.739	0.900	0.898 ^c	0.061	0.758	1.022	0.000
Subtotal BMC (g)	1,467.10	181.33	1,134.25	1,944.02	1,372.95	177.97	962.47	1,750.25	1,382.38	200.73	984.33	1,792.41	0.230
Fat mass (g)	22,306.66	5,411.82	14,795.80	30,928.40	18,515.13	6,165.93	9,120.10	34,651.30	19,291.58	5,533.02	8,571.00	31,029.20	0.096
Lean mass (g)	33,624.85	5,328.42	26,142.90	47,304.27	37,249.75	5,781.37	29,033.30	53,000.10	36,107.03	4,327.32	26,942.40	43,231.00	0.083
Total body fat (%)	38.18 ^a	4.76	29.20	46.50	31.51 ^b	5.00	22.70	38.60	33.13 ^b	5.10	20.50	42.30	< 0.001
BAP (U/L)	30.51	11.58	14.30	65.83	34.95	10.84	18.61	52.46	30.29	11.51	13.29	59.39	0.377
Osteocalcin (ng/mL)	13.59 ^a	7.26	3.160	28.41	6.44 ^b	4.64	0.22	16.79	9.48 ^{ab}	5.92	2.09	24.02	0.003

Note: Controls: adolescents who did not use oral contraceptives.

COC1: adolescents receiving an oral contraceptive containing 20 µg EE/150 µg desogestrel.

COC2: adolescents receiving an oral contraceptive containing 30 µg EE/3 mg drospirenone.

BMI: Bone mass index

BMD: Bone mineral density

BMC: Bone mineral content

BAP: Bone alkaline phosphatase

ANOVA for comparison of means between the three groups.

Different lowercase letters indicate significant differences between the three groups (p<0.05). Bonferroni test for multiple comparisons between the three groups.

Table 3. Comparison of the variation in mean absolute values of the anthropometric and densitometric variables and bone formation markers between adolescents receiving low-dose oral contraceptives and the control group followed up for 24 months

	Controls (n=19)				COC1 (n=23)				COC2 (n=34)				<i>P</i>
	Mean	SD	min	max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	min	Max	
Bone age (years)	1.32	1.15	0.00	3.00	0.67	0.52	0.00	1.00	0.97	0.85	0.00	2.00	0.367
Weight (kg)	4.18	4.67	-5.00	11.00	3.82	5.28	-3.30	16.60	2.75	3.52	-4.50	11.40	0.473
Height (cm)	0.74	0.82	0.00	3.00	0.8	1.39	-2.00	4.00	1.06	0.99	-0.50	4.00	0.516
BMI (kg/m ²)	1.42	1.67	-2.03	3.61	1.08	1.92	-1.88	5.57	0.67	1.49	-2.31	3.83	0.274
Z-score for BMI	0.13	0.49	-0.74	0.76	0.00	0.50	-0.85	0.59	-0.10	0.39	-0.87	0.78	0.219
BMI (percentile)	4.04	17.72	-26.84	28.28	-0.37	16.00	-32.5	22.56	-3.71	13.6	-33.17	28.72	0.243
Lumbar BMD (g/cm ²)	0.051 ^a	0.041	-0.026	0.113	0.019 ^{ab}	0.048	-0.070	0.095	-0.012 ^b	0.063	-0.159	0.118	0.001
Lumbar BMC (g)	4.85 ^a	4.86	-3.86	12.64	2.15 ^{ab}	3.10	-3.17	6.97	-0.43 ^b	4.28	-9.76	11.56	0.001
Z-score for lumbar	0.0 ^a	0.5	-0.6	1.0	-0.2 ^{ab}	0.5	-0.8	0.8	-0.6 ^b	0.6	-1.8	0.7	0.002
Total body BMD (g/cm ²)	0.095 ^a	0.039	0.004	0.160	0.018 ^b	0.024	-0.034	0.050	0.021 ^b	0.040	-0.041	0.148	0.000
Total body BMC (g)	294.80 ^a	151.96	38.36	615.62	27.90 ^b	49.74	-39.10	106.73	21.11 ^b	60.21	-90.62	126.04	0.000
Z-score for total body	0.7 ^a	0.4	-0.3	1.2	0.1 ^b	0.3	-0.7	0.5	-0.4 ^b	0.5	-1.2	0.6	0.000
Subtotal BMD (g/cm ²)	0.026	0.028	-0.017	0.073	0.005	0.016	-0.033	0.028	0.014	0.025	-0.031	0.080	0.056
Subtotal BMC (g)	100.83 ^a	116.36	-54.42	334.67	21.56 ^{ab}	88.67	-59.66	270.12	-1.47 ^b	86.08	-321.6	126.38	0.005
Fat mass (g)	3,640.35	3,702.59	-3,631.80	10,552.50	1,941.75	7,329.51	-18,075.10	11,593.90	2,634.48	2,535.80	-1,580.70	9,569.10	0.566
Lean mass (g)	-1,048.01	3,099.56	-5,735.70	4,462.80	968.08	2,710.00	-3,446.40	5,384.40	1,622.05	5,550.62	-2,950.50	24,282.61	0.145
Total body fat (%)	4.43	4.76	-3.30	13.70	3.08	3.22	-2.30	8.50	2.58	2.90	-4.20	8.30	0.293
BAP (U/L)	-17.02	19.09	-65.18	10.67	-17.79	25.67	-79.52	10.35	-12.36	11.94	-39.68	3.26	0.686
Osteocalcin (ng/mL)	-2.70	9.26	-19.87	11.82	-3.02	6.03	-13.61	11.54	-1.97	4.76	-10.61	5.80	0.909

Note: Controls: adolescents who did not use oral contraceptives.

COC1: adolescents receiving an oral contraceptive containing 20 µg EE/150 µg desogestrel.

COC2: adolescents receiving an oral contraceptive containing 30 µg EE/3 mg drospirenone.

BMI: Bone mass index

BMD: Bone mineral density

BMC: Bone mineral content

BAP: Bone alkaline phosphatase

ANOVA for comparison of means between the three groups.

Different lowercase letters indicate significant differences between the three groups ($p < 0.05$). Bonferroni test for multiple comparisons between the three groups.

