



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

**Talita Domingues Caldeirão**

**IMPACTO DE DUAS COMBINAÇÕES DE  
ANTICONCEPCIONAIS ORAIS DE BAIXA DOSE SOBRE A MASSA  
ÓSSEA DE ADOLESCENTES: ENSAIO CLÍNICO COM DOIS ANOS  
DE ACOMPANHAMENTO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu para  
obtenção do título de Doutora em  
Tocoginecologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Titular Tamara Beres Lederer Goldberg**

**Botucatu  
2021**

**Talita Domingues Caldeirão**

**IMPACTO DE DUAS COMBINAÇÕES DE  
ANTICONCEPCIONAIS ORAIS DE BAIXA DOSE SOBRE A MASSA  
ÓSSEA DE ADOLESCENTES: ENSAIO CLÍNICO COM DOIS ANOS  
DE ACOMPANHAMENTO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu para  
obtenção do título de Doutora em  
Tocoginecologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Titular Tamara Beres Lederer Goldberg**

Botucatu  
2021

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

Caldeirão, Talita Domingues.

Impacto de duas combinações de anticoncepcionais orais de baixa dose sobre a massa óssea de adolescentes : ensaio clínico com dois anos de acompanhamento / Talita Domingues Caldeirão. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Tamara Beres Lederer Goldberg

Capes: 40101150

1. Adolescentes. 2. Anticoncepcionais orais.  
3. Reabsorção óssea. 4. Densidade óssea. 5. Remodelação óssea.

Palavras-chave: Adolescentes; Anticoncepcional;  
Contraceptivo; Densidade óssea; Reabsorção óssea.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE TALITA DOMINGUES CALDEIRÃO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOCOGINECOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 31 dias do mês de agosto do ano de 2021, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de TALITA DOMINGUES CALDEIRÃO, intitulada **IMPACTO DE DUAS COMBINAÇÕES DE ANTICONCEPCIONAIS ORAIS DE BAIXA DOSE SOBRE A MASSA ÓSSEA DE ADOLESCENTES: ENSAIO CLÍNICO COM DOIS ANOS DE ACOMPANHAMENTO**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. TAMARA BERES LEDERER GOLDBERG (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Pediatria / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. MARILZA VIEIRA CUNHA RUDGE (Participação Virtual) do(a) Depto. de Ginecologia e Obstetrícia / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. IRACEMA DE MATTOS PARANHOS CALDERON (Participação Virtual) do(a) Depto. de Ginecologia e Obstetrícia / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. CARLA CRISTIANE DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Universidade Estadual de Londrina, Profa. Dra. MARIA IRENE BACHEGA (Participação Virtual) do(a) Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais / FO/Bauru - Usp. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final:     APROVADA    . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. TAMARA BERES LEDERER GOLDBERG



*Επίγραφε*

*“Sei que podes fazer todas as coisas;  
nenhum dos teus planos pode ser frustrado”.*

*Jó 42.1*

# *Dedicat6ria*

A **Deus**, meu refúgio e fortaleza. Reconheço que minha história é nada sem o seu amor. Gratidão pelos milagres de todos os dias, pela sua ternura nos momentos difíceis e por suas mãos me sustentarem em pé.

Aos meus pais, Olivar e Maura, por tanta dedicação e tantos ensinamentos. Obrigada pelo amor incondicional e por me incentivarem e apoiarem nos momentos mais importantes da minha vida. Tudo o que sou devo a vocês. Vocês são, com certeza, meu maior e melhor exemplo!

Ao meu esposo Gustavo, companheiro de todas as horas, meu melhor amigo, pelo apoio e incentivo durante mais essa trajetória, não sei como agradecer tudo o que fez por mim, porque as palavras não me parecem suficientes, obrigada por acreditar em mim.

Aos meus filhos, Samuel e Davi, o meu bem maior e mais precioso, a minha melhor produção, o meu orgulho, o sentido e o colorido da minha vida. Vocês são, o motivo para eu continuar acreditando que toda luta vale a pena!

A toda minha família por tornar a minha vida muito mais completa e feliz.

A todos os meus **amigos**, pelos momentos de alegria juntos e por todo apoio e motivação. Quem tem amigo tem tudo!

# *Agradecimientos*

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Titular Tamara Beres Lederer Goldberg pela competência e dedicação à pesquisa que mesmo nos períodos de tribulações não desistiu de me conduzir.

A Dr<sup>a</sup> Lilian Rodrigues Orsolini, pelo apoio e parceira na execução deste trabalho.

Ao Departamento da Pediatria representado por Profa. Dr<sup>a</sup>. Carla Cristiane da Silva, Dr<sup>a</sup> Anapaula da Conceição Bisi Rizzo, e Dr<sup>a</sup>. Talita Poli Biason que construíram os pilares do projeto em que este trabalho se insere.

À Prof<sup>a</sup> Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge e a Prof<sup>a</sup> Titular Iracema de Mattos Paranhos Calderón que gentilmente me deram sugestões no Exame Geral de Qualificação e colaboraram na finalização desta Tese. Muito obrigada!

Aos funcionários da Radiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu pela realização dos exames de idade óssea e densitometria e ao Prof. Altamir Santos Teixeira, por ter laudado os exames de imagem.

À UNIPEX, representada por Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cilmary Suemy Kurokawa, e pelas Mestras Márcia Tenório Delneri e Maria Regina Moretto de Oliveira, por seu compromisso e qualidade inquestionável nos trabalhos realizados.

Ao Escritório de Apoio a Pesquisa representado pelos estatísticos Prof. Dr. Hélio Nunes e Prof. Dr. José Eduardo Corrente que além de realizar o trabalho de análise estatística contribuíram muito para elevar a qualidade deste trabalho. Adicionalmente agradecimento especial a Cinthia Scolástico C. de Souza por sua incansável disponibilidade em nos atender.

Aos funcionários da seção de Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da FMB, 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 à pesquisa.

Aos laboratórios de análises clínicas da cidade de Assis Dr. Joelson e Bioanálise e Laboratório de Análises Clínica do HC 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 Pereira Modotti por colaborar com a coleta de dados.

Às adolescentes, aos pais e responsáveis por entenderem a importância desta pesquisa e terem concordado em participar.



*Trajetória*  
*Acadêmica*

A defesa desta Tese é a etapa final da longa estrada percorrida. É a concretização de uma das metas de minha vida. Entretanto, tão importante quanto o trabalho concluído é, sem dúvida, todo o processo que permitiu que eu estivesse vivenciando este momento. Desta forma, gostaria de compartilhar a trajetória acadêmica percorrida destacando as atividades acadêmico-científicas desenvolvidas.

Em 2008 concluí a graduação em enfermagem pela Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP) onde descobri minha paixão pela saúde da mulher nas diferentes etapas da vida. No ano de 2009 me especializei em enfermagem obstétrica e em 2014 obtive o título de Mestre em Enfermagem pelo Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Faculdade de Medicina de Botucatu com a Dissertação “Condições de nascimento de recém-nascidos a termo em município de médio porte do interior paulista”.

Ingressei no Doutorado em 2017, sob a orientação da Professora Titular Tamara Beres Lederer Goldberg, que aceitou me acompanhar neste desafio e foram muitos! Sou de Assis (SP), casada com o Gustavo, funcionária pública no Hospital Regional de Assis com jornada de 30 horas semanais, docente da Fundação Educacional do Município de Assis desde 2019 e, ao longo desta jornada, Deus me presenteou com duas bençãos, Samuel hoje com 5 anos de idade e Davi com 2 anos.

Ao longo desses 4 anos conciliei o desenvolvimento desta Tese, com disciplinas, viagens para Botucatu, busca ativa de adolescentes para completar o tão desejado “n amostral” e a coleta de dados propriamente dita.

As 13 disciplinas cursadas no Pós-graduação sem dúvida ampliaram e aprofundaram meu conhecimento na temática desta Tese e nos assuntos relacionados à pesquisa como estatística, captação de recursos, entre outros.

A experiência docente na FEMA, com a inserção na vida acadêmica, tem proporcionado crescimento pessoal e científico com impacto do conhecimento na atuação na graduação. Até o momento tive oportunidade de participar como membro titular de 2 bancas de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e ainda oriento 4 TCCs e 3 trabalhos no Programa de Iniciação Científica (PICs). No âmbito da extensão atuo como membro do Comitê do “HealthTec - Inova FEMA”, que é um Núcleo de Inovação da FEMA com foco em empreendedorismo, inovação e tecnologia em saúde.

Tive a oportunidade de participar de 4 eventos, concluir 3 cursos, colaborar com 3 artigos científicos que foram publicados.

Conciliar vida pessoal, familiar, profissional e de doutoranda exigiu sabedoria, paciência, superação, fé e muita garra! Foram anos maravilhosos e de crescimento indescritível!

Com esta etapa concluída, novos desafios profissionais e acadêmicos provavelmente surgirão. Tenho perspectivas de aumentar meu vínculo com a FEMA como docente e pesquisadora, colaborar como docente em curso de especialização e aprimoramento em enfermagem. Estas possibilidades me impulsionam a seguir com muito ânimo e sempre em frente!

## Lista de abreviações em Português

<b>ACHO</b>	Anticoncepcional combinado hormonal oral
<b>ACHO1</b>	Grupo estudo com formulação Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg
<b>ACHO2</b>	Grupo estudo com formulação Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg
<b>CMO</b>	Conteúdo mineral óssea
<b>CMO</b>	Conteúdo mineral ósseo
<b>DMO</b>	Densidade mineral óssea
<b>DMPA</b>	Acetato de medroxiprogesterona
<b>DXA</b>	Densitometria óssea
<b>EE</b>	Etinilestradiol
<b>FAO</b>	Fosfatase alcalina óssea
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GC</b>	Grupo Controle
<b>GH</b>	Hormônio de crescimento
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de massa corpórea
<b>IO</b>	Idade óssea
<b>IST</b>	Infecções sexualmente transmissíveis
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>OC</b>	Osteocalcina
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>PVC</b>	Pico de velocidade de crescimento
<b>PMO</b>	Pico de Massa Óssea
<b>S-CTx</b>	Telopectídeo-carboxiterminal
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TNFα</b>	Fator de necrose tumoral

# *Sumário*

<b>LINHA DO TEMPO</b> .....	<b>18</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>25</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>27</b>
<b>Parte I</b> .....	<b>29</b>
<b>Elementos Gerais da Tese</b> .....	<b>29</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>30</b>
<b>1.1 Conceitos e definições</b> .....	<b>30</b>
<b>1.2 Adolescência iniciação sexual e risco reprodutivo</b> .....	<b>31</b>
<b>1.3 Anticoncepcionais Hormonais Orais na Adolescência</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4 Ação hormonal na fisiologia do crescimento e desenvolvimento no sistema esquelético</b> .....	<b>34</b>
<b>1.5 Biomarcadores e métodos de avaliação do metabolismo ósseo</b> .....	<b>41</b>
<b>1.6 Efeitos dos ACHOs em adolescentes disponíveis na literatura</b> .....	<b>43</b>
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>46</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>47</b>
<b>4. Método</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1. Desenho, participantes e local do estudo</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2 Critérios de elegibilidade, inclusão, não inclusão e exclusão</b> .....	<b>48</b>
<b>4.3 Composição dos grupos e cálculo amostral</b> .....	<b>50</b>
4.3.1 Coleta de dados .....	52
<b>4.5 Avaliação antropométrica</b> .....	<b>53</b>
<b>4.6 Avaliação dos estágios de Maturação Sexual e de Maturação Esquelética</b> .....	<b>53</b>
<b>4.7 Marcadores de metabolismo ósseo</b> .....	<b>54</b>
4.7.1 Osteocalcina (OC).....	55
4.7.2 Fosfatase alcalina .....	56
4.7.3 Telopectídeo carboxiterminal (S-CTx) .....	57
<b>4.8 Densitometria óssea (DXA)</b> .....	<b>58</b>
<b>5.0 Análise Estatística</b> .....	<b>59</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>60</b>
<b>Referências</b> .....	<b>61</b>
<b>Parte II</b> .....	<b>78</b>
<b>Artigo</b> .....	<b>78</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>81</b>

<b>2. Sujeitos e métodos</b> .....	<b>82</b>
2.1 Desenho do estudo e participantes .....	82
2.2. Avaliação Antropométrica.....	84
2.3 Idade Óssea e Densitometria .....	84
2.4. Marcadores de Formação e Reabsorção Óssea.....	85
2.7. Análise estatística .....	85
<b>3. Resultados</b> .....	<b>86</b>
<b>4. Discussão</b> .....	<b>89</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>97</b>
<b>Referências</b> .....	<b>99</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>108</b>

# *LINHA DO TEMPO*

Em 2002, a Profa. Tamara Beres Lederer Goldberg e sua orientada inscrita no Programa de Pós-graduação em Pediatria - UNESP – nível Mestrado Carla Cristiane da Silva, bolsista do CNPq, iniciaram as primeiras investigações sobre a Densidade Mineral Óssea e o Metabolismo Ósseo de Adolescentes do sexo masculino. O pioneirismo nessa área do conhecimento resultou em publicações nacionais e internacionais em virtude da qualidade e relevância das pesquisas realizadas, além da obtenção do título de Mestre pela Profa. Carla (1-4).

Na sequência, outros profissionais se associaram ao grupo de pesquisa, à exemplo da Profa. Dra Cilmary Suemi Kurokawa, agregando sua vivência e conhecimento em laboratório de pesquisa. Assim, outros alunos de PG, residentes e aprimorandos da especialidade em Medicina do Adolescente e alunos de Iniciação Científica foram se inscrevendo nos respectivos Programas e a produção científica tomando corpo. Em 2007, a Profa. Tamara passa a integrar o corpo de docentes do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, atual Programa de PG em Tocoginecologia, transferindo sua linha de pesquisa e projetos de pesquisa para esse Programa contando com auxílio FAPESP, CNPq, Reitoria UNESP, entre outros.

Na sequência, outras alunas do Programa de PG em Tocoginecologia, Mestre Maria Regina Moretto de Oliveira e Dra. Cristina Maria Teixeira Fortes desenvolveram estudos, sob sua orientação, voltados à compreensão do acréscimo da massa óssea durante a segunda década de vida, período reconhecido como Adolescência.

Seus resultados detalharam a evolução da Densidade Mineral Óssea (DMO) de adolescentes em função da faixa etária, da maturação esquelética avaliada pela idade óssea, bem como pelos caracteres sexuais secundários, indicando que a maior

aquisição de massa óssea no sexo feminino ocorre entre os 13 e 14 anos de idade cronológica, quando estão em desenvolvimento pubertário, Mamas 3, concluindo ser esse o período crítico para o acúmulo de tecido ósseo em todos os sítios analisados (5).

Em 2012, demonstraram a relevância da determinação dos biomarcadores do metabolismo ósseo e sua relação com a densidade mineral óssea em adolescentes do sexo feminino, acompanhando adolescentes saudáveis de 10 a 20 anos e revelando o paralelismo entre as curvas de concentrações dos biomarcadores ósseos analisados com o pico de velocidade de crescimento (PHV), evidenciando correlações negativas entre as DMO nos sítios avaliados e marcadores ósseos. Além disso, destacaram as altas concentrações dos marcadores ósseos nos primeiros anos da adolescência e concentrações significativamente reduzidas ao final da segunda década de vida (6).

Na sequência, na condução de pesquisas desenvolvidas no Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia, a Profa. Tamara propõe reflexão sobre o uso de anticoncepcionais e suas possíveis consequências sobre o incremento de massa óssea de adolescentes usuárias de algumas formulações. Com esse estudo, iniciado em 2009, a Mestre Talita Poli Biason obteve seu título de Mestre em 2013, tendo seu Projeto de Pesquisa o título “Densidade mineral óssea em adolescentes usuárias de anticoncepcional oral combinado”.

Nesse estudo foram introduzidas adolescentes usuárias de anticoncepcionais hormonais orais combinados (ACHO) de baixa dose (Etinil Estradiol (EE) 20mcg/Desogestrel150mcg) por período de um ano, observando-se a evolução da densidade e do conteúdo mineral ósseo que foram comparados aos de suas controles

saudáveis, também na faixa etária de 12 e 20 anos. Assim, concluiu-se que o ACHO prescrito (EE20mcg/Desogestrel150mcg) afetou negativamente o processo de aquisição de massa óssea em adolescentes (7).