Table 4. Comparison of baseline anthropometric and densitometric variables and bone formation markers between adolescents who remained in the study and those lost to follow-up

	Controls (n=31)					COC1 (n=55)					COC2 (n=82)				
	Remained in the study (n=19)		Lost to follow-up (n=12)			Remained in the study (n=23)		Lost to follow-up (n=32)			Remained in the study (n=34)		Lost to follow-up (n=48)		
Variables	Mean	SD	Mean	SD	P value	Mean	SD	Mean	SD	P value	Mean	SD	Mean	SD	P value
Age (years)	15.42	2.00	15.03	1.84	0.591	15.94	1.66	15.73	1.89	0.682	15.50	1.38	15.98	1.55	0.147
Bone age (years)	15.77	1.86	15.75	1.72	0.977	16.83	0.98	16.07	1.34	0.190	16.3	1.13	16.55	1.12	0.442
Weight (kg)	54.95	8.36	52.17	9.10	0.389	52.70	7.98	53.76	7.86	0.634	54.28	8.38	56.62	7.72	0.197
Height (cm)	161.21	5.00	160.46	6.01	0.709	159.93	6.53	158.73	5.37	0.446	157.68	6.98	159.96	5.79	0.112
BMI (kg/m ²)	21.05	2.97	20.15	2.42	0.387	20.63	2.58	21.20	2.59	0.435	21.74	2.78	22.16	2.7	0.49
Z-score for BMI	0.31	0.63	-0.17	0.77	0.067	-0.06	0.77	0.20	0.78	0.244	0.33	0.63	0.41	0.78	0.587
BMI (percentile)	60.39	21.60	44.78	26.24	0.079	48.93	24.74	56.68	26.37	0.301	61.46	22.03	63.66	24.69	0.681
Lumbar BMD (g/cm ²)	0.899	0.090	0.907	0.094	0.816	0.895	0.060	0.977	0.173	0.100	0.944	0.111	0.954	0.117	0.714
Lumbar BMC (g)	47.46	9.12	46.84	8.46	0.847	47.44	5.31	51.89	8.86	0.097	50.23	8.46	51.16	8.89	0.655
Z-score for lumbar	-0.37	0.81	-0.22	0.87	0.627	-0.65	0.80	-0.06	1.06	0.073	-0.07	1.0	-0.22	1.16	0.578
Total body BMD (g/cm ²)	1.130	0.073	1.151	0.094	0.496	0.962	0.052	1.007	0.085	0.095	1.013	0.077	1.016	0.076	0.858
Total body BMC (g)	1982.04	277.09	1959.39	322.97	0.837	1752.11	218.65	1826.87	241.04	0.352	1790.76	252.68	1857.41	252.00	0.292
Z-score for total body	1.4	0.9	1.7	1.2	0.305	-1.3	0.6	-0.5	1.3	0.060	-0.5	1.0	-0.5	1.0	0.818
Subtotal BMD (g/cm ²)	0.911	0.051	0.897	0.077	0.560	0.840	0.045	0.881	0.066	0.055	0.887	0.062	0.895	0.079	0.675
Subtotal BMC (g)	1366.27	214.76	1296.02	249.79	0.412	1338.47	173.13	1406.30	192.88	0.291	1376.6	195.55	1423.84	223.14	0.379
Fat mass (g)	18666.31	4330.37	16113.76	3753.09	0.104	18088.79	7358.32	15483.82	4632.01	0.164	17611.65	5357.18	18924.00	4510.42	0.298
Lean mass (g)	34590.23	4822.75	33586.94	5289.10	0.612	36692.18	4824.52	36948.73	4302.39	0.865	34345.6	8136.27	36531.38	5299.11	0.195
Total body fat %	33.75	4.34	31.01	4.37	0.098	29.90	4.27	28.07	5.23	0.284	31.56	5.21	32.66	4.92	0.403
BAP (U/L)	47.07	23.85	40.62	19.52	0.444	51.59	33.71	48.46	23.56	0.731	41.94	15.98	41.46	16.37	0.916
Osteocalcin (ng/mL)	16.66	8.10	15.03	1.84	0.409	9.46	5.47	10.14	6.30	0.715	11.08	6.12	10.19	6.35	0.613

Note: BMI: Body mass index
 BMD: Bone mineral density
 BMC: Bone mineral content
 BAP: Bone alkaline phosphatase
 Student's t-test