Em novo estudo, acompanhando adolescentes em uso de duas formulações de ACHO, contendo EE 20µg/Desogestrel 150 e EE 30µg/ Drospirenona 3mg por período de 12 meses, o grupo de pesquisa observou efeito negativo sobre a massa óssea, assim como, sobre os marcadores de formação óssea analisados (Osteocalcina, Fosfatase Alcalina Óssea) (8).

Em 2014, nova pesquisa com ampliação da amostra foi desenvolvida pela Pós-graduanda nível Doutorado Anapaula da C. Bisi Rizzo, cujos resultados foram publicados em 2019. Este estudo verificou as repercussões sobre o metabolismo ósseo de adolescentes que utilizaram duas formulações de ACHO com doses diferentes (EE 20µg/Desogestrel 150mg e EE 30µg/Drospirenona 3mg) comparadas a adolescentes saudáveis não usuárias de contraceptivos com idades entre 12 e 20 anos, por período de 12 meses. A equipe de pesquisa concluiu que após 1 ano de seguimento o uso das duas formulações de contraceptivos se associou a efeitos deletérios sobre a massa óssea com incremento na densidade e no conteúdo mineral ósseo aquém daquele evidenciado para essa faixa etária, além de redução significativa das concentrações dos marcadores ósseos de formação (FAO e OC) em relação às adolescentes que não usavam contraceptivos (9).

Recentemente, Dissertação de Mestrado defendida pela aluna do Programa de PG em Tocoginecologia, Lilian Rodrigues Orsolini, encaminhada para publicação, comparou grupos de adolescentes entre 12 e 20 anos de idade, por período de 2 anos, usuárias de anticoncepcionais hormonais combinados de diferentes formulações

(Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg e Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg), a adolescentes pertencentes ao grupo controle de não usuárias, indicando que o impacto mais negativo sobre a densidade mineral óssea de região lombar, corpo total e subtotal ocorreu no grupo que utilizou Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg.

Até o momento, não localizamos estudo na literatura científica consultada que demonstrasse o impacto do uso de contraceptivos hormonais orais combinados por adolescentes com mais de 15 anos de idade, portanto, com idade ginecológica superior a três anos, acompanhadas por período de 2 anos, que avaliasse a massa óssea por densitometria mineral óssea acrescida de análise de biomarcadores ósseos de formação, além de marcador de reabsorção telopeptídeo carboxiterminal (S-CTX).

Além desse estudo, propusemos realização de uma análise de relações entre marcadores de formação e reabsorção, Índice de Balanço Ósseo, em adolescentes com idades entre 15 a 20 anos.

A presente Tese se propõe a preencher lacunas do conhecimento relativo à massa óssea de adolescentes, tendo sido gerada ao longo destes anos de investigação, relacionando-se aos projetos de pesquisa liderados e orientados pela Profa. Tamara B.L. Goldberg. A aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para seu desenvolvimento tem o CAAE 52928416.6.0000.5411 (Anexo 1).

Esta Tese foi elaborada em conformidade com as normas estabelecidas pelo Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e os resultados provenientes deste estudo serão apresentados na forma de dois artigos.

Artigo 1 intitulado **Impacto de duas combinações de anticoncepcionais orais de baixa dose sobre a massa óssea de adolescentes: ensaio clínico com dois anos de acompanhamento.**

## Referências da Linha do Tempo

1. Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Mineralização óssea em adolescentes do sexo masculino: anos críticos para a aquisição da massa óssea. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2004 Dec;80(6):461–7. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0021-75572004000800007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572004000800007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
2. Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Análise preditiva da densidade mineral óssea em adolescentes brasileiros eutróficos do sexo masculino. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. 2006 Feb;50(1):105–13. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302006000100015&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302006000100015&lng=pt&tlng=pt)
3. Goldberg TBL, Silva CC. Does osteoporosis affect children and adolescents? *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2004 Mar 1;80(2):163–6. Available from: [http://www.jped.com.br/conteudo/Ing\\_resumo.asp?varArtigo=1160&cod=&idSecao=8](http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=1160&cod=&idSecao=8)
4. Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS DJ. Bone mineralization in brazilian adolescents: the years of maximum bone mass incorporation. *Arch Latinoam Nutr* [Internet]. 2007; v. 57 (2):118–24. Available from: [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06222007000200003&script=sci\\_arttext](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06222007000200003&script=sci_arttext)
5. Oliveria MRM de. Bone Mineral Density in Healthy Female Adolescents According to Age, Bone Age and Pubertal Breast Stage. *Open Orthop Journal* [Internet]. 2011 Sep 12;5(1):324–30. Available from: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOORTHJ-5-324>
6. 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)* [Internet]. 2014 Nov;90(6):624–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedp.2014.04.007>

7. Biason TP, Goldberg TBL, Kurokawa CS, Moretto MR, Teixeira AS, Nunes HR de C, et al. Low-dose combined oral contraceptive use is associated with lower bone mineral content variation in adolescents over a 1-year period. *BMC Endocr Disord* [Internet]. 2015 Dec 3;15(1):15. Available from: <http://bmccendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12902-015-0012-7>

8. TBL G. Avaliação da densidade mineral óssea e de marcadores ósseos de adolescentes usuárias de anticoncepcionais hormonais de baixa dosagem (Etinilestradiol 20µg/Desogestrel 150g): 1 ano de acompanhamento. 2015.

9. 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)* [Internet]. 2019 Sep;95(5):567–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002175571830069>

*Resumo*

**Caldeirão TD. IMPACTO DE DUAS COMBINAÇÕES DE ANTICONCEPCIONAIS ORAIS DE BAIXA DOSE SOBRE A MASSA ÓSSEA DE ADOLESCENTES: ENSAIO CLÍNICO NÃO RANDOMIZADO COM DOIS ANOS DE ACOMPANHAMENTO. 2021. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Brasil.**

**Introdução:** A adolescência é um período crítico para estabelecer a saúde óssea, quando quase metade do pico de massa óssea é adquirido. Os marcadores de renovação óssea podem fornecer informações sobre a saúde óssea em adolescentes, mas foram pouco estudados neste grupo demográfico.

**Objetivo:** Avaliar em adolescentes, ao longo de dois anos, a interferência sobre o incremento de massa óssea resultante ao uso de duas combinações de anticoncepcionais hormonais orais de baixa dose Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg (ACHO1) ou Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg (ACHO2), por intermédio da realização de densitometria óssea (BMD) e de biomarcadores de remodelação óssea.

**Desenho do Estudo:** Ensaio clínico controlado paralelo não randomizado com participação de 127 adolescentes, divididas nos grupos controle e expostas a anticoncepcionais ACHO 1 e ACHO 2, submetidas à avaliação antropométrica, dos caracteres sexuais secundários (critérios de Tanner), da idade óssea (IO). Obtidos Densitometria Óssea por atenuação de raio X de dupla energia (DXA) e dosagem de biomarcadores ósseos fosfatase alcalina óssea (BAP) e osteocalcina (OC) e telopetídeo carboxiterminal (S-CT-x) no momento inicial e após 24 meses.

**Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis analisadas entre as usuárias de ACHO 1, ACHO 2 e o grupo controle, no momento basal. Após 24 meses de observação, as não usuárias incorporaram mais massa óssea (conteúdo e densidade) que ambos os grupos que utilizaram anticoncepcional, sendo o impacto negativo mais evidente no grupo ACHO2 frente ao grupo ACHO 1. Redução significativa nos valores percentuais de fosfatase alcalina óssea e osteocalcina foram observados nas usuárias de contraceptivos orais.

**Conclusões:** Observou-se prejuízo na aquisição de massa óssea em adolescentes usuárias de anticoncepcionais hormonais combinados sendo mais evidente o impacto nas adolescentes usuárias de anticoncepcionais que continham EE 30µg/Drospirenona 3 mg.

**Palavras-Chaves:** Anticoncepcionais, Biomarcadores, Densitometria, Remodelação Óssea

*Abstract*

**Caldeirão TD. IMPACT OF TWO COMBINATIONS OF LOW-DOSE ORAL CONTRACEPTIVES ON ADOLESCENT BONE MASS: A CLINICAL TRIAL WITH TWO YEARS FOLLOW-UP.2021.**

**ABSTRACT**

**Aim:** To evaluate the effect of two combinations of low-dose oral hormonal contraceptives [20 µg ethinyl estradiol (EE)/150 mg desogestrel (ACHO1) or 30 µg EE/3 mg drospirenone (ACHO2)] on bone mass acquisition in adolescents over two years by means of bone densitometry and measurement of biomarkers of bone remodeling.

**Study Design:** Parallel-group, non-randomized controlled clinical trial of 127 adolescents divided into a control group and two groups receiving either ACHO1 or ACHO2. The participants were submitted to anthropometric assessment and evaluation of secondary sexual characteristics (Tanner criteria) and bone age. Bone densitometry by dual-energy X-ray absorptiometry and measurement of bone biomarkers (bone alkaline phosphatase, osteocalcin, and C-terminal telopeptide) were performed at baseline and after 24 months.

**Results:** No significant differences in the variables analyzed were observed between ACHO1 or ACHO2 users and the control group at baseline. After 24 months, non-users had incorporated more bone mass (content and density) than either group of contraceptive users. This negative impact was more pronounced in the ACHO2 group than in the ACHO1 group. A significant reduction in the percentage values of bone alkaline phosphatase and osteocalcin was observed in users of oral contraceptives.

**Conclusions:** Bone mass acquisition was compromised in adolescent users of combined hormonal contraceptives. The negative impact was more pronounced in adolescents using contraceptives that contain 30 µg EE/3 mg drospirenone.

**Keywords:** adolescents, anticoncepcional, contraceptivos, bone density, bone resorption, bone remodeling

# *PARTE I*

*Elementos Gerais da Tese*

## **1. Introdução**

### **1.1 Conceitos e definições**

Adolescência é o período de transição entre a infância e a vida adulta, é momento crucial e peculiar na vida e no desenvolvimento dos indivíduos, caracterizada pelo desenvolvimento físico, mental, emocional, sexual e social, em que se observam inúmeras transformações resultantes da interação de múltiplos fatores (1).

Embora não haja consenso no tocante aos limites etários propostos à delimitação da adolescência, entre as agências ou entidades relacionadas à saúde e aquelas relacionadas ao direito, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2) reconhece a adolescência como o período entre os 10 anos completos e 20 anos incompletos.

Este período também reconhecido no Brasil, referendado tanto pelo Ministério da Saúde como pela Sociedade Brasileira de Pediatria, como aquele que se refere à segunda década de vida (2). No Brasil, estima-se que o grupo populacional de adolescente é composto por 21 milhões de indivíduos(3), o que representa 11% da população de nosso país.

A puberdade corresponde às mudanças biológicas que ocorrem durante o processo da adolescência, as quais se representam por importantes alterações morfológicas e fisiológicas, período que se relaciona ao início da capacidade reprodutiva humana. Estas mudanças são resultantes da reativação do complexo mecanismo neuro-hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal-gonadal. (1,4,5).

O início de todo este processo biológico ocorre na fase embrionária e culmina com o advento da puberdade, com o completo crescimento estatural, fusão total das

epífises ósseas, desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e com a completa maturação do sistema reprodutivo do indivíduo. Desta forma, não se pode compreender a adolescência como uma etapa separada do desenvolvimento humano (1,6).

Nas meninas, o desenvolvimento das gônadas desencadeia a produção de hormônios sexuais, dando início ao desenvolvimento mamário e pilificação em região pubiana e axilar. Além desses eventos, a puberdade em meninas é marcada pela presença da primeira menstruação, denominada menarca, marco importante que ocorre em torno dos 12 aos 16 anos de idade. Entretanto, cabe destacar que em média, as meninas brasileiras apresentam sua menarca aos 12,4 anos de idade (1,7,8), momento posterior ao pico máximo de crescimento estatural (PHV).

## **1.2 Adolescência iniciação sexual e risco reprodutivo**

Esta sequência de eventos, que é universal, concomitantemente dará início às descobertas relativas a sexualidade envolvendo transformações de atitudes, comportamentos e opiniões (9). Na atualidade, observa-se tendência à iniciação da atividade sexual dos adolescentes brasileiros, em idades mais precoces, sendo que a média de idade da primeira relação sexual é descrita como ocorrendo aos 14,9 anos (10–15).

Neste contexto, a OMS destaca, em seu relatório de 2018 que, no mundo e a cada ano, aproximadamente, 16 milhões de adolescentes tornam-se mães. No Brasil, elas superam 500 mil casos por ano (16,17). Embora exista redução gradual desses índices nos últimos 20 anos, essa taxa ainda é muito superior a de países desenvolvidos.

O fenômeno gravidez precoce tem acontecido de modo diversificado, sendo mais comum em algumas regiões brasileiras e em alguns grupos sociais, principalmente entre os mais pobres e com menor nível de educação (18,19). Dados do Ministério da Saúde (19) revelam que em 2014 nasceram 28.244 crianças filhas de meninas entre 10 e 14 anos e 534.364 crianças filhas de mães com idades compreendidas entre 15 e 19 anos (17,20).

O risco de morte materna evidenciado entre essas adolescentes duplica, quando comparado com o observado em mulheres adultas (21,22). Além disso, gestações não planejadas apresentam-se como consequência nessa faixa etária, e resulta que 75% delas abandonam a escola e ficam expostas a situações de maior vulnerabilidade, reproduzindo padrões de pobreza e exclusão social (23,24).

Outro agravante é a alta incidência de prematuridade e baixo peso entre os recém-nascidos filhos destas adolescentes, principalmente quando engravidam em idades muito precoces, ou seja, abaixo dos 15 anos de idade (17,21).

A gravidez não planejada pode expô-las a situações de alta vulnerabilidade, desta forma existe necessidade de orientação quanto aos vários métodos contraceptivos e, dentre eles, quanto à prescrição, disponibilização e uso de Anticoncepcionais Hormonais Orais (ACHOs) (13,14,25).

### **1.3 Anticoncepcionais Hormonais Orais na Adolescência**

Os anticoncepcionais completaram 60 anos de uso e ao longo deste período diversas mudanças em sua composição e via de administração ocorreram, visando maior eficácia e menores efeitos colaterais. Estudos realizados em diferentes países

divulgam que o uso de anticoncepcionais hormonais tornou-se prática mundial, com milhões de adolescentes usuárias deste método (26,27).

No Brasil, é consenso que o uso de métodos contraceptivos na adolescência limita-se, dentre todos os disponíveis a serem utilizados por essa faixa etária, basicamente ao emprego do preservativo masculino e ao de anticoncepcionais orais (11,28,29). Apesar da evidência da necessidade de uso, estudos demonstram que entre 3%(28) e 18% (28,29) das adolescentes que apresentam vida sexual ativa não utilizam nenhum tipo de método contraceptivo.

O grupo de pesquisa do projeto Estudo dos Riscos Cardiovasculares em Adolescentes (ERICA)(25), entre suas produções, desenvolveu subprojeto com objetivo de estimar a prevalência de iniciação sexual e uso de métodos contraceptivos em adolescentes com vida sexual ativa. Este estudo revelou que entre as adolescentes avaliadas, 85,2% referiram uso de métodos contraceptivos, dentre os métodos, 68,8% das adolescentes referiram uso de preservativo masculino pelo parceiro e, anticoncepcional hormonal oral (ACHO) por 20,8% delas (25).

A análise dos dados sobre sexualidade e contracepção evidencia que a heterogeneidade na prevalência de iniciação sexual e uso de métodos contraceptivos observada entre os adolescentes brasileiros está relacionada aos fatores idade, à variabilidade dos locais em que vivem e, da qualidade da educação que lhes é oferecida (25).

Entre os múltiplos fatores relacionados à gravidez precoce podemos citar a maturação sexual acelerada, início precoce da vida sexual, falta de acesso aos métodos contraceptivos; desconhecimento da fisiologia da fertilidade e da

sexualidade; fragilidade na tutela familiar e falta de perspectivas de ascensão econômica e acadêmica-educacional (17,20,22,24,30).

Outros fatores resultam em função da desigualdade social, em que a maternidade se constitui como projeto de vida; liberdade sexual; gestação como forma de agressão e desafio à família e à sociedade. A crença de que por ser adolescente não corre o risco de conceber, em que pensamentos equivocados como “uma relação apenas não é suficiente para engravidar” ou que “isto não vai acontecer comigo” também constituem fatores que propiciam a gestação não planejada (17,20,22,24,30).

Desta forma iniciativas voltadas ao empoderamento feminino e à educação sexual abrangente podem aumentar a igualdade e equidade de gênero, bem como o comportamento sexual responsável, para minimizar a prevalência de gravidez precoce e não planejada, além das infecções sexualmente transmissíveis (31).

A adolescência é momento de grande vulnerabilidade no que tange ao crescimento e desenvolvimento(1), quanto às possíveis consequências resultantes ao uso de contraceptivos hormonais quando utilizados por indivíduos pertencentes a esse recorte etário (11,12,25,28). Deve-se refletir sobre as interferências destes hormônios exógenos na fisiologia do crescimento e desenvolvimento, principalmente sua ação no sistema esquelético pois, a adolescência é fase especialmente importante no que concerne à saúde óssea (32).

#### **1.4 Ação hormonal na fisiologia do crescimento e desenvolvimento no sistema esquelético**

A compreensão dos mecanismos envolvidos na mineralização óssea, especialmente aqueles que ocorrem no período puberal, podem propiciar o desenvolvimento de uma massa óssea de qualidade (33).

Por muito tempo o conjunto de ossos que formam o esqueleto humano foi considerado um arcabouço mineral, tecido inerte; entretanto, nos últimos anos, pode-se afirmar que o tecido ósseo é vivo, que entre tantas competências participa das funções biomecânicas de locomoção e sustentação; tem papel protetor de órgãos internos, sistema nervoso e da medula óssea; participa da regulação do pH sérico e da concentração de minerais. Recentemente foi considerado órgão com função endócrina, produzindo hormônios e regulando diversos mecanismos relacionados ao nível glicêmico e à resistência à insulina (34,35).

O osso é tecido metabolicamente ativo, composto por população heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação celular, que está em processo permanente de mineralização relacionado à formação e reabsorção da massa óssea (36–38). O conteúdo mineral ósseo (CMO) acumulado durante a adolescência é considerado fator de proteção quanto à possível incidência de osteopenia e/ou osteoporose e fraturas por deterioração da microarquitetura, que serão evidenciadas na vida adulta e, certamente, na senilidade (39).

Durante o crescimento e desenvolvimento observados nos anos que correspondem à adolescência, o crescimento do esqueleto prossegue pela ação coordenada de deposição e reabsorção óssea para permitir que os ossos se expandam (aposição periosteal do osso cortical) e se alonguem (ossificação endocondral) até sua forma adulta (33). Na puberdade, a taxa de formação óssea supera a de reabsorção, favorecendo o incremento ósseo (39).

A literatura científica atual (40,41) evidencia que a aquisição de massa óssea se relaciona ao avanço do estadiamento puberal de Tanner (1), sendo mais significativa entre os estadiamentos 3 e 4, respectivamente, para o sexo feminino e

masculino. Em meninas, o pico máximo de velocidade de crescimento (PHV), ocorre dois anos após o início do desenvolvimento das mamas (M2) e antecede em um ano a menarca, ocorrendo, quando as meninas estão em estágio M3 de mamas pelos critérios de Tanner (40–42).

Com diferença de sete a doze meses após o PHV observa-se o pico de massa óssea (PMO), confirmando-se que 25% da massa óssea é depositada nos meses próximos ao evento menarca (33).

O PMO é considerado como a quantidade de osso adquirida quando o sistema esquelético se apresenta estável, sendo atingido durante a idade adulta jovem. O conceito de pico de massa óssea captura de forma mais ampla o pico de força óssea, que é caracterizado por massa, densidade, microarquitetura, mecanismos de micro reparo e propriedades geométricas que fornecem resistência estrutural (33).

Existem várias nuances neste conceito que merecem reconhecimento. O conceito de PMO é diferente quando aplicado a um indivíduo e ao conjunto da população. Para um indivíduo, o pico de massa óssea pode se referir à quantidade máxima de osso acumulado durante um período até que alcance a idade adulta jovem (43).

Alternativamente, o conceito de PMO pode se referir ao potencial máximo ou genético do indivíduo para a resistência óssea, ou seja, conteúdo mineral ósseo (CMO), densidade mineral óssea segmentar ou outras medidas de resistência óssea. Em nível populacional, o PMO é atingido quando as alterações relacionadas à idade no resultado ósseo não são mais positivas e se atinge um platô ou valor máximo (43).

O conteúdo mineral ósseo (CMO) aumenta gradualmente durante a infância e verifica-se aumento exponencial durante a adolescência. Após o estabelecimento

da estatura final, a massa óssea continua a aumentar por mais algum período, até atingir montante que pode ser definido como a quantidade máxima da massa óssea que o indivíduo acumula desde o nascimento até à maturidade óssea. Esse importante período de incremento de massa óssea pode ser considerado como uma janela de oportunidades no que concerne à saúde óssea (40,42,44).

Em adolescentes do sexo feminino, o PMO, tanto para a região lombar quanto para o corpo total, foi observado entre 18 e 20 anos (45). Desta forma preocupação crescente com a baixa massa óssea e suas consequências conduziram ao progressivo interesse e preocupação no entendimento da modelação e da remodelação óssea, durante as duas primeiras décadas de vida do ser humano (33).

Esses fenômenos dependem da ação coordenada de três tipos de células: os osteoblastos, osteoclastos e os osteócitos(46) sob participação direta do estrogênio através de receptores específicos presentes em osteoblastos e osteoclastos no processo de remodelação óssea, sendo que, após os 40-50 anos, a reabsorção predominará sobre a formação óssea, principalmente no sexo feminino, resultando em desorganização da microarquitetura, fragilidade óssea e maior risco de fratura (44,46).

Estudos demonstram a correlação entre os marcadores ósseos como preditores do desenvolvimento de CMO e DMO, evidenciando que as concentrações de marcadores de formação e reabsorção óssea são mais elevadas nos primeiros anos da puberdade do que nos estágios avançados do desenvolvimento puberal, quando se aproximam das concentrações evidenciadas no início da vida adulta (28,41,47,48).

Pode-se inferir então que o comprometimento do incremento ósseo durante este período pode conduzir a um PMO “subótimo”, situação que predispõe a ocorrência de fraturas ainda na infância até a senilidade, levando ao surgimento precoce de quadros de osteopenia/osteoporose em indivíduos com baixa reserva óssea (33,41,42,49), sendo a baixa DMO o principal preditor para o risco de fraturas (50).

A saúde óssea é influenciada por fatores endógenos como, a genética e exposição aos hormônios sexuais e, exógenos, representados pela atividade física, nutrição, tabagismo e uso de medicamentos(38,51–54).

Conforme revelado por estudos *in vitro* e *in vivo*, o estrogênio é fator importante na regulação do metabolismo do tecido ósseo(55), pois afeta positivamente a formação e proliferação dos osteoblastos(55), enquanto simultaneamente inibe a apoptose de osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea (56).

A ação estrogênica consiste na inibição da produção de interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6) e prostaglandinas (E<sub>2</sub>), que são importantes reguladores da reabsorção e estimuladores da produção de Osteoprotegerina (OPG), tolhendo também o fator de necrose tumoral (TNF), conhecido como inibidor da osteoclastogênese(57–59).

O efeito bifásico promovido pelo estrogênio de estimular a deposição de cálcio no perióstio e inibir a reabsorção do endóstio, mediante a interação com o hormônio de crescimento (*Growth Hormone* - GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) 1 e 2, possibilitam a maximização do crescimento e resistência ósseos(60).

A importância do papel do estrogênio sob células ósseas também foi demonstrada em estudo experimental que utilizou o estrogênio 17- $\beta$ -estradiol em células osteoblásticas

evidenciando aumento da secreção de OPG, assim como, aumento da expressão gênica das células osteoblásticas em comparação com as células sem estímulo hormonal (59).

Diante dessas constatações pode-se afirmar que o estrogênio é um dos principais determinantes do incremento de massa óssea, afetando tanto na aquisição do PMO durante adolescência, resultante ao aumento da densidade mineral óssea (DMO) nesses anos e nos primeiros anos da terceira década de vida (55,61,62).

Além dos efeitos relacionados ao estrogênio, o impacto da progesterona sobre a massa óssea também deve ser considerado, com diferentes mecanismos subjacentes. A progesterona tem ação sobre o tecido ósseo, pois estimula a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos e conseqüentemente ativa a formação dos ossos, minimizando, assim, a perda óssea (63–65).

Aquisição insuficiente de massa óssea durante o desenvolvimento esquelético e/ou perda óssea acelerada após a obtenção do pico máximo de incremento de massa óssea são, teoricamente, os dois processos que predispõem às fraturas por fragilidade entre as mulheres pós-menopausa. Assim, diante dessas constatações, pode-se afirmar que a massa óssea adquirida no final do período de crescimento parece ser mais importante do que a perda óssea que ocorre durante a vida adulta, uma vez que aumento de 10% no PMO retarda o início da osteoporose em 13 anos(58).

Em mulheres jovens aparentemente saudáveis que tiveram início tardio da puberdade, foi observada baixa densidade mineral na região trabecular e menor espessura no rádio distal, sendo que os achados foram associados à redução da resistência óssea e aumento do risco de fratura durante o crescimento (45,66).

A puberdade tardia está associada ao aumento da incidência de fratura durante a infância, adolescência e vida adulta de mulheres saudáveis (67), evidenciando sua influência sobre a microestrutura óssea prejudicada em momento de aquisição do PMO (66,67). A relação positiva existente entre a menarca precoce e a maior densidade óssea reforça o papel do estrogênio na aquisição de massa óssea(45,66).

Frente a esse apanhado, pode-se observar que a progesterona e o estrogênio são importantes reguladores do metabolismo ósseo (32,37,68) e, assim, é plausível supor que o uso de ACHOs possa afetar a saúde óssea. Em adolescentes, que estão em processo de construção e acumulação de massa óssea, esta interferência pode ser ainda mais impactante, uma vez que praticamente metade do montante total de massa óssea obtida na vida adulta de uma mulher é incorporada durante a adolescência (69).

Reabsorção e formação são processos intimamente acoplados na remodelação óssea, sendo o estrogênio importante regulador em ambos os processos. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular dos hormônios sintéticos tanto os progestágenos como os estrogênios sobre a remodelação óssea (70).

O principal efeito pretendido por todos os ACHOs é a inibição da ovulação, por redução da liberação da gonadotrofina no meio do ciclo menstrual, pela supressão da secreção de gonadotrofinas durante a fase folicular do ciclo, que previne a maturação folicular e, acrescido a esses efeitos, pela dificuldade de implantação do zigoto no endométrio inóspito (71).

Além de seus efeitos anticoncepcionais, deve-se destacar que apresentam efeitos considerados benéficos à saúde, como a prevenção do câncer de endométrio e de ovário, alívio da dismenorreia e controle de irregularidade menstrual (71).

No entanto, podem apresentar efeitos adversos, como aumento quanto ao risco de eventos cardiovasculares como o tromboembolismo venoso, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio entre outros (71,72).

### **1.5 Biomarcadores e métodos de avaliação do metabolismo ósseo**

Para determinar valores dinâmicos do metabolismo ósseo e sua relação com exposição hormonal, são utilizados diferentes biomarcadores. Para a avaliação da massa óssea, a densidade mineral óssea (DMO) obtida por atenuação de raios X de dupla energia (DXA), denominada densitometria óssea, é considerada o método mais adequado (45,73,74).

Trata-se de método rápido, reprodutível, seguro, não invasivo, preciso e de baixa exposição à radiação. 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 da DMO na maioria dos pacientes pediátricos e entre os adolescentes (45,73,74).

Entretanto, mesmo sendo considerada o método indicado, é medida pontual estática e, portanto, não reflete as alterações dinâmicas às quais o tecido ósseo se submete, sendo seu resultado considerado apenas um momento do quadro evolutivo (73,75,76).

Para suprir essa limitação e melhorar a sensibilidade, a especificidade e o dinamismo dessas avaliações, o uso de alguns marcadores biológicos vem sendo

recomendado para permitir compreender e avaliar o processo da remodelação óssea (73,75,76).

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 Telopectídeo-carboxiterminal(S-CTx) (75,77).

A OC é a proteína não-colágena da matriz óssea mais abundante e produzida por osteoblastos diferenciados. Relaciona-se à mineralização da matriz osteóide e as vitaminas D e K1 são importantes cofatores(75). Imunoensaios demonstram correlação entre valores elevados de OC com aumento da formação óssea como no processo de crescimento rápido, bem como, no hipertireoidismo e na ocorrência de metástases ósseas (24).

A FAO consiste numa enzima específica encontrada na membrana plasmática de osteoblastos e também está envolvida nos processos de formação e mineralização óssea (75).

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 (41,78–80).

A análise e o acompanhamento dos níveis séricos dos biomarcadores ósseos oferecem uma contribuição importante para a compreensão do metabolismo ósseo, sendo uma ferramenta na complementação das avaliações estáticas obtidas pela realização da densitometria óssea (41,75,81,82).

Assim é possível antever que os marcadores de formação óssea se encontram proporcionalmente mais elevados durante a infância e a adolescência do que os de reabsorção e as concentrações dos marcadores são elevadas nos primeiros anos da adolescência e diminuem significativamente com o avançar da mesma (41,48).

### **1.6 Efeitos dos ACHOs em adolescentes disponíveis na literatura**

Os efeitos do uso de ACHO em adolescentes foram amplamente estudados, entretanto, os resultados encontrados na literatura científica sobre os efeitos do uso de ACHO na saúde óssea de adolescentes são conflitantes. Isso se deve à heterogeneidade dos estudos em relação aos critérios de inclusão, número de participantes e randomização dos grupos; quanto ao tipo de contraceptivo, componentes e suas doses em cada medicamento, período de observação, interferência de fatores como atividade física, idade, tabagismo, raça-etnia, índice de massa corporal e ingestão de vitamina D e cálcio (83–85).

Desta forma, ainda não está esclarecido o efeito dos ACHOs sobre o incremento de massa óssea de adolescentes e seu impacto quanto ao risco de osteoporose na vida senil (83–85).

Alguns ACHOs induzem à redução de produção de estrogênio endógeno e à supressão da produção endógena de progesterona pelos ovários. Nessas mulheres que os utilizam, os níveis circulantes de esteroides sexuais são principalmente determinados pelas doses presentes na formulação do anticoncepcional (36), contudo, cabe ressaltar que a dosagem inclua análises de EE e que o  $\beta$  estradiol pode não ter sido dosado.

Se a formulação do anticoncepcional contém dose baixa ou muito baixa de EE ou se o uso de formulações resulta em concentrações estrogênicas baixas, o metabolismo do tecido ósseo pode ser afetado. Isso é particularmente verdadeiro durante a adolescência, quando o eixo hipotálamo–hipófise–gônadas não está completamente maduro (55,69,84,86).

Os efeitos esqueléticos de algumas formas de contraceptivos hormonais são mais evidentes em mulheres adolescentes do que em mulheres maduras, sendo o uso de acetato de medroxiprogesterona (DMPA) injetável trimestral associado a menores ganhos ou também a perdas mais expressivas de massa óssea em adolescentes(86).

Segundo recomendações da *National Osteoporosis Foudation* (33) o DMPA é nível B de evidência sobre impacto negativo no ganho de massa óssea. Sua ação principal é por meio da deficiência estrogênica, entretanto, sabe-se que pode alterar a expressão de genes de receptores de glicocorticóides resultando em redução da DMO em usuárias de DMPA quando comparada com adolescentes não usuárias (87,88).

Os efeitos do uso de progesterona em doses elevadas estão bem estabelecidos na literatura e confirmam que sua atuação sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada podem causar hipoestrogenismo, reabsorção óssea antecipada e rápida perda de massa óssea (37,89).

Os progestágenos como a Drospirenona e o Desogestrel, que mimetizam o efeito da progesterona, ativam os receptores de andrógenos por inibição competitiva, bloqueando assim, a ação androgênica endógena. Esse mecanismo de ação resulta em importantes efeitos antiandrogênicos que também se manifestam no metabolismo

ósseo, pois a testosterona desempenha papel fundamental na obtenção de massa óssea (80).

Alguns estudos que investigaram a influência dos progestágenos, presentes nas formulações dos ACHOs, não foram suficientes para esclarecer e distinguir se os efeitos sobre o metabolismo ósseo resultam da progesterona ou dos níveis reduzidos de estrogênio (80,90,91).