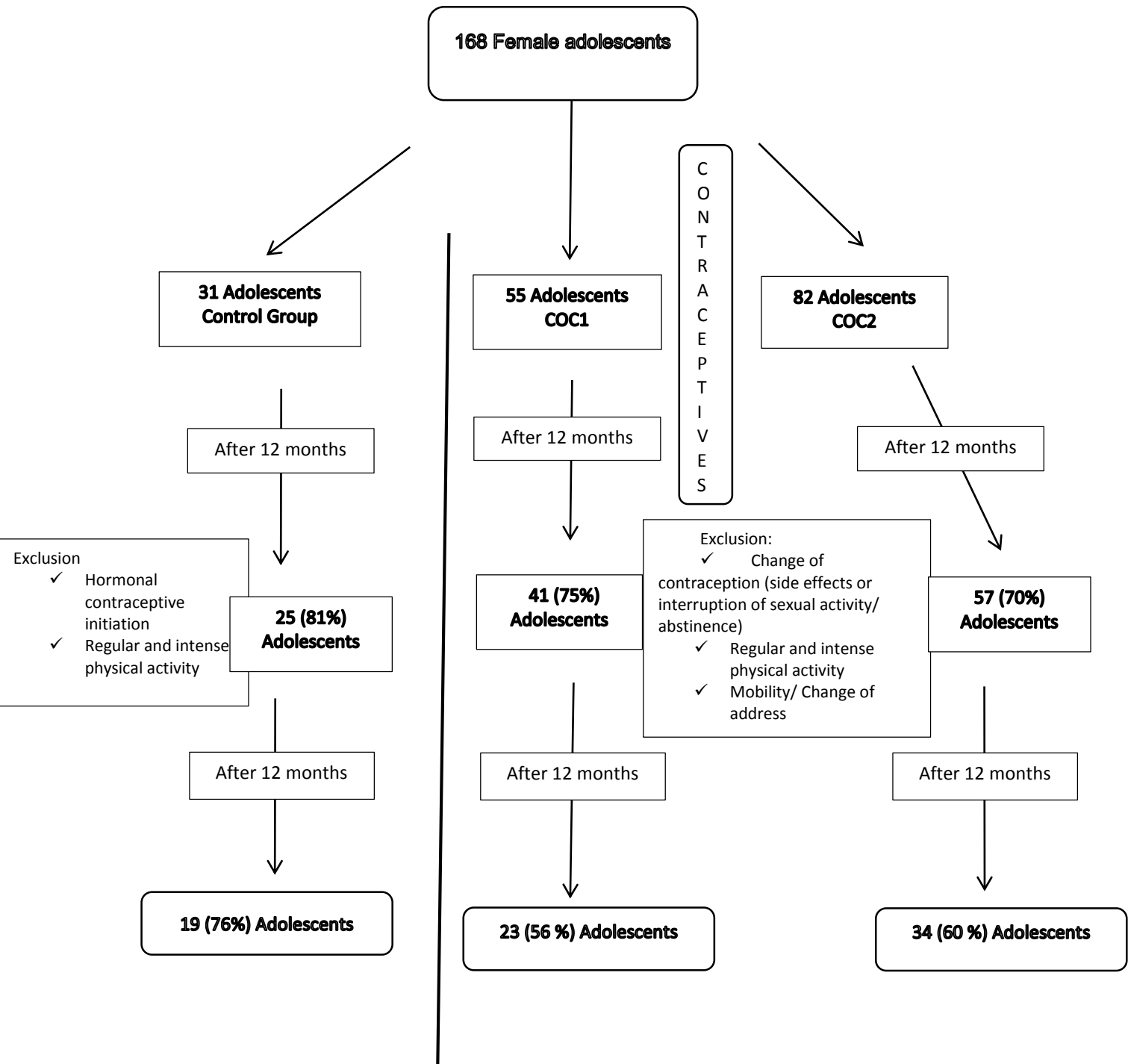


Figure 1. Flow of participants in the control and contraception groups over 24 months.
COC1: adolescents receiving an oral contraceptive containing 20 µg ethinylestradiol/150 µg desogestrel;
COC2: adolescents receiving an oral contraceptive containing 30 µg ethinylestradiol/3 mg drospirenone.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de identificado o impacto negativo resultante do uso dos contraceptivos hormonais orais sobre a massa óssea na faixa etária da adolescência, a literatura aponta indicações precisas como contracepção e no tratamento de doenças como acne, síndrome dos ovários policísticos ou sangramento uterino anormal.

Não podemos comparar o prejuízo evidenciado sobre a massa óssea com as repercussões de uma gravidez não planejada na adolescência ou pelo não uso em doenças nas quais se façam necessários. Assim, sugere-se tentar reduzir os efeitos adversos resultantes ao uso dos mesmos incentivando a prática de atividade física que ofereça renovação na aquisição de massa óssea, ingestão adequada de cálcio ou suplementos quando necessário, assim como, exposição solar ou reposição de vitamina D, além de buscar opções mais eficazes e com menores efeitos adversos para esta faixa etária. Com essas sugestões abrem-se novas possibilidades de realização de pesquisas que determinem o quanto tais ações podem favorecer o conhecimento do incremento da massa óssea nesses anos e resultados que corroborem na preservação de uma massa óssea de qualidade em anos futuros.

Complementando os comentários, destacamos que métodos contraceptivos de longa duração (LARC) tem se mostrado como excelentes

opções para adolescentes no tocante a eficácia e tempo de proteção. São considerados métodos de primeira escolha pela Academia Americana de Pediatria e Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (68), indo ao encontro das necessidades apresentadas por elas de introdução de métodos contraceptivos em idades cada vez menores. Barreiras quanto ao custo, acesso, desconhecimento sobre o método, mitos e verdades culturais divulgadas pela mídia dificultam sua implantação na prática tanto no Brasil, assim como, em vários países.

Estudos com novas modalidades de contracepção como LARC na adolescência e sua possível atuação sobre o incremento da massa óssea, objetivando determinar os mecanismos de ação sobre a remodelação óssea, certamente, colaborarão com novas evidências.

Ressaltamos ainda que os anticoncepcionais completaram 60 anos de uso e sofreram diversas mudanças em sua composição e via de administração visando maior eficácia e menores efeitos colaterais, sempre com o intuito de oferecer uma melhor qualidade de vida às mulheres.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marshall WA, Tanner JM. Variations in Pattern of Pubertal Changes in Girls. Arch Dis Childh. 1969;44:291-303.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Estudos e Pesquisas - Informação Demográfica e Socioeconômica. Síntese de Indicadores Sociais - Uma análise das condições de vida da população brasileira [Internet]. 2013;32:1-266. Available at: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv66777.pdf>
3. Young people's health--a challenge for society. Report of a WHO Study Group on young people and "Health for All by the Year 2000". World Health Organ Tech Rep Ser. 1986;731:1-117.
4. Speroff L, Fritz MA. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
5. Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H. Central mechanism controlling pubertal onset in mammals: A triggering role of kisspeptin. Front Endocrinol. 2019;10:1-12.
6. Tng EL. Kisspeptin signalling and its roles in humans. Singapore Med J. 2015;56(12):649-56.
7. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. N Engl J Med. 2012;366(7):629-35.
8. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. Horm Behav. 2013;64(2):187-94.

9. Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, Badenhop NE, Goel P, Clairmont A, et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(10):3239–45.
10. Shaw ND, Butler JP, Nemati S, Kangarloo T, Ghassemi M, Malhotra A, et al. Accumulated deep sleep is a powerful predictor of LH pulse onset in pubertal children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(3):1062–70.
11. Falck B. Site of Production of Oestrogen in Rat Ovary as Studied in Micro-Transplants. *Acta Physiol Scand.* 1960;47(4):1–101.
12. Lew R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2019;55:2–13.
13. Raisz LG. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clin Chemistry.* 1999;45(8):1353–8.
14. Troy KL, Mancuso ME, Butler TA, Johnson JE. Exercise Early and Often: Effects of Physical Activity and Exercise on Women's Bone Health. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(5):878.
15. Lattakova M, Borovsky M, Payer J, Killinger Z. Oral contraception usage in relation to bone mineral density and bone turnover in adolescent girls. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2009;14(3):207–14.
16. Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, Kalkwarf HJ, Lappe JM, Lewis R, et al. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int.* 2016;27:1281–386.

17. Matkovic V, Jelic T, Wardlaw GM, Ilich JZ, Goel PK, Wright JK, et al. Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. *J Clin Invest.* 1994;93(2):799–808.
18. Cibula D, Skrenkova J, Hill M, Stepan JJ. Low-dose estrogen combined oral contraceptives may negatively influence physiological bone mineral density acquisition during adolescence. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(6):1003–11.
19. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int.* 1994;4(6):368–81.
20. Dennison E, Mohamed A, Cooper C. Epidemiology of Osteoporosis. *Rheum Dis Clin N Am.* 2006;32:617–29.
21. Pinheiro MM, Ciconelli RM, Jacques N de O, Genaro PS, Martini LA, Ferraz MB. The burden of osteoporosis in Brazil: Regional data from fractures in adult men and women - the Brazilian osteoporosis study (BRAZOS). *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(2):120–7.
22. Radominski SC, Bernardo W, Paula AP de, Albergaria BH, Moreira C, Fernandes CE, et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Reumatol.* 2017;57(S 2):452–66.
23. Yilmaz D, Ersoy B, Bilgin E, Gümüşer G, Onur E, Pinar ED. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers, and growth parameters. *J Bone Miner*

Metab. 2005;23(6):476–82.