Entretanto, não há discordância entre os especialistas quanto a prescrição de ACHOS com doses cada vez menores de Etinilestradiol, no tocante à redução de complicações tromboembólicas(85) Ainda assim, a combinação hormonal encontrada nos ACHOs pode reduzir o nível de IGF-1, hormônio importante no crescimento e desenvolvimento do esqueleto (78).

Os hormônios Estradiol e Etinilestradiol (EE) agem em receptores estrogênicos, por meio dos mesmos mecanismos biológicos e, é reconhecida, a potência maior do EE sobre os tecidos-alvos (79). Entretanto, a potente atividade estrogênica do EE não se reflete nos trabalhos que avaliaram a saúde óssea das adolescentes. Embora na atualidade sejam denominados de baixa dose, o EE apresenta equivalência cinco vezes superior ao estrogênio endógeno (85).

## **2. Justificativa**

As considerações realizadas na Linha do Tempo e na Introdução da presente Tese deixam evidente que investigações sobre as relações entre uso de ACHOs de baixa dose na adolescência e a saúde óssea têm sido realizadas nas três últimas décadas, contudo, ainda não há consenso científico sobre as possíveis repercussões que possam resultar de sua utilização sobre a massa óssea na adolescência e repercussões futuras.

Diante da importância do tema e das lacunas do conhecimento, o presente estudo se diferencia e apresenta ineditismo em relação ao tempo de acompanhamento de adolescentes por período de 24 meses, por utilizar a faixa etária da etapa tardia da adolescência, 15 a 20 anos, como também, pela avaliação das concentrações do S-CTx como biomarcador de reabsorção óssea.

O desenvolvimento dessa Tese pretende ampliar a compreensão das relações do uso de ACHOs sobre a saúde óssea de adolescentes usuárias de anticoncepcionais ao longo de 2 anos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar em adolescentes ao longo de dois anos, a interferência da exposição ao uso das combinações de anticoncepcionais hormonais orais de baixa dose Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg ou Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg, sobre a saúde óssea avaliada por intermédio de biomarcadores de formação, fosfatase alcalina, osteocalcina e de reabsorção, telopeptídeo carboxiterminal e pela realização da Densidade Mineral Óssea.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Todos os objetivos elencados contemplam análises entre os momentos da coorte ao longo dos dois anos e estão descritos abaixo:

Determinar e comparar as concentrações dos marcadores bioquímicos de formação (FAO e OC) e reabsorção óssea (S-CTx) e os resultados advindos da realização da Densitometria Mineral Óssea em região lombar, corpo total e subtotal entre grupos e nos momentos 0 e 24 meses.

Avaliar e analisar a evolução absoluta e em percentual dos marcadores de remodelação óssea (osteocalcina e fosfatase alcalina e S-CTx) e da Densidade Mineral Óssea entre os momentos: 0 a 24 meses e compará-los entre os grupos de adolescentes, controles e usuárias de anticoncepcionais.

## **4. Método**

### **4.1. Desenho, participantes e local do estudo**

Trata-se de estudo controlado paralelo não randomizado, sendo as participantes voluntárias acompanhadas por período de dois anos, quando incluídas no atual estudo. A seleção da amostra ocorreu no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, no ambulatório de Medicina de Adolescentes, Ambulatório de Convênios - Adolescentes e, no Instituto de Atendimento à Mulher do Município de Assis-SP.

O projeto teve aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu e respeitou todas as orientações para pesquisas envolvendo seres humanos sob o número CAAE: 52928416.6.0000.5411 (Anexo 1) e foi aprovada emenda sob o número 2.766.807 (Anexo 2) para dar continuidade à coleta de dados. Os financiamentos que viabilizaram o desenvolvimento desta pesquisa foram o Auxílio Pesquisa FAPESP número 15/04040-2 e patrocínio da Unimed – Assis (Anexo 3).

As participantes e/ou responsáveis foram informados a respeito de todos os procedimentos da coleta de dados e, ao autorizarem a participação assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 4) sendo que, quando maiores de 18 anos de idade foi assinado por elas e, quando menores de 18 anos, o responsável assinou o TCLE e a adolescente o Termo de Assentimento.

### **4.2 Critérios de elegibilidade, inclusão, não inclusão e exclusão**

Os critérios de inclusão foram: idade entre 15 e 20 anos, com estatura entre o 5º e 95º percentil para cada faixa de idade e índice de massa corporal (IMC) variando

entre o 5º percentil e menor que 95º percentil (4), com ciclos menstruais regulares, estadiamento de desenvolvimento puberal de Mamas M4 ou M5, pelo critério de Tanner(1), não ter utilizado anticoncepcional previamente, sem comorbidades, nuligesta e que tinham assinado o Termo de Assentimento ou quando coube, o TCLE.

Os critérios de não inclusão foram: tabagismo, etilismo, história de prematuridade ou baixo peso ao nascimento, corticoterapia prolongada ou utilização de medicamentos que sabidamente afetam o metabolismo ósseo negativamente, como anticonvulsivantes, anticoagulantes, antirretrovirais e antiácidos com alumínio assim como suplementação com cálcio e /ou ferro, prática de exercícios físicos em tempo superior a duas horas semanais, diferente do previsto no calendário escolar do país.

Os critérios de descontinuidade foram: as participantes que mudaram o método contraceptivo proposto pelo estudo, por vontade própria ou por indicação médica, que engravidaram, ou que por motivos particulares não desejaram continuar nesse estudo, adolescentes pertencentes ao grupo controle, foram excluídas por apresentarem necessidade de prescrição de algum método contraceptivo, o que invalidava sua permanência no grupo controle.

Também foram excluídas do estudo aquelas que não compareceram no dia agendado para realizarem sua densitometria ou coleta sanguínea. A todas foram oferecidos novos agendamentos, em dias próximos aos definidos para realização dos exames. Caso não comparecessem nas três oportunidades oferecidas, para realização dos exames, eram excluídas.

Mesmo que excluídas do estudo, 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, faziam contato ou enviavam mensagens.

### **4.3 Composição dos grupos e cálculo amostral**

Baseando-se em estudos prévios, realizados com adolescentes, sob as mesmas condições do presente estudo (91,92) admitiu-se nível de significância de 5% para o intervalo de confiança de 95%, aceitou-se distribuição normal, com  $z=1,96$ , realizou-se o cálculo da amostra.

Diante disso, o cálculo amostral de adolescentes a serem incluídas em todos os grupos propostos no atual estudo, foi baseado em pré-teste quando foram obtidos marcadores de formação óssea (FAO e OC), em um grupo que utilizou EE 20 µg/Desogestrel 150 µg, por período de um ano, tendo-se observado a redução média da FAO de  $11\text{U/L} \pm 23$ , redução máxima de 74 U/L e aumento máximo de 21U/L. Para a OC, a redução média observada foi de  $3\text{ng/mL} \pm 7$ , com redução máxima de 19ng/mL e aumento máximo de 12ng/mL.

Para o pré-teste do grupo que utilizou EE 30 µg/ Drospirenona 3 mg por período de um ano, houve redução média da FAO de  $8\text{U/L} \pm 11$ , redução máxima de 32U/L e aumento máximo de 5 U/L. Para a OC, a redução média observada foi de  $4\text{ng/mL} \pm 4$ , redução máxima de 8 ng/mL e aumento máximo de 1ng/mL.

Supondo amostra aleatória simples, erros tipo I e tipo II iguais a 0,05 e 0,20, respectivamente, distribuição normal para os desfechos “redução da FAO” e “redução

da OC”, em um ano, e desvios-padrão da “redução da FAO” iguais nos Grupos ACHO1 e ACHO2 a 23 e 11, respectivamente, seriam necessárias 35 participantes por grupo, para se detectar estatisticamente uma diferença de 12 U/L na evolução da FAO entre os grupos e, para a variável, “redução da OC”, supondo desvios-padrão nos grupos ACHO1 e ACHO2, iguais a 7 e 4, respectivamente, seriam necessários 32 por grupo, para se detectar uma diferença de 4 pontos na evolução da OC.

Para responder as perguntas desta pesquisa foram compostos inicialmente dois grupos, um com participantes que necessitavam da prescrição de método contraceptivo e outro, com participantes não usuárias de qualquer método contraceptivo, que compuseram o Grupo Controle.

As participantes que referiram ter vida sexual ativa, receberam orientações sobre todos os demais métodos contraceptivos e as que optaram por ACHO, compuseram a base do grupo estudo.

As participantes do grupo ACHO foram distribuídas em dois grupos, sendo que cada um deles fez uso de uma das duas combinações de dose propostas. O grupo ACHO1 foi composto por participantes submetidas ao uso de Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg e, o grupo ACHO2 foi submetido ao uso de Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg. O Grupo Controle não recebeu nenhum tipo de ACHO ou tratamento placebo.

Assim, foram constituídos para análise três grupos, a saber: Grupo Controle, e dois grupos estudo, ACHO1 e ACHO2. Todas as participantes dos grupos ACHO foram orientadas sobre a forma correta do uso do ACHO e incentivadas ao uso de dupla proteção, para prevenção quanto às Infecções Sexualmente Transmissíveis, por meio do uso do preservativo masculino.

A composição dos grupos considerou a situação da atividade sexual no momento da inclusão no estudo, e participar do estudo não interferiu ou influenciou sobre a decisão de iniciar ou interromper tanto a atividade sexual quanto o uso de ACHO, entretanto, todas foram acompanhadas e orientadas pelos Serviços de Medicina do Adolescente quanto à atenção integral que lhes é dispensada.

#### 4.3.1 Coleta de dados

Os três grupos foram acompanhados por dois anos e avaliados de três em três meses, em consultas agendadas ou caso apresentassem alguma necessidade de aconselhamento em consulta extra à rotina.

No que tange aos exames que foram obtidos e analisados para o atual estudo, foram incluídos aqueles obtidos em dois momentos distintos, sendo o 1º momento denominado inicial, o 2º momento com 24 meses após o início da coleta de dados no momento inicial.

Todas as participantes foram submetidas nos dois momentos à avaliação antropométrica, maturação sexual, maturação esquelética, coleta de sangue para dosar os marcadores de metabolismo ósseo e realização de densitometria óssea.

A coleta de dados pessoais e clínicos foram realizadas em sala adequada, previamente reservada para este fim. Os exames de DMO, Idade óssea foram realizados no setor de Radiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Todos os procedimentos de coleta seguiram rigorosamente a mesma sequência.

#### **4.5 Avaliação antropométrica**

Para obtenção das variáveis antropométricas, utilizou-se uma balança eletrônica da marca Filizola, com precisão de 0,1Kg para obtenção do peso corporal. Para aferição da estatura, utilizou-se estadiômetro, com precisão de 0,1 cm em posição ortostática, de costas para a escala de medida, com os pés unidos, e olhar dirigido para frente, descalça. Para obtenção dessas medidas, vestiram o mínimo de roupa possível.

As técnicas utilizadas para a mensuração dessas variáveis foram aquelas propostas por Jelliffe em 1968 (93). Buscando obter outros indicadores nutricionais dos adolescentes, de posse das medidas de peso corporal e estatura, foi calculado o IMC mediante a fórmula matemática:  $IMC = \text{Peso Corporal (Kg)} / \text{Estatura (m}^2\text{)}$ .

#### **4.6 Avaliação dos estágios de Maturação Sexual e de Maturação Esquelética**

A avaliação dos estágios de maturação sexual foi realizada por médica experiente, através da inspeção visual de mamas e pelos pubianos, o resultado foi confrontado aos critérios de Tanner (1,94).

A avaliação da maturação esquelética foi obtida pela obtenção da idade óssea (IO). O método utilizado foi o de Greulich & Pyle(95) chamado de método GP, em que se faz a radiografia de mão e punho a ser posteriormente comparada ao Atlas. Este exame foi realizado sob supervisão e orientação de profissional especializado, sem prévio conhecimento a que grupo a adolescente pertencia (cegamento do avaliador).

#### **4.7 Marcadores de metabolismo ósseo**

Diante das recomendações efetuadas pela literatura, foram avaliados os seguintes marcadores bioquímicos de remodelação óssea: osteocalcina (OC), fosfatase alcalina óssea (FAO) e o telopeptídeo carboxiterminal (S-CTx).

Esta escolha foi embasada pela alta especificidade e sensibilidade apresentada pela FAO, pela OC, marcadores ósseos de formação, e pelo S-CTx, marcador ósseo de reabsorção, segundo pesquisas apresentadas pela literatura nacional e internacional (37,41,47,48,73,96–99), e pela tradição em pesquisa sobre osteometabolismo, desenvolvida neste serviço, onde se utilizou os mesmos marcadores para o gênero masculino e feminino (41,47,99).

A coleta de sangue no grupo controle não foi realizada de forma sistematizada durante a mesma fase do ciclo menstrual, tanto quando da inclusão no estudo como após 24 meses, isso porque não há consenso na literatura sobre a influência das fases do ciclo menstrual sobre os marcadores ósseos analisados.

Amostras de sangue foram obtidas pela manhã, após 10 horas de jejum pelas adolescentes, e coletadas por técnicos treinados de laboratório ou técnicas de enfermagem, sendo enviadas ao Laboratório Central do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

As Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa e centrifugadas por 15 minutos a 1.500 g para a separação do soro; as amostras de soro foram armazenadas a -80 °C até a análise dos biomarcadores fosfatase alcalina (FAO) e osteocalcina (OC). Após essas testagens, a outra fração das amostras foi encaminhada ao Centro de Doenças Osteometabólicas da UNIFESP (CEDOM).

#### 4.7.1 Osteocalcina (OC)

A osteocalcina foi dosada através do Metra™ Osteocalcin EIA kit – Biosystems como indicador de remodelação óssea. O imunoensaio Metra™ Osteocalcin, competitivo, mediu quantitativamente a osteocalcina intacta no soro. A OC ou proteína óssea gla (GP) foi dosada pelo método MicroVue Osteocalcin EIA (enzyme immunoassay) kit da QUIDEL® (USA, CA, San Diego), como indicador da remodelação óssea.

O imunoensaio é teste de ELISA competitivo que quantifica somente a OC intacta e não detecta fragmentos de tecido ósseo reabsorvido. Para realização deste teste foram utilizadas microplacas de 96 alvéolos previamente tratadas com osteocalcina e sobre estes alvéolos já tratados, foram adicionados 25µL de cada padrão reconstituído, controles e amostras de soro dos indivíduos testados.

Em seguida, foi adicionado 125µl de anticorpo anti-osteocalcina, com posterior incubação de 120 minutos a temperatura ambiente e lavagem da placa com 30µl de tampão de lavagem, por três vezes. Após lavagem da placa e retirada do anticorpo anti-osteocalcina, foi adicionado a IgG anti-camundongo conjugada com fosfatase alcalina, com posterior incubação por 60 minutos, a temperatura ambiente.

A placa foi lavada novamente conforme descrito anteriormente e adicionado o substrato contendo 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. A obtenção das concentrações de osteocalcina nas amostras de soro foram obtidas através da fórmula  $y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$ . O intervalo de concentração

utilizado para o teste foi de 1,6 a 2,8 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 é de 5 a 10,0% para o intra-ensaio e 5 a 8% para o inter-ensaio. A leitura foi realizada em microleitor de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm. O ensaio foi realizado no Laboratório Experimental da Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.

#### 4.7.2 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina específica do osso foi medida quantitativamente no soro através do o MicroVue BAP (enzyme immunoassay) kit da QUIDEL® (USA, CA, San Diego), como um indicador da atividade osteoblástica. O imunoensaio é um teste que utiliza um anticorpo monoclonal anti FAO como captura e adsorvido à superfície dos alvéolos da microplaca de 96 orifícios.

Este anticorpo monoclonal, 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 isto, um volume de 20 µL de soro, controles e padrão adicionados, constituído por 125µL de tampão de ensaio serão acrescidos conjuntamente à placa.

Após a retirada das amostras de soro, padrão e controles a placa foi então lavada quatro vezes com tampão de lavagem e adicionado 150 µL do pNPP. O desenvolvimento de cor ocorreu num período de 30-35 minutos à temperatura ambiente, a reação bloqueada com NaOH 0,5N e a leitura realizada em leitor de Elisa TP Reader, Thermo Plate, em comprimento de onda de 405 nm. A obtenção das

concentrações de FAO nas amostras de soro foi obtida 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 este ensaio fornecido pelo fabricante é 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 foi de 3,9 a 5,8% para o intra-ensaio e 5,0 a 7,6% para o inter-ensaio. A leitura foi realizada em microleitor de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm. O ensaio foi realizado no Laboratório Experimental, Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.

#### 4.7.3 Telopectídeo carboxiterminal (S-CTx)

O S-CTx foi dosado pelo kit Elecsys  $\beta$ -CrossLAPS/ serum por eletro-  
imunoquimioluminescência ou ECLIA em equipamento automatizado ELECSYS-  
ROCHE TM (RocheTM, Indianapolis, IN, EUA), coeficiente de variação inter-ensaio  
foi de 5%.

É um ensaio específico para isômeros interligados de fragmentos de colágeno do tipo I, independente de sua natureza.

A especificidade do teste é garantida através do uso de dois anticorpos monoclonais, os quais reconhecem de forma linear os octapeptídeos  $\beta$ -8AA. Portanto a metodologia empregada quantifica a forma beta do ácido aspártico do telopeptídeos C-Terminais ( $\beta$ -CTx). Essas dosagens foram realizadas pelo Centro de Doenças Osteometabólicas da UNIFESP (CEDOM).

#### **4.8 Densitometria óssea (DXA)**

As participantes foram agendadas e submetidas à avaliação da massa óssea mediante exame de densitometria óssea (DXA), utilizando aparelho Hologic QDR 4500. A técnica baseia-se na atenuação, pelo corpo do paciente, de um feixe de radiação gerado por uma fonte de raio-X com dois níveis de energia.

Os resultados demonstraram CV de 0,6% e 1,3% para a coluna lombar e corpo total, os resultados das densidades foram expressos em g/cm<sup>2</sup> e do conteúdo mineral ósseo (BMC) em gramas.

Para o exame de coluna lombar, a dose que o paciente recebe é de 6,7 a 31 µSV e uma dose ainda menor no exame de corpo total, dose semelhante àquela a qual seria exposta em um banho de sol.

O examinador localizou a coluna lombar nas vértebras de L1 a L4, corpo total e subtotal (com exclusão do segmento da cabeça). Assim obtivemos resultados para cada um dos locais relacionados a área total em cm<sup>2</sup> da região, DMO expressa em g/cm<sup>2</sup> e o CMO em g.

A avaliação foi efetuada por um único avaliador experiente e treinado para tal aferição. A varredura foi obtida na posição supina para coluna vertebral e corpo total.

Para obtenção dos dados relativos à coluna vertebral, utilizou-se um apoio para os membros inferiores de maneira que fosse mantida uma flexão do joelho de 90 graus na região coxofemoral. Este procedimento visou retificar a lordose fisiológica e com isto obter uma separação ideal entre as vértebras lombares.

O nível de varredura foi estabelecido de 1 a 2 centímetros abaixo das cristas ilíacas, a aquisição da imagem foi obtida no sentido caudo-cranial, sendo o exame interrompido com a visualização na tela do monitor da 12<sup>a</sup> vértebra torácica.

Para a obtenção da Densitometria de Corpo Total, a paciente permaneceu centrada na mesa, com a cabeça a 2,5 cm abaixo da linha horizontal, que demarca até onde o braço do scanner alcança. Braços ao longo do corpo e palmas das mãos apoiadas na mesa. Utilizaram-se cintas para a paciente não mover as pernas e os pés, nem o restante do corpo.

Pelo emprego da Densitometria de Corpo Total pode-se também proceder à análise da composição corporal, pois é método de grande acurácia (100). Todas as avaliações, acima referidas, foram executadas mantendo-se total privacidade.

Seguiu-se o protocolo de instruções do fabricante do aparelho e as normas preconizadas pela Sociedade Internacional de Densitometria (101–103). Ressalta-se que a quantidade de radiação a que as adolescentes foram expostas é considerada segura e sem prejuízo para sua saúde atual e futura.

## **5.0 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram armazenados e analisados no programa software SPSS 21. Quanto à análise estatística, iniciou-se pela verificação da homogeneidade entre os grupos. Pressuposições dos testes foram avaliados utilizando-se os testes de Levene para homogeneidade de variâncias e Shapiro-Wilk para normalidade dos dados.

Para a caracterização de cada grupo foi realizada estatística descritiva, apresentando-se mediana e valores extremos, média e desvio padrão. Para a comparação entre os três grupos estudados (Controle, ACHO1 e ACHO2), nos diferentes momentos (momento inicial e momento vinte e quatro (24) meses) foi realizado teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas,

tendo distribuição normal a variável analisada. Em caso de não atendimento à hipótese de normalidade, o efeito dos grupos foi avaliado por meio do teste de Kruskal Wallis e teste de Dunn. Para todas as análises foi considerado o nível de 5% de significância.

## **Resultados**

Os resultados da presente Tese encontram-se na Parte II e serão apresentados no formato de artigos.

## Referências

1. Tanner JM. Growth at adolescence : with a general consideration of the effects of hereditary and environmental factors upon growth and maturation from birth to maturity [Internet]. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Oxford; 1962. Available from: <https://trove.nla.gov.au/work/231801954>
2. WHO WHO. Young People's Health - a Challenge for Society. Report of a WHO Study Group on Young People and Health for All. In: Technical Report Series 731 [Internet]. Geneva: WHO, World Health Organization; 1986. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41720/WHO\\_TRS\\_731.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41720/WHO_TRS_731.pdf?sequence=1)
3. IBGE I brasileiro de G e E. IBGE. Atlas do censo demográfico 2010 [Internet]. RIO DE JANEIRO: IBGE; 2013. Available from: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9290-criancas-e-adolescentes.html?=&t=resultados>
4. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Mei Z, Wei R, Curtin LR, Roche AF JC. 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. Vital Heal Stat 11 [Internet]. 2002;246:1–190. Available from: [https://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr\\_11/sr11\\_246.pdf](https://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr_11/sr11_246.pdf)
5. Eisenstein E. Adolescência: definições, conceitos e critérios. Adolescência & Saúde [Internet]. 2005;2 (2):6–7. Available from: [http://adolescenciaesaude.com/imagebank/PDF/v2n2a02.pdf?aid2=167&nome\\_en=v2n2a02.pdf](http://adolescenciaesaude.com/imagebank/PDF/v2n2a02.pdf?aid2=167&nome_en=v2n2a02.pdf)
6. CAMPOS DM de S. Psicologia e desenvolvimento humano. In: Psicologia e

- desenvolvimento humano. Vozes,; 2003. 108–108 p.
7. Eisenstein E. Adolescência: Definições, conceitos e critérios. *Adolesc Saude* [Internet]. 2005;2005. Available from:  
[http://www.adolescenciaesaude.com/detalhe\\_artigo.asp?id=167](http://www.adolescenciaesaude.com/detalhe_artigo.asp?id=167)
  8. Colli AS. Conceito de adolescência: Pediatría Basica. SAVIER, editor. São Paulo; 1985.
  9. Aberastury A. Adolescência Normal:Um Enfoque Psicanalítico. Porto Alegre: Artmed; 2003. 96 p.
  10. Reuter C, Stein CE, Vargas DM. Massa óssea e composição corporal em estudantes universitários. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2012 May;58(3):328–34. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423012705171>
  11. Borges ALV, Schor N. Início da vida sexual na adolescência e relações de gênero: um estudo transversal em São Paulo, Brasil, 2002. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2005 Apr;21(2):499–507. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2005000200016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2005000200016&lng=pt&tlng=pt)
  12. Olsen JM, Lago TDG, Kalckmann S, Alves MCGP, Escuder MML. Práticas contraceptivas de mulheres jovens: Inquérito domiciliar no município de São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2018;34(2).
  13. Lara LAS, Abdo CHN. Age at Time of Initial Sexual Intercourse and Health of Adolescent Girls. *J Pediatr Adolesc Gynecol* [Internet]. 2016 Oct;29(5):417–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpag.2015.11.012>
  14. Carmita Helena NA. . 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 [Internet]. 2016 [cited 2020 Feb 3]. Available from: [jornal.usp.br/?p=105255](http://jornal.usp.br/?p=105255)
15. IBGE I brasileiro de G e E. Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar - PeNSE. [Internet]. IBGE I brasileiro de G e E, editor. RIO DE JANEIRO: IBGE; 2015. Available from: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv97870.pdf>
  16. da Silva Bouzas IC, Cader SA, Leão L. Gravidez na adolescência: Uma revisão sistemática do impacto da idade materna nas complicações clínicas, obstétricas e neonatais na primeira fase da adolescência. *Adolesc e Saude*. 2014;11(3):7–21.
  17. (OPAS/OMS) OP-A da SM da S. América Latina e Caribe têm a segunda taxa mais alta de gravidez na adolescência no mundo [Internet]. 2018. Available from: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5604:america-latina-e-caribe-tem-a-segunda-taxa-mais-alta-de-gravidez-na-adolescencia-no-mundo&Itemid=820](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5604:america-latina-e-caribe-tem-a-segunda-taxa-mais-alta-de-gravidez-na-adolescencia-no-mundo&Itemid=820)
  18. SESA/SP S de E da S de SP. Em SP, gravidez na adolescência cai ao menor nível em quase duas décadas [Internet]. portal do governo. [cited 2020 Nov 6]. Available from: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/ultimas-noticias/gravidez-na-adolescencia-em-sp-cai-ao-menor-nivel-em-quase-duas-decadas/>
  19. Brasil. Ministério da Saúde. Gravidez na adolescência tem queda de 17% no Brasil [Internet]. 2017. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/gravidez-na-adolescencia-tem-queda-de-17-no-brasil>
  20. Almeida T. Maternidade: quase metade das gravidezes não são planejadas

- [Internet]. 2016 [cited 2020 Nov 6]. Available from: <https://brazil.unfpa.org/pt-br/news/maternidade-quase-metade-das-gravidezes-nao-sao-planejadas>
21. WHO WHO. Global health estimates 2015: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2015 [Internet]. Geneva; 2016. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/adolescent-pregnancy>
  22. Bouzas ICS; Cader SA; Leao L. Gravidez na adolescência: uma revisão sistemática do impacto da idade materna nas complicações clínicas, obstétricas e neonatais na primeira fase da adolescência. *Adolesc e Saude* [Internet]. 2011;11:7–21. Available from: [http://www.adolescenciaesaude.com/detalhe\\_artigo.asp?id=457#](http://www.adolescenciaesaude.com/detalhe_artigo.asp?id=457#)
  23. Anderl C, Li G, Chen FS. Oral contraceptive use in adolescence predicts lasting vulnerability to depression in adulthood. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip.* 2020;61(2):148–56.
  24. UNFPA. Consecuencias socioeconómicas del embarazo en la adolescencia en seis países de América Latina. Implementación de la Metodología Milena en Argentina, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Paraguay [Internet]. Fondo de Población de las Naciones Unidas; 2020. p. 70. Available from: [https://lac.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/unfpa\\_consecuencias\\_en\\_6\\_paises\\_espanol\\_1.pdf](https://lac.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/unfpa_consecuencias_en_6_paises_espanol_1.pdf)
  25. Borges ALV, Fujimori E, Kuschnir MCC, Do Nascimento Chofakian CB, De Moraes AJP, Azevedo GD, et al. ERICA: sexual initiation and contraception in Brazilian adolescents. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2016;50(suppl 1):1s-11s. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102016000200307&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102016000200307&lng=en&tlng=en)

26. United Nations, Department of Economic and Social Affairs PD. Trends in Contraceptive Use Worldwide 2015 [Internet]. Trends in Contraceptive Use Worldwide 2015. United Nations; 2016. Available from: <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/family/trendsContraceptiveUse2015Report.pdf>
27. Abma JC, Martinez GM. Sexual Activity and Contraceptive Use Among Teenagers in the United States, 2011-2015. Natl Health Stat Report [Internet]. 2017 Jun;(104):1–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28696201>
28. Vieira LM, Saes SDO, Bini Dória AA, Lederer Goldberg TB, Dória AAB, Goldberg TBL, et al. Reflexões sobre a anticoncepção na adolescência no Brasil. Rev Bras Saúde Matern Infant [Internet]. 2006 Mar;6(1):135–40. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-38292006000100016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292006000100016&lng=pt&tlng=pt)
29. Figueiredo Regina, Pupo Lígia Rivero SNJ. Comportamento sexual e preventivo de adolescentes de São Paulo - um estudo com estudantes do ensino médio. BIS, Bol Inst Saúde [Internet]. 2008; Available from: [http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1518-18122008000300009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt#not1Cima](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1518-18122008000300009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt#not1Cima)
30. Coates V SJ. Gravidez na adolescência. In: Francoso LA, Gejer D, Reato LFN. Sexualidade e saúde reprodutiva na adolescência. São Paulo: Atheneu; 2001. 71-84. p.
31. Haberland N, Rogow D. Sexuality Education: Emerging Trends in Evidence and Practice. J Adolesc Heal [Internet]. 2015 Jan;56(1):S15–21. Available

- from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054139X14003450>
32. Compston JE. Sex Steroids and Bone. *Physiol Rev* [Internet]. 2001 Jan 1;81(1):419–47. Available from:  
<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.1.419>
  33. 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(4):1281–386.
  34. Fernández-Real JM, Ricart W. Osteocalcin: a new link between bone and energy metabolism. Some evolutionary clues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2011 Jul;14(4):360–6. Available from:  
<http://journals.lww.com/00075197-201107000-00009>
  35. Kim Y-S, Paik I-Y, Rhie Y-J, Suh S-H. Integrative Physiology: Defined Novel Metabolic Roles of Osteocalcin. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2010;25(7):985. Available from: <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2010.25.7.985>
  36. Wolff RB, Teixeira Gomes RC, Verna C, Cristofani Maioral GCC, Rampazo TC, Simões RS, et al. Aspectos moleculares dos esteroides sexuais sobre a cartilagem e os ossos. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2012 Jul;58(4):493–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423012705493>
  37. Herrmann M, Seibel MJ. The effects of hormonal contraceptives on bone turnover markers and bone health. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2010 May;72(5):571–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2265.2009.03688.x>
  38. Szulc P, Seeman E, Delmas PD. Biochemical Measurements of Bone Turnover

- in Children and Adolescents. *Osteoporos Int* [Internet]. 2000 May 1;11(4):281–94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s001980070116>
39. Elgán C, Dykes A-K, Samsioe G. Bone mineral density and lifestyle among female students aged 16–24 years. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2002 Jan 7;16(2):91–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/gye.16.2.91.98>
40. 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* [Internet]. 2005 Oct 27;23(6):476–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-005-0631-6>
41. 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)* [Internet]. 2014 Nov;90(6):624–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpdp.2014.04.007>
42. Bonjour J-P, Guéguen L, Palacios C, Shearer MJ, Weaver CM. Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. *Br J Nutr* [Internet]. 2009 Apr 1;101(11):1581–96. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114509311721/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114509311721/type/journal_article)
43. Yu H-C, Wu T-C, Chen M-R, Liu S-W, Chen J-H, Lin KM-C. Mechanical stretching induces osteoprotegerin in differentiating C2C12 precursor cells through noncanonical Wnt Pathways. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2010

- May;25(5):1128–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbmr.9>
44. Landi CA, Goldberg TBL. Saúde óssea na adolescência [Internet]. Sociedade de Pediatria de São Paulo/ Departamento de Adolescência. Atualização de Condutas em Pediatria. [cited 2021 Jan 8]. Available from: [https://www.spsp.org.br/site/asp/recomendacoes/Rec92\\_Adolescencia.pdf](https://www.spsp.org.br/site/asp/recomendacoes/Rec92_Adolescencia.pdf)
  45. Boot AM, de Ridder MAJ, van der Sluis IM, van Slobbe I, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SMPF. Peak bone mineral density, lean body mass and fractures. *Bone* [Internet]. 2010 Feb;46(2):336–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328209019693>
  46. Giacaglia LR, Martin RM, Silva RAL. Terapia nutricional em doenças ósseas. In: *Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia*. 2nd ed. Roca; 2011. p. 813-28.
  47. Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. The impact of different types of physical activity on total and regional bone mineral density in young Brazilian athletes. *J Sports Sci*. 2011;29(3):227–34.
  48. 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)* [Internet]. 2019 Sep;95(5):567–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002175571830069X>
  49. Rizzoli R, Bianchi ML, Garabédian M, McKay HA, Moreno LA. Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone* [Internet]. 2010 Feb;46(2):294–305.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840876>