24. Fortes CMT, Goldberg TBL, Kurokawa CS, Silva CC, Moretto MR, Biason TP, et al. Relationship between chronological and bone ages and pubertal stage of breasts with bone biomarkers and bone mineral density in adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90(6):624–31.
25. Baxter-Jones ADG, Faulkner RA, Forwood MR, Mirwald RL, Bailey DA. Bone mineral accrual from 8 to 30 years of age: An estimation of peak bone mass. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1729–39.
26. Paldánius PM, Ivaska KK, Hovi P, Andersson S, Väänänen HK, Kajantie E, et al. The effect of oral glucose tolerance test on serum osteocalcin and bone turnover markers in young adults. *Calcif Tissue Int*. 2012;90(2):90–5.
27. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In Fogelman I., Gnanasegaran G., van der Wall H, editors. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer, Berlin; 2012. p. 29–57.
28. Lloyd T, Taylor DS, Lin HM, Matthews AE, Egli DF, Legro RS. Oral contraceptive use by teenage women does not affect peak bone mass : a longitudinal study. *Fertil Steril*. 2000;74(4):734–8.
29. Hosoi T. Genetic aspects of osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(6):601–7.
30. Boot AM, de Ridder MAJ, van der Sluis IM, van Slobbe I, Krenning EP, Keizer-Schrama SMPF de M. Peak bone mineral density, lean body mass and fractures. *Bone*. 2010;46(2):336–41.
31. Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids.

- Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(1):a031211.
32. Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology*. 1998;139(6):2659–61.
 33. Cauley JA, Wampler NS, Barnhart JM, Wu L, Allison M, Chen Z, et al. Incidence of fractures compared to cardiovascular disease and breast cancer: the Women's Health Initiative Observational Study. *Osteoporos Int*. 2008;19(12):1717–23.
 34. Wells G, Tugwell P, Shea B, Guyatt G, Peterson J, Zytaruk N, et al. V. Meta-analysis of the efficacy of hormone replacement therapy in treating and preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev*. 2002;23(4):529–39.
 35. Hadji P, Colli E, Regidor P-A. Bone health in estrogen-free contraception. *Osteoporos Int*. 2019;30(12):2391-2400.
 36. Hofbauer LC. Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). *Ann Endocrinol (Paris)*. 2006;67(2):139–41.
 37. Bogunovic L, Doyle SM, Vogiatzi MG. Measurement of bone density in the pediatric population. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21(1):77–82.
 38. Shuhart CR, Yeap SS, Anderson PA, Jankowski LG, Lewiecki EM, Morse LR, et al. Executive Summary of the 2019 ISCD Position Development Conference on Monitoring Treatment, DXA Cross-calibration and Least Significant Change, Spinal Cord Injury, Peri-prosthetic and Orthopedic Bone Health, Transgender Medicine, and Pediatrics. *J Clin Densitom*. 2019;22(4):453–71.

39. Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2002;46(1):72–8.
40. Lucas R, Martins A, Monjardino T, Caetano-Lopes J, Fonseca JE. Bone Markers Throughout Sexual Development: Epidemiological Significance and Population-Based Findings. In Preedy V. (editors) *Biomarkers in Bone Disease. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*. Springer, Dordrecht; 2016. p. 1–34.
41. Jürimäe J. Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr*. 2010;22(4):494–500.
42. Tuchman S, Thayu M, Shults J, Zemel BS, Burnham JM, Leonard MB. Interpretation of Biomarkers of Bone Metabolism in Children: Impact of Growth Velocity and Body Size in Healthy Children and Chronic Disease. *J Pediatr*. 2008;153(4):484–90.
43. Silva CC, Goldberg TBL, Nga HS, Kurokawa CS, Capela RC, Teixeira AS, et al. Impact of skeletal maturation on bone metabolism biomarkers and bone mineral density in healthy Brazilian male adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(5):450–6.
44. van Coeverden SCCM, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(1):107–16.
45. Callegari ET, Gorelik A, Garland SM, Chiang CY, Wark JD. Bone turnover marker reference intervals in young females. *Ann Clin Biochem*.

2016;54(4):438–47.

46. Abdo CHN. Estudo Mosaico 2.0 - Projeto Sexualidade (ProSex) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). J da USP. 2016; Available at: http://www.ipqhc.org.br/pag_detalhe.php?categ=Hospital&id=250
47. de Andreazzi MAR. Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar - PeNSE. Inst Bras Geogr e Estatística [Internet]. 2015;1–51. Available at: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000027031408112016144626736582.pdf>
48. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Nascidos vivos, ocorridos no ano, por mês do nascimento, sexo, local de nascimento, número de nascidos por parto, idade da mãe na ocasião do parto e lugar do registro [Internet]. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. 2018. Available at: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/2680>
49. Rede Nacional da Primeira Infância (RNPI), Secretaria Executiva – Biênio 2013/14: INSTITUTO DA INFÂNCIA - IFAN. Primeira Infância e Gravidez na Adolescência. 2013;1–18. Available at: <http://primeirainfancia.org.br/wp-content/uploads/2015/01/Cartilha-Gravidez-Adol-FINAL-HD.pdf>
50. Prior JC. Adolescents' Use of Combined Hormonal Contraceptives for Menstrual Cycle – Related Problem Treatment and Contraception: Evidence of Potential Lifelong Negative Reproductive and Bone Effects. Women's Reprod Heal. 2016;3(2):73–92.
51. Stanczyk FZ, Archer DF, Bhavnani BR. Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol

- in combined oral contraceptives: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception*. 2013;87(6):706–27.
52. Agostino H, Di Meglio G. Low-dose Oral Contraceptives in Adolescents: How Low Can You Go? *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2010;23(4):195–201.
 53. Martins SL, Curtis KM, Glasier AF. Combined hormonal contraception and bone health: a systematic review. *Contraception*. 2006;73(5):445–69.
 54. Lange HLH, Manos BE, Gothard MD, Rogers LK, Bonny AE. Bone Mineral Density and Weight Changes in Adolescents Randomized to 3 Doses of Depot Medroxyprogesterone Acetate. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2016;30(2):169–75.
 55. Rome E, Ziegler J, Secic M, Bonny A, Stager M, Lazebnik R, et al. Bone biochemical markers in adolescent girls using either depot medroxyprogesterone acetate or an oral contraceptive. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2004;17(6):373–7.
 56. Jackowski SA, Baxter-Jones ADG, McLardy AJ, Pierson RA, Rodgers CD. The associations of exposure to combined hormonal contraceptive use on bone mineral content and areal bone mineral density accrual from adolescence to young adulthood: A longitudinal study. *Bone Reports*. 2015;5:e333–41.
 57. Polatti F, Perotti F, Filippa N, Gallina D, Nappi R. Bone mass and long-term monophasic oral contraceptive treatment in young women. *Contraception*. 1995;51(4):221–4.
 58. Gai L, Jia Y, Zhang M, Gai P, Wang S, Shi H, et al. Effect of two kinds of

different combined oral contraceptives use on bone mineral density in adolescent women. *Contraception*. 2012;86:332–6.