50. Radominski SC, Bernardo W, Paula AP de, Albergaria B, Moreira C, Fernandes CE, et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Reumatol* [Internet]. 2017;57:452–66. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S048250041730178X>
51. 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* [Internet]. 2000 Oct;74(4):734–8. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028200007196>
52. Janz K. Physical activity and bone development during childhood and adolescence. Implications for the prevention of osteoporosis. *Minerva Pediatr* [Internet]. 2002 Apr;54(2):93–104. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981524>
53. Hosoi T. Genetic aspects of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2010 Nov 10;28(6):601–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-010-0217-9>
54. Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* [Internet]. 2002 May;359(9320):1841–50. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673602087068>
55. Davies MC, Hall ML, Jacobs HS. Bone mineral loss in young women with amenorrhoea. *BMJ* [Internet]. 1990 Oct 6;301(6755):790–3. Available from:  
<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.301.6755.790>
56. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms

- and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis\*. *Endocr Rev* [Internet]. 2000 Apr 1;21(2):115–37. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article/21/2/115/2423739>
57. Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2018 Jan;8(1):a031211. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a031211>
58. Hadji P, Colli E, Regidor P-A. Bone health in estrogen-free contraception. *Osteoporos Int* [Internet]. 2019 Dec 24;30(12):2391–400. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00198-019-05103-6>
59. Hofbauer LC. Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). *Ann Endocrinol (Paris)* [Internet]. 2006 Apr;67(2):139–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003426606725690>
60. Golden NH, Abrams SA. Optimizing Bone Health in Children and Adolescents. *Pediatrics* [Internet]. 2014 Oct 1;134(4):e1229–43. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-2173>
61. Fabbri G, Petraglia F, Segre A, Maietta-Latessa A, Galassi MC, Cellini M, et al. Reduced spinal bone density in young women with amenorrhoea. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 1991 Sep;41(2):117–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0028224391900883>
62. Drinkwater BL. Menstrual History as a Determinant of Current Bone Density in Young Athletes. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1990 Jan 26;263(4):545. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1990.0344004008>

63. Ganesan K, Balachandran C, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Effects of testosterone, estrogen and progesterone on TNF- $\alpha$  mediated cellular damage in rat arthritic synovial fibroblasts. *Rheumatol Int* [Internet]. 2012 Oct 30;32(10):3181–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00296-011-2146-x>
64. Chamoux E, Coxam V, Lebecque P, Davicco MJ, Miller SC, Barlet JP. Influence of sex steroids on development of cultured fetal rat metatarsal bones. *Growth Dev Aging* [Internet]. 1997;61(2):79–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348474>
65. Lulu C, Tianshu Z, Wenfang X, Li K. Comparison on the effects of three sex hormones on the fetal rat calvarial osteoblasts. *J Tongji Med Univ* [Internet]. 2000 Mar;20(1):59–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02887679>
66. Cadogan J, Blumsohn A, Barker ME, Eastell R. A Longitudinal Study of Bone Gain in Pubertal Girls: Anthropometric and Biochemical Correlates. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2009 Oct 27;13(10):1602–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.1998.13.10.1602>
67. Chevalley T, Bonjour JP, van Rietbergen B, Rizzoli R, Ferrari S. Fractures in Healthy Females Followed from Childhood to Early Adulthood Are Associated with Later Menarcheal Age and with Impaired Bone Microstructure at Peak Bone Mass. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2012 Nov;97(11):4174–81. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2012-2561>

68. Alexandre C. Androgens and bone metabolism. *Jt Bone Spine* [Internet]. 2005 May;72(3):202–6. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1297319X04001010>
69. Gordon CM, Zemel BS, Wren TAL, Leonard MB, Bachrach LK, Rauch F, et al. The Determinants of Peak Bone Mass. *J Pediatr* [Internet]. 2017 Jan;180:261–9. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002234761631040X>
70. Callegari ET, Garland SM, Gorelik A, Chiang CY, Wark JD. Bone turnover marker determinants in young women: results from the Safe-D study. *Ann Clin Biochem*. 2018;55(3):328–40.
71. Committee TP, Society A, Medicine R. Hormonal contraception: recent advances and controversies. *Fertil Steril* [Internet]. 2006 Nov;86(5):S229–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028206032626>
72. Maïmoun L, Renard E, Lefebvre P, Bertet H, Philibert P, Seneque M, et al. Oral contraceptives partially protect from bone loss in young women with anorexia nervosa. *Fertil Steril*. 2019;111(5):1020-1029.e2.
73. Goldberg TBL, Silva CC, Hong SN, Kurokawa CS, Capela RC DJ. Bone biomarkers and bone mineral density in healthy male adolescents: impact of biological maturation. *Acta Paediatr* [Internet]. 2009 Oct;98:1–68. Available from: [http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.2009.01482\\_1.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.2009.01482_1.x)
74. Da Silva CC, Kurokawa CS, Si Nga H, Moretto MR, Dalmas JC, Goldberg TBL. Bone metabolism biomarkers, body weight, and bone age in healthy Brazilian male adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012;25(5–6):479–84.
75. Jürimäe J. Interpretation and application of bone turnover markers in children

- and adolescents. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2010 Aug;22(4):494–500.  
Available from: <http://journals.lww.com/00008480-201008000-00018>
76. Tuchman S, Thayu M, Shults J, Aemel B, Burnham J, Leonard M.  
Interpretation of Biomarkers of Bone Metabolism in Children : Impact of. *J Pediatr*. 2008;153:484–90.
77. Lucas R, Martins A, Monjardino T, Caetano-Lopes J, Fonseca JE. Bone Markers Throughout Sexual Development: Epidemiological Significance and Population-Based Findings. In 2016. p. 1–34. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7745-3\\_26-1](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7745-3_26-1)
78. Southmayd EA, De Souza MJ. A summary of the influence of exogenous estrogen administration across the lifespan on the GH/IGF-1 axis and implications for bone health. *Growth Horm IGF Res* [Internet]. 2017 Feb;32:2–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096637416300521>
79. Stanczyk FZ, Archer DF, Bhavnani BR. Ethinyl estradiol and 17 $\beta$ -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception* [Internet]. 2013 Jun;87(6):706–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010782412010797>
80. WIREN K. Androgens and bone growth: it's location, location, location. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2005 Dec;5(6):626–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489205001475>
81. Jürimäe J, Vaiksaar S, Mäestu J, Purge P, Jürimäe T. Adiponectin and bone metabolism markers in female rowers: Eumenorrhic and oral contraceptive users. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(11):835–9.

82. Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. 2002 Feb;46(1):72–8. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302002000100010&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302002000100010&lng=pt&tlng=pt)
83. Goshtasebi A, Subotic Brajic T, Scholes D, Beres Lederer Goldberg T, Berenson A, Prior JC. Adolescent use of combined hormonal contraception and peak bone mineral density accrual: A meta-analysis of international prospective controlled studies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;90(4):517–24.
84. Nappi C, Bifulco G, Tommaselli GA, Gargano V, Di Carlo C. Hormonal contraception and bone metabolism: A systematic review. *Contraception* [Internet]. 2012;86(6):606–21. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.contraception.2012.04.009>
85. Agostino H, Di Meglio G. Low-dose Oral Contraceptives in Adolescents: How Low Can You Go? *J Pediatr Adolesc Gynecol* [Internet]. 2010 Aug;23(4):195–201. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083318809003520>
86. Bachrach LK. Hormonal Contraception and Bone Health in Adolescents. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2020 Aug 21;11(August):1–8. Available from:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.00603/full>
87. 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.

88. Lara-Torre E, Edwards CP, Perlman S, Hertweck SP. Bone mineral density in adolescent females using depot medroxyprogesterone acetate. *J Pediatr Adolesc Gynecol* [Internet]. 2004 Feb;17(1):17–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083318803002419>
89. Prince RL, Dick IM, Beilby J, Dhaliwal SS, Devine A. A cohort study of the effect of endogenous estrogen on spine fracture risk and bone structure in elderly women and an assessment of its diagnostic usefulness. *Bone* [Internet]. 2007 Jul;41(1):33–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S875632820700172X>
90. Wiren KM, Toombs AR, Semirale AA, Zhang X. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: Requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone* [Internet]. 2006 May;38(5):637–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328205004357>
91. Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Bone mineralization among male adolescents: Critical years for bone mass gain. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80(6):461–7.
92. Oliveria MRM de. Bone Mineral Density in Healthy Female Adolescents According to Age, Bone Age and Pubertal Breast Stage. *Open Orthop Journal* [Internet]. 2011 Sep 12;5(1):324–30. Available from: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOORTHJ-5-324>
93. Jelliffe, E. F. P. ; Jelliffe DB. Anthropometry in action. I. Dental second year malnutrition. (Practical age-grouping in young children in areas without birth verification.). *J Trop Pediatr* [Internet]. 1968;14:71–4. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19702901066>

94. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291–303.
95. Reynolds E. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. By W. W. Greulich and S. I. Pyle. Stanford University Press, 1950, xiii + 190 pp., (\$10.00). *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 1950 Dec;8(4):518–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajpa.1330080429>
96. Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1999;43(6):415–22.
97. Cremers S, Garnero P. Biochemical Markers of Bone Turnover in the Clinical Development of Drugs for Osteoporosis and Metastatic Bone Disease. *Drugs* [Internet]. 2006;66(16):2031–58. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200666160-00001>
98. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):443–9.
99. Biazon TP, Goldberg TBL, Kurokawa CS, Moretto MR, Teixeira AS, Nunes HR de C, et al. Low-dose combined oral contraceptive use is associated with lower bone mineral content variation in adolescents over a 1-year period. *BMC Endocr Disord* [Internet]. 2015 Dec 3;15(1):15. Available from: <http://bmcendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12902-015-0012-7>
100. Brandão CMA, Vieira JGH. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. *Arq*

- Bras Endocrinol Metabol [Internet]. 1999 Dec;43(6):401–8. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27301999000600003&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301999000600003&lng=pt&tlng=pt)
101. Gordon CM, Leonard MB, Zemel BS. 2013 Pediatric Position Development Conference: Executive Summary and Reflections. J Clin Densitom [Internet]. 2014 Apr;17(2):219–24. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094695014000286>
102. 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 [Internet]. 2019 Oct;22(4):453–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094695019301477>
103. ISCD TIS for C lensitometry. Official Positions Pediatric. [Internet]. Copyright ISCD. 2019 [cited 2020 Dec 17]. Available from:  
<https://iscd.app.box.com/s/ae9gusunsr6e0fmxkqxosaczmnuhujx4>
104. Shieh A, Han W, Ishii S, Greendale GA, Crandall CJ, Karlamangla AS. Quantifying the balance between total bone formation and total bone resorption: An index of net bone formation. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(7):2802–9.

*PARTE II*  
*Artigo*

Artigo Original redigido de acordo com as normas para publicação no periódico Maturitas para a qual será submetido.

Qualis A2 MED III – FI: 3.630. <https://www.journals.elsevier.com/maturitas>

## **IMPACTO DE DUAS COMBINAÇÕES DE ANTICONCEPCIONAIS ORAIS DE BAIXA DOSE SOBRE A MASSA ÓSSEA DE ADOLESCENTES: ENSAIO CLÍNICO COM DOIS ANOS DE ACOMPANHAMENTO**

Talita Domingues Caldeirão<sup>1,2</sup>, Carla Cristiane da Silva<sup>3</sup>, Lilian Rodrigues Orsolini<sup>1,2</sup>, Altamir Santos Teixeira<sup>4</sup>, Hélio Rubens de Carvalho Nunes<sup>5</sup>, Tamara Beres Lederer Goldberg<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Tocogynecology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Assis Municipality Educational Foundation (FEMA), Medical School, Assis, SP, Brazil; <sup>3</sup>State University of Londrina - UEL, Londrina, Parana – Brazil; <sup>4</sup>São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil, Dept Trop Dis & Diagnost Imaging, UNESP, Sao Paulo – Brazil; <sup>5</sup>São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

### **\*Corresponding author**

Tamara Beres Lederer Goldberg <sup>1\*</sup>

Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP,

Department of tocogynecology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil,

CEP 18618-687

Phone: +55 (14) XXXXX. Email: [tamara.goldberg@unesp.br](mailto:tamara.goldberg@unesp.br)

### **Highlights**

- ✓ O uso de contraceptivos hormonais orais de baixa dose, por período de dois anos, por adolescentes de 15 a 20 anos, se associa a efeitos negativos sobre a massa óssea, sendo este efeito mais evidente entre as que utilizaram a combinação Etinilestradiol 30 µg/Drospirenona 3mg.
- ✓ Usuárias de contraceptivos hormonais orais de baixa dose apresentam menor concentração de marcadores de formação óssea quando confrontados aos resultados de adolescentes não usuárias de contraceptivos, possivelmente refletindo comprometimento osteo metabólico.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar em adolescentes, ao longo de dois anos, a interferência sobre o incremento de massa óssea resultante ao uso de duas combinações de anticoncepcionais hormonais orais de baixa dose Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg (ACHO1) ou Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg (ACHO2), por intermédio da realização de densitometria óssea (BMD) e de biomarcadores de remodelação óssea.

**Desenho do Estudo:** Ensaio clínico controlado paralelo não randomizado com participação de 127 adolescentes, divididas nos grupos controle e expostas a anticoncepcionais ACHO 1 e ACHO 2, submetidas à avaliação antropométrica, dos caracteres sexuais secundários (critérios de Tanner), da idade óssea (IO). Obtidos Densitometria Óssea por atenuação de raio X de dupla energia (DXA) e dosagem de biomarcadores ósseos fosfatase alcalina óssea (BAP) e osteocalcina (OC) e telopetídeo carboxiterminal (S-CT-x) no momento inicial e após 24 meses.

**Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis analisadas entre as usuárias de ACHO 1, ACHO 2 e o grupo controle, no momento basal. Após 24 meses de observação, as não usuárias incorporaram mais massa óssea (conteúdo e densidade) que ambos os grupos que utilizaram anticoncepcional, sendo o impacto negativo mais evidente no grupo ACHO2 frente ao grupo ACHO 1. Redução significativa nos valores percentuais de fosfatase alcalina óssea e osteocalcina foram observados nas usuárias de contraceptivos orais.

**Conclusões:** Observou-se prejuízo na aquisição de massa óssea em adolescentes usuárias de anticoncepcionais hormonais combinados sendo mais evidente o impacto negativo nas adolescentes usuárias de anticoncepcionais que continham EE 30µg/Drospirenona 3 mg.

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

## 1. Introdução

A osteoporose é uma doença osteometabólica caracterizada pela deterioração da microarquitetura e fragilidade ósseas. É responsável por gastos financeiros expressivos pelo sistema de saúde, em consequência ao seu principal desfecho, as fraturas [1].

Sabe-se que a massa óssea se reduz a partir dos 30 anos de idade, de 1 a 2% ao ano, nas mulheres e que, dos 50 anos de idade em diante, 30% delas provavelmente terão algum tipo de agressão à sua massa óssea [2]. Além disso, destaca-se que a saúde óssea na maturidade é reflexo da massa óssea incorporada na infância e, principalmente, na adolescência sendo um dos principais fatores na prevenção de doenças crônicas como a osteopenia/osteoporose e fraturas subsequentes[3–5]. Assim, atingir o pico ideal de massa óssea durante a adolescência torna-se relevante.

A saúde óssea é influenciada por fatores endógenos e exógenos, dentre os exógenos citamos os medicamentos, dentre os quais os contraceptivos em suas diversas apresentações, injetáveis, os orais e aqueles prescritos por outras vias. O estrogênio, no caso Etinilestradiol (EE), hormônio sintético derivado do estrogênio endógeno 17- $\beta$  estradiol, compõe a maioria das combinações de anticoncepcionais que pode interferir no processo de formação e reabsorção da massa óssea. Eles têm sido utilizados em idades mais precoces, em decorrência da iniciação antecipada de adolescentes à atividade sexual, como método de proteção à sua saúde sexual e reprodutiva [3,6].

O estrogênio é fator importante na regulação do metabolismo do tecido ósseo, pois afeta positivamente a formação e proliferação dos osteoblastos, enquanto

simultaneamente inibe a apoptose de osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea [7]- Contudo, as atividades descritas parecem ser idade dependente [8,9].

A maioria dos anticoncepcionais hormonais orais contém estrogênio e progestagênio, sendo reconhecida a potência mais elevada do EE sobre os tecidos alvo [10], entretanto, a potente atividade estrogênica do EE não se reflete em evidências positivas, quando avaliamos a saúde óssea das adolescentes, sendo os resultados apresentados na literatura ainda conflitantes [5,10,11].