59. Pikkarainen E, Lehtonen-Veromaa M, Möttönen T, Kautiainen H, Viikari J. Estrogen-progestin contraceptive use during adolescence prevents bone mass acquisition: a 4-year follow-up study. *Contraception*. 2008;78:226–31.
60. Brajic TS, Berger C, Schlammerl K, Macdonald H, Kalyan S, Hanley DA, et al. Combined hormonal contraceptives use and bone mineral density changes in adolescent and young women in a prospective population-based Canada-wide observational study. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2018;18(2):227–36.
61. Ziglar S, Hunter TS. The Effect of Hormonal Oral Contraception on Acquisition of Peak Bone Mineral Density of Adolescents and Young Women. *J Pharm Pract*. 2012;25(3):331–40.
62. Biason TP, Goldberg TBL, Kurokawa CS, Moretto MR, Teixeira AS, Nunes HR de C. Low-dose combined oral contraceptive use is associated with lower bone mineral content variation in adolescents over a 1-year period. *BMC Endocr Disord*. 2015;15(1):15.
63. Rizzo A da CB, Goldberg TBL, Biason TP, Kurokawa CS, Silva CC da, Corrente JE, et al. One-year adolescent bone mineral density and bone formation marker changes through the use or lack of use of combined hormonal contraceptives. *J Pediatr (Rio J)*. 2018;95(5):567–74.

7. ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Lillian Rodrigues Orsolini, médica ginecologista e obstetra, convido-a para participar da seguinte pesquisa científica:

I – DADOS SOBRE A PESQUISA:

1 Título da pesquisa: EFEITO DO USO DE ANTICONCEPCIONAIS HORMONAIS ORAIS COMBINADOS SOBRE A MASSA ÓSSEA DE ADOLESCENTES POR UM PERÍODO DE DOIS ANOS.

2. Pesquisadora responsável: Lillian Rodrigues Orsolini inscrita no CRM/SP: 139084.

Orientadora: Profa. Dra. Tamara Beres Lederer Goldberg, docente do Departamento de Pediatria e responsável pelo Ambulatório de Medicina do Adolescente da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

3. Justificativa e o objetivo da pesquisa:

As evidências quanto aos efeitos do uso de contraceptivos hormonais sobre o incremento de massa óssea durante a adolescência são limitadas e a literatura é contraditória quanto aos resultados. Observa-se uma falta de padronização do anticoncepcional prescrito, da avaliação precisa dos eventos da puberdade e da caracterização da maturidade esquelética. Poucos os trabalhos que correlacionam o exame de Densitometria Óssea (DXA) e os marcadores bioquímicos de remodelação óssea.

Objetiva-se esclarecer o comportamento da saúde óssea de dois grupos de adolescentes saudáveis usuárias de dois diferentes tipos de anticoncepcional hormonal oral (Ethinilestradiol 20 µg/ Desogestrel 150 µg ou Ethinilestradiol 30 µg / Drospirenona 3 mg) durante um período de dois anos de uso comparativamente a um grupo de adolescentes não usuárias.

A Saúde óssea será avaliada através da realização dos exames de Densitometria Óssea, de marcadores bioquímicos de remodelação óssea e da radiografia da mão e punho. Os dados serão correlacionados com avaliação antropométrica, dos caracteres sexuais secundários e recordatório alimentar.

4. Procedimentos que serão utilizados:

As adolescentes serão submetidas a exame físico geral e específico para obtenção de peso, estatura, índice de massa corpórea (IMC), avaliação dos caracteres sexuais secundários (critérios de Tanner). Realizarão radiografia de mão e punho para obtenção da idade óssea (IO) pelo método de Greulich & Pyle e avaliação do grau de maturação esquelética.

Serão submetidas ao exame de Densitometria Óssea por atenuação de raio X de dupla energia (DXA) das regiões da coluna lombar e corpo total e à coleta de 10 mL de sangue total para dosagem de biomarcadores ósseos fosfatase alcalina óssea (FAO), osteocalcina (OC) e telopeptídeo-carboxiterminal (S-CTx) nos momentos zero, 12 e 24 meses. A coleta de sangue será realizada por profissional treinada, até às 9:00h, após jejum noturno de pelo menos dez horas.

A avaliação alimentar será realizada por meio do registro alimentar de 2 dias. Este será entregue

Pesquisador: Lillian Rodrigues Orsolini. Rua Benedito Spinardi, 1440, Jardim Europa. CEP 19815-110. Assis-SP. Fone:18-3325-1445. E-mail: lrsolinini@yahoo.com.br

Orientadora: Dra. Tamara Beres Lederer Goldberg. Faculdade de Medicina de Botucatu – Departamento de Pediatria. Distrito de Rubião Junior – Cep. 18618970. Botucatu – SP. Caixa postal: 530. Fone: (14) 3811.6274. Fax. (14) 3811.6083. E-mail: tamara@fmb.unesp.br. Site www.fmb.unesp.br

na primeira consulta.

5. Desconfortos e riscos esperados:

As adolescentes e seus responsáveis serão voluntários e os interessados assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido. Os mesmos serão orientados sobre conteúdo do projeto, de seus benefícios à sua saúde. Poderão deixar de participar da pesquisa e não sofrerão qualquer prejuízo em seu acompanhamento de saúde. Todos os procedimentos serão realizados em horários que não conflitem com o horário escolar.

Os exames em questão: idade óssea e DXA, não ocasionam qualquer desconforto. Ressalta-se que a quantidade de radiação a que os adolescentes serão expostos são consideradas seguras e sem prejuízo para sua saúde atual e futura. Quanto à coleta sanguínea, existe um pequeno desconforto, porém o profissional que a realizará tem experiência e saberá como contornar a situação.