Assim, objetiva-se avaliar em adolescentes, ao longo de dois anos, a interferência sobre a aquisição da massa óssea frente ao uso das combinações de anticoncepcionais hormonais orais de baixa dose Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg ou Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg, por intermédio da realização de densitometria mineral óssea (BMD) e da avaliação de biomarcadores séricos de remodelação óssea.

## **2. Sujeitos e métodos**

### **2.1 Desenho do estudo e participantes**

Trata-se de ensaio clínico controlado paralelo não randomizado, sendo as participantes voluntárias acompanhadas por período de dois anos A seleção da amostra ocorreu no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, no ambulatório de Medicina de Adolescentes. O projeto teve aprovação Comitê de Ética em Pesquisa CAAE: 52928416.6.0000.5411. As participantes e seus pais ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram incluídas adolescente entre 15 e 20 anos de idade, com estatura entre o 5o e 95o percentil para a idade e índice de massa corporal (IMC) entre o 5o percentil e menor que 95o percentil, com ciclos menstruais regulares, estadiamento de Mamas M4 ou M5, pelo critério de Tanner(12), que não utilizaram anticoncepcional previamente, nuligestas e sem comorbidades.

Os critérios de não inclusão foram: diabetes mellitus, desnutrição aguda ou crônica, doenças ósseas congênitas ou adquiridas, doenças gastrintestinais acompanhadas de má-absorção, história de nefropatia, com ou sem insuficiência renal crônica, endocrinopatias, puberdade precoce ou atrasada, fibrose cística, doença psiquiátrica severa, doença celíaca, tabagismo, etilismo, história de prematuridade ou baixo peso ao nascimento, corticoterapia prolongada ou utilização de medicamentos que sabidamente afetam o metabolismo ósseo negativamente, como anticonvulsivantes, anticoagulantes, antirretrovirais e antiácidos com alumínio assim como suplementação com cálcio e /ou ferro, prática de exercícios físicos consistentes (aeróbico e/ou musculação) ou com frequência superior a duas horas semanais, como preconizado pelo calendário escolar do país.

As participantes foram excluídas caso mudassem o método contraceptivo proposto, por vontade própria ou por indicação médica, caso engravidassem, ou se por motivos particulares não desejassem permanecer no estudo. Aquelas pertencentes ao grupo controle foram excluídas caso necessitassem de prescrição de método contraceptivo ou por desistência no acompanhamento.

Foram excluídas aquelas que não compareceram no dia agendado para realizarem sua densitometria ou coleta sanguínea. A todas foram oferecidos novos agendamentos, em dias próximos aos definidos para realização dos exames. Caso

não comparecessem nas três oportunidades oferecidas, foram excluídas. A todas foram oferecidos os mesmos cuidados de saúde prestados às que permaneceram no estudo.

As adolescentes compuseram três grupos, dois deles com prescrição de anticoncepcionais, sendo que o grupo ACHO1 recebeu Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg e o grupo ACHO2, utilizou Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg.

As adolescentes controles não apresentaram necessidade de uso de contraceptivo. Todas as participantes dos grupos ACHO foram orientadas e incentivadas ao uso de dupla proteção.

## 2.2. Avaliação Antropométrica

Obteve-se o peso corporal, a estatura e calculou-se o índice de massa corpórea (IMC) [12]. A avaliação da maturação sexual foi realizada pela inspeção visual de mamas, por profissional habilitado e, segundo os critérios de Tanner [13].

## 2.3 Idade Óssea e Densitometria

A avaliação da maturação esquelética foi realizada pela obtenção da idade óssea (IO) por meio da radiografia de mão e punho, utilizando o método de Greulich Pyle[14]. O laudo foi emitido por avaliador cego em relação ao grupo a que as participantes pertenciam.

Realizada densitometria óssea (DXA) utilizando aparelho Hologic QDR 4500, por um único avaliador experiente e treinado que seguiu as normas da Sociedade Internacional de Densitometria (ISCD) [1,15], obteve-se densitometria de coluna lombar (L1 a L4), corpo total e subtotal, com exclusão do segmento da cabeça. O

coeficiente de variação (CV) foi estimado a partir de medições repetidas (duas vezes) obtidas de 30 pacientes representativas da população de pacientes nas regiões avaliadas. Os resultados demonstraram CV de 0,6% e 1,3% para a coluna lombar e corpo total, os resultados das densidades foram expressos em g/cm<sup>2</sup> e do conteúdo mineral ósseo (BMC) em gramas.

#### 2.4. Marcadores de Formação e Reabsorção Óssea

Amostras de sangue foram obtidas pela manhã, após 10 horas de jejum por punção venosa e centrifugadas por 15 minutos a 1.500 g para a separação do soro; sendo armazenadas a -80 °C até a análise dos biomarcadores fosfatase alcalina (BAP) e osteocalcina (OC) e Telopectídeo carboxiterminal (S-CTx).

BAP e OC foram dosadas em microleitor de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm. Para OC o coeficiente de variação obtido para a precisão do ensaio, foi de 5 a 10,0% para o intra-ensaio e 5 a 8% para o inter-ensaio. Para BAP o CV foi de 3,9 a 5,8% para o intra-ensaio e 5,0 a 7,6% para o inter-ensaio. S-CTx foi dosado por eletroimuno-quimioluminescência (ECLIA) usando o teste de soro Elecsys  $\beta$ -Cross Laps em um dispositivo Elecsys automatizado (Roche<sup>TM</sup>, Indianapolis, IN, EUA), CV inter-ensaio foi de 5%.

#### 2.7. Análise estatística

Os dados foram armazenados e analisados no programa software SPSS 21. Verificou-se a homogeneidade entre os grupos. Pressuposições dos testes foram avaliadas utilizando os testes de Levene para homogeneidade de variâncias e Shapiro-Wilk para normalidade dos dados. Estatística descritiva foi realizada,

apresentando-se mediana e valores extremos, médias e desvios padrão. Para a comparação entre os três grupos estudados (Controle, ACHO1 e ACHO2), nos diferentes momentos (momento inicial e momento 24 meses) foi realizado Teste de ANOVA, seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas, quando as variáveis apresentavam distribuição normal. Em caso de não atendimento a hipótese de normalidade, utilizou-se teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Para todas as análises considerado o nível de significância de 5%.

### **3. Resultados**

Foram incluídas 127 participantes e destas, 62 (48,8%) permaneceram em acompanhamento até o momento final, 24 meses após adesão ao protocolo. A figura 1 mostra o número de participantes incluídas em cada grupo e os motivos da exclusão ou descontinuidade no estudo.

Na tabela 1 todas as variáveis apresentaram-se homogêneas à exceção do BMD de corpo total, quando os controles apresentaram mediana mais elevada em relação aos grupos ACHO 1 e ACHO 2 ( $p=0,001$ ) e percentual de gordura total em que o Grupo ACHO1 apresentou mediana inferior às dos demais grupos ( $p=0,010$ ).

Na tabela 2, observou-se diferença significativa entre os percentis de BMI, sendo que o Grupo Controle apresentou mediana mais elevada em relação ao Grupo ACHO1 ( $p=0,029$ ), destacando-se que 90% das adolescentes foram classificadas como eutróficas, após 24 meses. A mediana de score-z da densitometria lombar encontra-se mais próxima a zero no Grupo Controle, quando comparada às observadas para os grupos ACHO1 e grupo ACHO2, apresentando o grupo ACHO2 resultado intermediário ( $p=0,039$ ). A mediana da variável BMD de corpo total

apresentou-se mais elevada entre as controles, quando comparada ao grupo ACHO2, sendo os resultados do grupo ACHO1 intermediários ( $p=0,001$ ); a mediana de BMC de corpo total foi mais elevada no Grupo Controle em relação aos grupos ACHO1 e ACHO2 ( $p=0,016$ ), mesma tendência foi evidenciada em relação ao percentual de gordura corporal ( $p=0,012$ ), cujos resultados foram mais elevados entre as controles em relação aos grupos ACHO1 e ACHO2, sem diferenças entre as usuárias. Quanto à mediana de escore- z da densidade de corpo total, foi mais elevada no Grupo Controle em relação aos grupos ACHO1 e ACHO2, que não diferiram estatisticamente entre si ( $p=0,027$ ).

No tocante à mediana de BMD de corpo subtotal, o menor resultado foi observado no grupo ACHO1 quando comparado ao Grupo Controle e grupo ACHO2 ( $p=0,003$ ) (Tabela 2).

Na tabela 3 observa-se que a média de variação absoluta de BMD de coluna lombar no Grupo Controle foi maior em relação ao grupo ACHO2, quando entre controles ocorreu aumento de  $0,030 \text{ g/cm}^2$  e variação negativa de  $-0,020 \text{ g/cm}^2$  no grupo ACHO2 ( $p=0,013$ ). A média de variação absoluta de BMC de coluna lombar apresentou resultados inferiores no grupo ACHO2 em relação ao Grupo Controle, com incremento de  $1,92 \text{ g}$  e opostamente redução de  $-0,26 \text{ g}$  no grupo ACHO2. Em relação à mediana de variação do escore-z de coluna lombar, o Grupo Controle apresentou mediana positiva, indicando incremento de massa óssea, em relação às dos grupos ACHO1 e ACHO2, cujos resultados foram negativos ( $p=0,005$ ). A mediana de variação absoluta de BMD de corpo total demonstrou-se mais elevada no Grupo Controle em relação aos demais grupos, com aumento de  $0,073 \text{ g/cm}^2$  nelas e de  $0,013 \text{ g/cm}^2$  no ACHO1 e de  $0,020 \text{ g/cm}^2$  no ACHO2. Em relação à mediana de variação absoluta de

BMC de corpo total, observou-se que o Grupo Controle apresentou incremento de 98,85 g, enquanto no ACHO1 ocorreu redução de -2,20 g e no ACHO2 aumento de 15,08 g.

Em relação à média de variação absoluta do escore-z de corpo total, observou-se que o Grupo Controle apresentou resultado positivo (0,80) enquanto os grupos ACHO1 e ACHO2 resultados negativos (-0,05) e (-0,20) respectivamente ( $p=0,002$ ).

Quanto ao BMC de corpo subtotal, a mediana de variação absoluta indicou que o Grupo Controle incorporou 76,63 g, enquanto o Grupo ACHO1 apresentou resultado de -18,66 g e o Grupo ACHO2 discreto incremento de 5,72 g ( $p=0,001$ ). Em relação ao biomarcador BAP, observou-se que o Grupo Controle apresentou média de variação absoluta positiva em relação às dos grupos ACHO2 e ACHO1, ambas negativas, sendo o resultado do ACHO1 intermediário ( $p=0,014$ ).

Na Figura 2, a variação percentual do BMD de coluna lombar (Figura 2A) demonstrou incorporação da densidade óssea (4,50%) no Grupo Controle, enquanto no grupo ACHO2 se observou redução de - 2,33% ( $p=0.007$ ). A variação percentual do BMC de coluna lombar revelou incremento de conteúdo ósseo de 3,45% (Figura 2B) no Grupo Controle quando comparado ao ACHO2, em que se observou redução de - 0,53% ( $p=0.004$ ).

A variação percentual de BMD de corpo total indicou que o Grupo Controle apresentou variação maior (6,20%) em relação ao demais grupos ( $p=0,005$ ), sendo que o Grupo ACHO1 apresentou variação de 1,34% e o ACHO2, de 2,03% de incremento, indicando menor incorporação de massa óssea total (Figura 2C). Os resultados da variação percentual do BMC de corpo total demonstraram que o Grupo

Controle apresentou variação mais elevada com incremento de massa óssea (4,45%) em relação aos demais grupos, sendo que o Grupo ACHO1 apresentou diminuição de - 0,11% e o ACHO2 aumento de 0,85% (Figura 2D) ( $p=0,010$ ). Não se observou diferença na variação percentual de BMD de corpo subtotal entre os grupos ( $p=0,148$ ) (Figura 2E). No tocante ao BMC de corpo subtotal, o Grupo Controle apresentou variação percentual de 5,81% em relação aos grupos de usuárias de anticoncepcionais ( $p=0,001$ ), quando ACHO1 revelou diminuição percentual de - 1,54% e ACHO2 aumento de 0,42%, sem diferença entre os grupos de usuárias (Figura 2F).

Na Figura 3, a média de variação percentual do biomarcador BAP demonstrou diferença significativa ( $p=0,015$ ), sendo que a variação percentual foi maior no Grupo Controle (4,03%) em relação aos grupos ACHO1 e ACHO2, que apresentaram redução de -10,99% e - 28,54%, respectivamente (Figura 3A). Quanto à média de variação percentual da OC, essa sofreu incremento de 9,98% no Grupo Controle, enquanto nos grupos ACHO1 e ACHO2 observou-se redução de -47,72% e -30,24% respectivamente (Figura 3B). No tocante à média da variação percentual do S-CTx, não se demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados ( $p=0,607$ ) (Figura 3C).

#### **4. Discussão**

Os resultados deste estudo, com acompanhamento de dois anos, demonstraram que adolescentes não usuárias de contraceptivo hormonal oral apresentaram incremento de massa óssea significativamente mais elevado nos sítios esqueléticos, coluna lombar, corpo total e subtotal, analisados pela densitometria

óssea, em relação às adolescentes do grupo ACHO2 (Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg) que, opostamente, apresentaram comprometimento na aquisição da massa óssea na maioria dos sítios avaliados, sendo essa mais intensa na região da coluna lombar. As usuárias de ACHO1 (Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg) apresentaram também redução na incorporação da massa óssea, contudo, a região lombar foi menos afetada. Esses achados indicam que o impacto foi mais negativo sobre a massa óssea das adolescentes que utilizaram a combinação de ACHO2. Complementando, os biomarcadores de formação OC e BAP demonstraram estabilidade entre as adolescentes que compunham o grupo controle, uma vez que suas idades limite, no momento de introdução ao estudo, encontravam-se entre 15 e 20 anos. Por outro lado, para os grupos de usuárias de contraceptivos hormonais orais, as reduções nas concentrações dos marcadores de formação sugeriram diminuição da atividade metabólica óssea, sendo o impacto mais intenso entre as usuárias do grupo ACHO2.

Estudo longitudinal prospectivo conduzido por Jackowisk et al.(8), com mulheres adolescentes e adultas jovens, sob exposição a diversas formulações de anticoncepcionais evidenciou impacto negativo sobre o desenvolvimento do BMC e da BMD quando os ACHOs foram utilizados imediatamente após o pico máximo de crescimento em estatura(PHV), porém, não observado com a mesma intensidade quando utilizado cinco anos após o PHV, sugerindo efeito idade dependente [8]. Os resultados obtidos no presente estudo diferiram dos de Jackowisk et al., à medida que demonstraram que há prejuízo ao incremento da massa óssea, ainda que ocorra um interstício em média de três anos após o PHV, em relação à introdução dos ACHOs.

Completando, estudo realizado na Itália [16] com cinco anos de acompanhamento demonstrou aumento de 7,8% no BMD em não usuárias de contraceptivos e não observou mudança significativa no grupo que utilizou Etinilestradiol 20 µg / Desogestrel 150 µg. A idade média das participantes era de 20 anos, comprovando a interferência sobre a massa óssea mesmo quando utilizado em período muito posterior ao PHV, fato que corrobora nossos achados.

Além disso, ressalta-se que todas as adolescentes foram incluídas nos estágios de mamas 4 e 5 de Tanner [17], período de maior aquisição de massa óssea durante a adolescência. Resultados advindos de estudo brasileiro, que avaliou 101 adolescentes do sexo feminino, correlacionaram a aquisição da massa óssea ao avanço da idade cronológica, da idade óssea e do estadiamento puberal [3]. Considerando que na adolescência tardia, 92% da massa óssea total já foi incorporada [1], os resultados nos grupos de usuárias de anticoncepcionais e, com destaque à combinação ACHO2 tornaram-se relevantes e apontaram para o fato de que a escolha da combinação de contraceptivo oral deva ser cuidadosa, quando prescrita a essa faixa etária.

Cibula et al. (19) realizaram um estudo “cross over” com grupo controle e dois grupos de anticoncepcionais contendo o mesmo progestágeno, o gestodeno, e duas concentrações diferentes de EE (30 e 15 mcg). Evidenciaram incremento de BMD no grupo controle e não observaram nos grupos de usuárias [18]. Sendo as adolescentes expostas às duas concentrações de EE, sequencialmente, a interpretação dos resultados fica dificultada, uma vez que a atuação do estrogênio sobre a massa óssea pode levar vários meses a ser detectada e, portanto, os resultados obtidos no segundo período podem ter sido influenciados pelos oriundos do primeiro.