6. Benefícios que poderão ser obtidos:

Os adolescentes e seus responsáveis ficarão cientes sobre os resultados de sua avaliação óssea, recebendo de forma gratuita os resultados da idade óssea, da Densitometria Óssea que expressarão a qualidade atual e as possibilidades futuras do ganho de massa óssea.

7. Duração da pesquisa: 2 anos após a aprovação do comitê de ética

Ficaram claros quais os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Recebi esclarecimentos sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu tratamento.

Recebi esclarecimento sobre o compromisso de que minha identificação se manterá confidencial tanto quanto a informação relacionada com a minha privacidade. Recebi esclarecimento sobre o material coletado (sangue para marcadores bioquímicos) que poderá ser reutilizado em futuras pesquisas, mas para isso será apresentando ao CEP um novo projeto de pesquisa com um novo termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi esclarecimento sobre a disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos decorrentes da pesquisa.

Recebi esclarecimento de que este documento será elaborado em 2 vias, sendo 1 entregue à mim e o outro será mantido em arquivo pelo pesquisador.

Assim, concordo voluntariamente em participar deste estudo e declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para participação neste estudo.

Data

Assinatura da adolescente:

Assinatura do pai ou responsável:

Assinatura do pesquisador:

Pesquisador: Lilian Rodrigues Orsolini. Rua Benedito Spinardi, 1440, Jardim Europa. CEP 19815-110. Assis-SP. Fone: 18-3325-1445. E-mail: lrsolini@yahoo.com.br

Orientadora: Dra. Tamara Beres Lederer Goldberg. Faculdade de Medicina de Botucatu – Departamento de Pediatria. Distrito de Rubião Junior – Cep. 18618970. Botucatu – SP. Caixa postal: 530. Fone: (14) 3811.6274. Fax. (14) 3811.6083. E-mail: tamara@fmb.unesp.br. Site www.fmb.unesp.br

Anexo 2

RECORDATÓRIO ALIMENTAR FICHA DE IDENTIFICAÇÃO: NOME

DATA DE NASCIMENTO:

TELEFONE:

INFORMAÇÕES:

ANOTE TODOS OS ALIMENTOS E BEBIDAS CONSUMIDOS DURANTE TRÊS DIAS DE SEMANA (SEGUNDA A SEXTA) E 1 DIA DE FIM DE SEMANA (SÁBADO E DOMINGO).

REGISTRAR: DATA, HORA E DETALHADAMENTE TIPO DE ALIMENTO (MARCAS E SE ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS/ FIBRAS E MINERAIS) E QUANTIDADE. ANOTAR LOGO APÓS CONSUMO.

NÃO ALTERE SUA ROTINA ALIMENTAR.

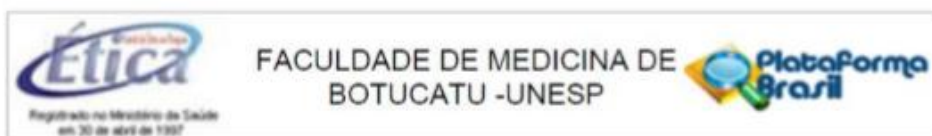
EXEMPLO: PÃES E CEREAIS/ VERDURAS E LEGUMES/ FRUTAS/ LEITE E DERIVADOS/ CARNES. PRINCIPALMENTE LÁCTEOS (LEITE, QUEIJO, REQUEIJÃO, ENTRE OUTROS SE INGERIDOS).

DÚVIAS: EUROCLÍNICA TELEFONE 18-33251445

Hora	Alimento	Quantidade
07:45	Bolacha água e sal	4 unidades
	Margarina com sal light	1 colher de sobremesa rasa
	Café em pó solúvel	1/3 copo americano
	Leite integral	2/3 copo requeijão
	Banana nanica	1 unidade (de 1 palma)

DATA/ HORA	ALIMENTO	QUANTIDADE

Anexo 3



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação entre as Densidades Minerais Ósseas de Adolescentes usuárias de duas formulações de Anticoncepcionais Hormonais de Baixa Dosagem e sua relação com marcadores ósseos de formação e reabsorção

Pesquisador: Anapaula da Conceição Bisi Rizzo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52928416.6.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Pediatria

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.441.169

Apresentação do Projeto:

O presente estudo consiste na análise dos dados oriundos de três estudos prévios realizados com adolescentes matriculadas no Ambulatório de Medicina do Adolescente da Faculdade de Medicina de Botucatu, cujos participantes são adolescentes do sexo feminino de 12 a 20 anos incompletos, usuárias de contraceptivo oral

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar prospectivamente as repercussões sobre o metabolismo ósseo de adolescentes de 12 a 20 anos incompletos, usuárias de contraceptivo oral de baixa dosagem por período de um ano frente a resultados provenientes de adolescentes saudáveis não usuárias.

Objetivo Secundário:

-Avaliar a Densidade Mineral Óssea (DMO) e o Conteúdo Mineral Ósseo da região lombar, do colo do fêmur proximal, do corpo total e do corpo subtotal (sem o segmento cabeça) de adolescentes

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 CEP: 18.618-970
E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.441.169

do sexo feminino de 12 a 20 anos incompletos, usuárias de COC de baixa dosagem padronizado por período de um ano de seu uso.

- Comparar dados obtidos pela avaliação das DMO e CMO em adolescentes usuárias de COC, pelo tempo programado, com resultados provenientes de adolescentes saudáveis do mesmo sexo e faixa etária, não usuárias de COC.

- Avaliar os marcadores de formação (Osteocalcina e Fosfatase Alcalina Óssea) e de reabsorção (S-CTx) de adolescentes do sexo feminino de 12 a 20 anos incompletos, usuárias de COC de baixa dosagem padronizado por período de um ano de seu uso.

- Comparar dados obtidos pela avaliação dos biomarcadores ósseos propostos obtidos de adolescentes usuárias de COC pelo tempo programado, com resultados provenientes de adolescentes saudáveis do mesmo sexo e faixa etária, não usuárias de COC.

- Correlacionar os níveis dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea em adolescentes usuárias de COC às Densidades Minerais Ósseas (DMO) realizadas em coluna lombar (L1-L4), corpo total e subtotal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Não possui riscos uma vez que os dados já foram coletados.

Benefícios:

Avaliar qual contraceptivo oral combinado é o mais indicado para as adolescentes visto ser este período crucial para aquisição de massa óssea e garantir uma saúde óssea adequada na adultícia, evitando o surgimento de patologias como a osteoporose e suas consequências.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo é um projeto de doutorado no qual será feita uma análise de dados já coletados de adolescentes usuárias de contraceptivo oral. Os dados já foram coletados de estudo anteriores e já aprovados por este CEP com delineamento bem estruturado. O tamanho amostral foi de 122

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.441.109

pacientes. Constam critérios de inclusão e exclusão utilizados e análise estatística dos dados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constam todos os termos exigidos por este CEP. Como é apenas uma análise de dados já coletados, os autores solicitam dispensa do TCLE, o que é pertinente no presente caso.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto pode ser aprovado sem necessidade de enviar à CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 07 de março de 2016, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado para análise o respectivo "Relatório Final de Atividades", o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631552.pdf	25/01/2016 11:13:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TRABALHODOUTORADO_25_11_2015.docx	25/01/2016 11:12:34	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoEAP.pdf	25/01/2016 11:06:20	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	25/01/2016 11:05:35	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.441.169

BOTUCATU, 07 de Março de 2016

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

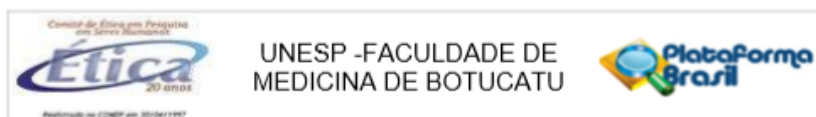
Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Página 04 de 04

Anexo 4



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Comparação entre as Densidades Minerais Ósseas de Adolescentes usuárias de duas formulações de Anticoncepcionais Hormonais de Baixa Dosagem e sua relação com marcadores ósseos de formação e reabsorção.

Pesquisador: Anapaula da Conceição Bisi Rizzo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52928416.6.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Pediatria

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.766.807

Apresentação do Projeto:

O presente estudo consiste na análise dos dados oriundos de três estudos prévios realizados com adolescentes matriculadas no Ambulatório de Medicina do Adolescente da Faculdade de Medicina de Botucatu, cujos participantes são adolescentes do sexo feminino de 12 a 20 anos incompletos, usuárias de contraceptivo oral. Trata-se de um projeto maior intitulado "Comparação entre as Densidades Minerais Ósseas de Adolescentes usuárias de duas formulações de Anticoncepcionais Hormonais de Baixa Dosagem e sua relação com marcadores ósseos de formação e reabsorção" cuja pesquisadora principal é Anapaula da Conceição Bisi Rizzo que foi desmembrado em 2 subprojetos a saber: 1. Uso de contraceptivos orais de baixa dosagem na adolescência e sua influência sobre a remodelação óssea da pesquisadora Talita Costa Domingues (doutorado) e Efeito do uso de anticoncepcionais hormonais orais combinados sobre a massa óssea de adolescentes por um período de dois anos, da pesquisadora Lilian Rodrigues Orsolini (mestrado). Os dados já foram coletados de estudo anteriores e já aprovados por este CEP com Parecer nº 1.441.169 em 07/03/2016. O tamanho amostral foi de 122 pacientes. Constaram critérios de inclusão e exclusão utilizados e análise estatística dos dados.

A pesquisadora solicita a inclusão de uma emenda em um dos subprojetos: Efeito do uso de anticoncepcionais hormonais orais combinados sobre a massa óssea de adolescentes por um período de dois anos, da pesquisadora Lilian Rodrigues Orsolini. A solicitação é de ampliação do

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3680-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.766.807

tamanho amostral, com coleta de dados no consultório particular da pesquisa que está desenvolvendo o referido subprojeto e analisar um marcador de reabsorção óssea, sendo que a metodologia será mantida. Trata-se de uma emenda, pois o o projeto estava pendente para adequação do TCLE.

Objetivo da Pesquisa:

Já relatado no Parecer 1.441.169 de 07/3/2016 aprovado pelo Cep.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já relatado no Parecer 1.441.169 de 07/3/2016 aprovado pelo Cep.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já relatado no Parecer 1.441.169 de 07/3/2016 aprovado pelo Cep.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já relatado no Parecer 1.441.169 de 07/3/2016 aprovado pelo Cep.

Recomendações:

O TCLE foi adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda apresentada encontra-se APROVADA.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 03 de julho de 2018, o documento enviado na forma de "Emenda", encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1134709_E1.pdf	14/06/2018 22:55:34		Aceito
Declaração de Pesquisadores	oficio_plataforma_brasil.pdf	14/06/2018 22:53:41	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
TCLE / Termos de	tcle_mestrado_lilian.pdf	14/06/2018	Anapaula da	Aceito

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.766.807

Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_mestrado_lilian.pdf	22:52:00	Conceição Bisi Rizzo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MESTRADO.pdf	16/05/2018 10:59:47	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Projeto_Doutorado_Talita_Final.pdf	16/05/2018 10:59:22	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_Lilian_Orsolini.pdf	16/05/2018 10:58:45	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Emenda.pdf	16/05/2018 10:58:56	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	25/01/2016 11:05:35	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 11 de Julho de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n		CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior		
UF: SP	Município: BOTUCATU	
Telefone: (14)3880-1609	E-mail: cep@fmb.unesp.br	

Anexo 5



Avenida Walter A. Fontana, 1997
19815-340, Vila Cláudia, Assis - SP
(18) 3302-3000

CONTRATO DE PATROCÍNIO

Os signatários deste termo, de um lado, **UNIMED DE ASSIS - COOPERATIVA DE TRABALHO MÉDICO**, pessoa jurídica de direito privado inscrito no CNPJ/MF sob o nº 54.991.221/0004-05, com sede sito a Avenida Walter Antonio Fontana, nº 1997, Vila Cláudia, nesta cidade e comarca de Assis/SP, neste ato representada pelo seu diretor presidente **ELYSEU PALMA BOUTROS**, brasileiro, médico, casado, domiciliado nesta cidade de Assis Estado de São Paulo, portador do RG nº 7.607.462 SSP/SP, inscrito no CPF nº 328.522.409-63, pelo Vice-Presidente **ORLANDO MARTINS JUNIOR**, brasileiro, médico, casado, domiciliado nesta cidade de Assis Estado de São Paulo, portador do RG nº 6.880.408-8 SSP/SP, inscrito no CPF nº 825.899.418-20 e Superintendente **EDUARDO HENRIQUE AREAS GONÇALVES**, médico, brasileiro, divorciado, domiciliado nesta cidade de Assis, Estado de SP, portador do RG nº 6.849.254 SSP/SP, inscrito no CPF nº 736.104.027.68 doravante denominada simplesmente **PATROCINADORA** e de outro lado a **LILIAN RODRIGUES ORSOLINI**, brasileira, médica, solteira, domiciliada nesta cidade de Assis, Estado de São Paulo, sito a Rua Lions Clube de Assis, nº 435, Apto 224, Conjunto Habitacional Imã Catarina, inscrita no CPF nº 338.577.318-00, com registro no Conselho Regional de Medicina - CRM/SP sob o nº 139084, doravante denominada simplesmente **PATROCINADA**, e, nesta qualidade, resolvem de comum acordo, entabular o presente Contrato de Patrocínio, ficando estipulado o seguinte:

CLÁUSULA PRIMEIRA - Do objeto

1.1 - O presente contrato tem por objeto a concessão de Patrocínio à **PATROCINADA** objetivando a realização do projeto de pesquisa para dissertação de mestrado denominado "Efeito do uso de anticoncepcionais hormonais orais combinados sobre a massa óssea de adolescentes por um período de dois anos.", sob orientação da Professora Doutora Tamara Beres Lederer Goldberg, doravante denominado **ESTUDO**, a ser realizado no período de 24 meses, a ser iniciado pela **PATROCINADA**.

coop Membro da Aliança
Cooperativa Internacional

"Cooperativismo: caminho para a democracia e a paz."
Roberto Rodrigues

ANS-nº 300713



Avenida Walter A. Fontana, 1997
19815-340, Vila Claurina, Assis - SP
(18) 3302-3000

CLÁUSULA SEGUNDA - Do valor

2.1 - Em consonância com os valores praticados pelo Sistema Unimed, a PATROCINADORA irá patrocinar a realização de 222 (duzentos e vinte e dois) procedimentos, divididos em igual número entre os 37 (trinta e sete) participantes do ESTUDO, sendo os mesmos Densitometria óssea rotina 2 segmentos (Codificação TUSS 40808130) e Densitometria óssea corpo inteiro (Codificação TUSS 40808149) da seguinte forma:

2.1.1 - Os exames serão remunerados por meio de reembolso pago a PATROCINADORA, mediante apresentação da nota fiscal da realização dos exames nos participantes da pesquisa;

2.1.2 - Para cada nota fiscal emitida, a PATROCINADORA reembolsará os valores dos procedimentos realizados, de acordo com a tabela de valores por ela praticada na data de realização dos mesmos.

2.1.3 - Os procedimentos serão limitados ao número descrito no caput do presente artigo, onde os 222 (duzentos e vinte e dois) procedimentos serão realizados em 3 (três datas) oportunas, sendo a 1ª (primeira) remessa para ingresso dos participantes no estudo) e a 2ª e 3ª remessas de exames realizados em 12 (doze) e 24 (vinte e quatro) meses após o início do mesmo, para obtenção dos resultados pesquisados.

2.1.4 - Cada participante realizará 2 (dois) exames, um de cada especificidade, em cada remessa de realização.

2.1.5 - Para realização do início dos estudos, o reembolso total da primeira remessa se dará, após apresentação da nota fiscal de realização dos procedimentos solicitados, conforme a tabela abaixo:

Procedimento	x 1	x 37	Total do Reembolso
Densitometria óssea rotina 2 segmentos (coluna e fêmur)	R\$ 135,60	R\$ 5.017,20	



Avenida Walter A. Fontana, 1997
19615-340, Vila Cláudia, Assis - SP
(18) 3302-4000

Densitometria óssea corpo inteiro	R\$ 168,60	R\$ 6.238,20	
Total do Reembolso			R\$ 11.255,40

CLÁUSULA TERCEIRA - Da contrapartida.

3.1 - De conformidade com o patrocínio, a PATROCINADORA fará jus às seguintes contrapartidas:

3.1.1 Recebimento, pela diretoria da PATROCINADORA, de relatório final do estudo elaborado, apontando as descobertas e demais assuntos afetos ao tema avaliado;

3.1.2 Desenvolvimento por parte da PATROCINADA, de campanhas, palestras ou o que entender pertinente, para conscientização das beneficiárias da PATROCINADORA, para apresentação dos dados recebidos pelo estudo e explanação sobre o tema;

3.1.3 Citação da empresa e exposição da logomarca, disponibilizada pelo PATROCINADOR, no material de divulgação (pasta, folder, banner e home page);

3.1.4 Citação da empresa, na relação de agradecimentos aos patrocinadores nos canais onde serão disponibilizados os dados do ESTUDO.

CLÁUSULA QUARTA - Da Vigência

4.1 - A vigência do presente contrato iniciar-se-á na data de sua assinatura e encerrar-se-á em 24 (vinte e quatro) meses da mesma data.



Aven da Walter A. Fontana, 1997
19815-140, Vila Claudia, Assis - SP
(18) 3302-3000

CLAÚSULA QUINTA - Da Rescisão

5.1 - Constituem motivos para rescisão deste contrato:

5.1.1 - o descumprimento de quaisquer obrigações previstas neste contrato;

5.1.2 - o cancelamento do ESTUDO por qualquer motivo, mesmo que por caso fortuito ou força maior;

5.2 - Ocorrendo à rescisão pelo motivo 5.1.2, a PATROCINADA compromete-se a restituir à PATROCINADORA, no prazo de 10 (dez) dias a contar do cancelamento, o valor que eventualmente já tenha recebido. A rescisão motivada pelo item 5.1.1 será resolvida em perdas e danos.

CLAÚSULA SEXTA - Das responsabilidades

6.1 - O uso da marca da PATROCINADORA é transitório e subordinado ao cumprimento das cláusulas deste contrato, não podendo ser vinculada a outra forma ou propósito que não se aplique a este contrato.

CLAÚSULA SÉTIMA - DO FORO

7.1 - Fica eleito o foro da comarca de Assis/SP, para dirimir conflitos oriundos do presente Contrato, com a exclusão de qualquer outro, por mais privilegiado que seja.

E, para que o presente instrumento produza os efeitos legais e de direito as partes, de comum acordo, firmam o presente contrato em duas vias de igual teor.



Aven da Walter A. Fontana, 1997
19815-340, Vila Cláudia Assis - SP
(18) 3102 3000

Assis/SP, 30 de outubro de 2017

Unimed de Assis
Dr. Eduardo Henrique Alves Gonçalves
Superintendente

UNIMED DE ASSIS COOPERATIVA DE TRABALHO MÉDICO

PRUDENSOL - PRUDENTE SOLUÇÕES EM ENERGIA LTDA

TESTEMUNHAS:



"Cooperativismo: Caminho para a democracia e a paz."
Roberto Rodrigues

ANS-nº 300713