Em revisão sistemática da literatura [19], evidenciou-se influência negativa sobre a densidade óssea de coluna lombar, resultante ao uso de contraceptivos hormonais orais em adolescentes após um e dois anos de seu uso. Os resultados evidenciaram diminuição de  $0,02 \text{ g/cm}^2$  na densidade óssea de coluna lombar, tanto para um como dois anos de uso dos medicamentos. Foram avaliados cinco artigos na análise de 24 meses e uma heterogeneidade entre eles de 96% e 85%, respectivamente, foi detectada para um e dois anos de análise. Esse número pequeno de estudos incluídos refletiu as dificuldades dos autores em selecionar os artigos de boa qualidade a serem incluídos, a falta de estudos que analisassem outros sítios ósseos para obtenção das densitometrias, revelando, além disso, as adversidades encontradas por vários pesquisadores em acompanhar adolescentes que utilizam métodos contraceptivos, a prescrição de anticoncepcionais com doses e composições diversas, as altas taxas de abandono do método nessa faixa etária especialmente após 12 meses de sua utilização [19,20]. Salientamos que as reduções em média apresentadas no atual estudo, em relação à BMD de coluna lombar, foram de  $-0,020 \text{ g/cm}^2$ , semelhantes à metanálise citada (21).

Com relação a dose de EE, revisão sistemática[21] sobre uma série de artigos que selecionaram adolescentes usuárias de diferentes composições hormonais para avaliar o efeito dos contraceptivos sobre a massa óssea, os autores concluíram que doses de EE entre 20 a 30  $\mu\text{g}$  podem afetar a aquisição do pico de massa óssea. O mesmo desfecho foi observado em nossos resultados. Os dois grupos compostos por usuárias apresentaram comprometimento dos parâmetros densitométricos, com maior impacto nas usuárias da composição com 30  $\mu\text{g}$  de EE.

Estudo prospectivo multicêntrico realizado no Canadá, com adolescentes entre 15 e 19,5 anos, não identificou diferenças entre as densidades de coluna lombar comparando usuárias de ACHO com não usuárias após dois anos de uso [22], resultado que difere do evidenciado em nosso estudo que demonstrou menor incremento da densidade óssea nesse sítio, nas usuárias de ACHO. Esse efeito foi mais acentuado quando elas utilizaram EE 30µg/ Drospirenona 3mg, pela análise tanto da BMD como da BMC de região lombar, quando os controles incorporaram 0,030g/cm<sup>2</sup> e 1,92g respectivamente e, as usuárias de ACHO2, obtiveram resultados negativos de -0,020 g/cm<sup>2</sup> e -0,26g na BMD e na BMC lombar. Caso nos detivéssemos às densitometrias de corpo total, evidenciaríamos que o Grupo Controle incrementou 98,85g e as usuárias de EE 30µg/ Drospirenona 3mg, apenas 15,08g no período de dois anos, reforçando a interferência dos anticoncepcionais orais sobre o depósito de massa óssea em adolescentes.

Observações semelhantes já haviam sido publicadas por Bisi Rizzo et al.[5], acompanhando adolescentes por período de 12 meses, que utilizaram as mesmas formulações de ACHOs, ainda que tenha sido realizada análise de regressão linear para determinar a evolução entre controles. Diante disso, pode-se afirmar que o impacto negativo, observado sobre a massa óssea de adolescentes, com um ano de acompanhamento persiste quando o tempo de uso se prorroga para dois anos.

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 BMD durante a segunda década de vida, indicando que, em fase tardia da adolescência ainda ocorre depósito de massa

óssea e menores são as concentrações dos marcadores ósseos de formação e reabsorção [3].

Callegari et al.[23] apresentaram valores de referência para marcadores ósseos em jovens de 16 a 25 anos e, evidenciaram redução nas concentrações de CTX e PINP (propeptideo colágeno tipo 1) com a progressão da idade. Destaca-se que os resultados por nós obtidos, para todos os marcadores analisados, apresentaram evolução que corrobora os resultados de Callegari et al., entretanto, entre as usuárias de anticoncepcionais e, principalmente, entre aquelas de ACHO2, o declínio foi significativo nos níveis de BAP e de OC (Figura 3). Como demonstrado pela mesma autora em estudo posterior[24], usuárias de ACHO apresentaram redução de 22% nas concentrações dos seus marcadores de metabolismo ósseo frente às evidenciadas em não usuárias de contraceptivos hormonais. De forma semelhante houve redução de -28,54 % nas concentrações de BAP, de - 30,24% nas concentrações de OC e de -18,28% nas concentrações do S-CTx entre usuárias de ACHO2, frente às concentrações obtidas no momento inicial.

Herrmann e pesquisadores também estudaram o efeito dos anticoncepcionais sobre marcadores ósseos em uma revisão da literatura e observaram redução significativa das concentrações de marcadores de formação e reabsorção em usuárias de contraceptivos hormonais[2]. Entretanto, apesar dessa constatação, os autores não indicaram ser possível concluir a influência desses achados sobre o risco futuro de fraturas entre as usuárias. Em nosso estudo não constatamos ocorrência de fraturas ao longo de dois anos de acompanhamento entre as adolescentes usuárias, entretanto, pode-se inferir que a remodelação óssea esteja comprometida.

Quanto à Drospirenona e ao Desogestrel, progestágenos que estão presentes na composição dos ACHOs utilizados, sabe-se que atuam sobre receptores androgênicos por inibição competitiva e que esse mecanismo resultaria em efeitos antiandrogênicos, de grande importância sobre o metabolismo ósseo, uma vez que a testosterona exerce um papel fundamental na aquisição de massa óssea[25].

Pesquisa realizada por Hadji et al.[26] não demonstrou impacto no risco de fratura em usuárias de anticoncepcionais contendo progestágeno isolado, demonstrando preservação da massa óssea. Assim, o efeito do progestagênio sobre o metabolismo ósseo pode estar associado à combinação ao componente estrogênico utilizado, seja o 17  $\beta$  Estradiol ou o EE, bem como à via de administração, seja oral ou transdérmica [26].

Estudo que comparou o uso de diferentes progestágenos observou maior redução nas concentrações de marcadores ósseos no grupo Drospirenona em relação ao grupo Gestodeno, progestágeno da mesma geração do Desogestrel utilizado em nosso estudo [27].

Estudo de meta-análise conclui que a progesterona combinada ao estrogênio, tem efeito antirreabsortivo no osso. *In vitro*, a progesterona tem um efeito estimulador da diferenciação de osteoblastos em concentrações fisiológicas e um efeito inibidor em quantidades farmacológicas [28].

Em decorrência da identificação de poucos estudos na literatura sobre a influência dos progestagênios presentes nas formulações de ACHOs, resulta a complexidade em distinguir quais efeitos seriam advindos da progesterona ou resultantes dos níveis de estrogênio sobre o metabolismo ósseo.

Além desse ponto, a heterogeneidade no delineamento dos estudos dificulta em efetuar comparações quanto ao efeito hormonal do contraceptivo oral sobre a remodelação óssea em adolescentes. Pôde-se verificar que nos estudos relativos ao tema, detectados nas bases de dados, foram diferentes os tipos de contraceptivos, concentrações de EE, assim como início de uso de anticoncepcional em diferentes momentos de aquisição da massa óssea.

Sabe-se que, se o aumento de massa óssea puder ser otimizado durante a puberdade, é provável que os adultos e os idosos estejam menos susceptíveis às complicações da osteoporose pois, aumento de 10% no pico de massa óssea (PMO) resulta em retardo de 13 anos para o início da osteoporose [26].

O presente estudo visou reduzir as incertezas quando ao debate em questão, porém, ainda que critérios rígidos de seleção tenham sido adotados para moderá-las, algumas limitações para sustentar os achados nesta análise devem ser destacadas, entre elas, o tamanho amostral e a perda de seguimento de praticamente 50% da amostra ao final de dois anos de acompanhamento. A retenção de participantes adolescentes é um desafio devido à sua mobilidade geográfica, às principais transições de vida e às suas escolhas e objetivos, inclusive no tocante à preservação de sua saúde reprodutiva.

Diante dos resultados apresentados, pode-se aventar que as repercussões sobre a massa óssea, resultantes ao uso de contraceptivos hormonais orais por esse recorte etário, talvez só possam ser avaliadas e reconhecidas a longo prazo, quando as adolescentes se tornarem adultas ou atingirem a menopausa, acompanhando-se prospectivamente sua evolução densitométrica em todas as etapas de vida.

## **Conclusão**

O presente estudo evidenciou um menor incremento de massa óssea entre as usuárias de ACHO, após 24 meses, sendo o efeito deletério mais evidente nas que utilizaram EE 30 µg/Drospirenona 3mg.

Diferenças significativas quanto a evolução dos parâmetros densitométricos de adolescentes saudáveis não usuárias de anticoncepcionais (grupo controle) quando comparadas às usuárias de contraceptivos hormonais orais de baixa dose (Etinilestradiol 20µg/ Desogestrel 150mg ou Etinilestradiol 30µg/ Drospirenona 3mg), de mesma faixa etária, foram evidenciadas. Demonstrou-se interferência negativa sobre a saúde óssea avaliada tanto pela densitometria óssea quanto pelos biomarcadores séricos de formação óssea.

A compreensão do processo de incorporação óssea que ocorre na infância e adolescência permite o desenvolvimento de estratégias para a prevenção precoce da osteoporose.

## **Contribuições**

Tamara Beres Lederer Goldberg concebeu o estudo, estabelecimento dos métodos de estudo, e interpretação dos dados do estudo e redação do manuscrito.

*Carla C. Silva* participou da concepção do estudo, estabelecimento dos métodos de estudo, e interpretação dos dados do estudo.

Talita Domingues Caldeirão participou da coleta de dados interpretação dos dados do estudo e redação do manuscrito.

Lilian Rodrigues Orsolini participou da coleta de dados e auxiliou na interpretação dos dados do estudo.

Altamir Santos Teixeira, colaborou nos laudos dos exames de imagem.

Hélio Rubens é o estatístico do estudo e auxiliou na análise dos dados.

Todos os autores leram, contribuíram e aprovaram a versão final do manuscrito.

### **Conflito de interesses**

Todos os autores declaram não ter conflito de interesses.

### **Financiamento**

Os financiamentos que viabilizaram o desenvolvimento desta pesquisa foram o Auxílio Pesquisa FAPESP número 15/04040-2 e patrocínio da Unimed – Assis.

### **Aprovação ética**

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 e foi aprovada uma emenda no ano de 2018 junto à Plataforma Brasil sob o número 2.766.807 para dar continuidade à coleta de dados.

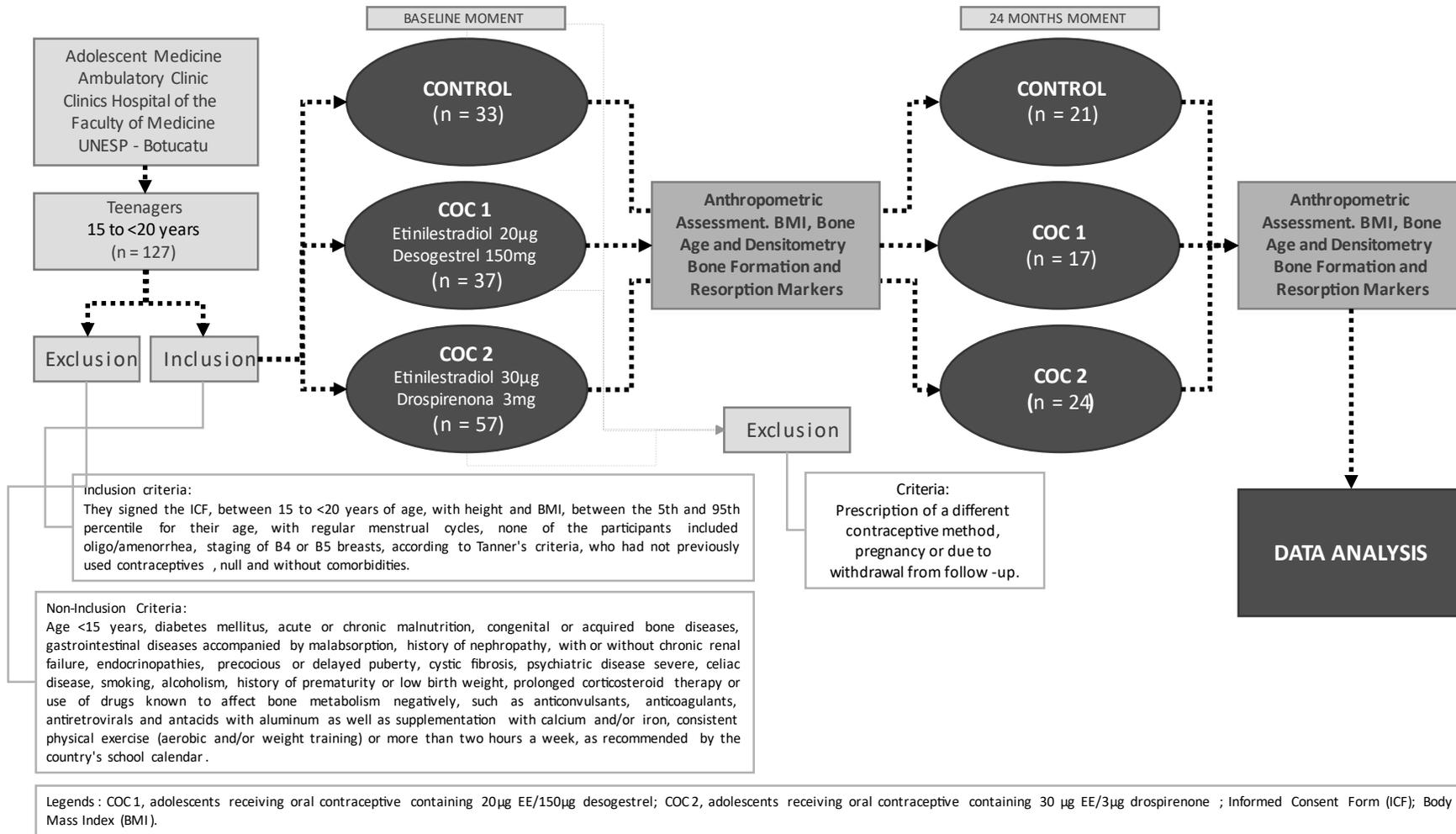
## Referências

- [1] 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>.
- [2] 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>.
- [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, H.R. de C. 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.jpmed.2014.04.008>.
- [4] 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. Heal. Care.* 14 (2009) 207–214. <https://doi.org/10.1080/13625180902838828>.
- [5] A. da C.B. Rizzo, T.B.L. Goldberg, T.P. Biason, 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 (2019) 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2018.05.011>.
- [6] H. Roberts, Steroidal contraceptives: Effect on bone fractures in women, *Maturitas.* 80 (2015) 340–341. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.01.011>.
- [7] S.C. Manolagas, Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis\*, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 115–137. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>.
- [8] 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 (2016) e333–e341. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2015.06.001>.
- [9] 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>.
- [10] F.Z. Stanczyk, D.F. Archer, B.R. Bhavnani, Ethinyl estradiol and 17 $\beta$ -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>.
- [11] G. Creatsas, Estradiol – containing contraceptives, *Maturitas.* 81 (2015) 119–120. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.02.062>.
- [12] D.B. Jelliffe, E. F. P. ; Jelliffe, Anthropometry in action. I. Dental second year

- malnutrition. (Practical age-grouping in young children in areas without birth verification.), *J. Trop. Pediatr.* 14 (1968) 71–74. [http://doi:10.1093/tropej/14.2.71](http://doi.org/10.1093/tropej/14.2.71).
- [13] J.M. Tanner, *Growth at adolescence : with a general consideration of the effects of hereditary and environmental factors upon growth and maturation from birth to maturity*, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1962. <https://trove.nla.gov.au/work/231801954>.
- [14] E. Reynolds, *Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist*. By W. W. Greulich and S. I. Pyle. Stanford University Press, 1950, xiii + 190 pp., *Am. J. Phys. Anthropol.* 8 (1950) 518–520. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330080429>.
- [15] S.J. Shuhart CR, S.S Yeap, P.A. Anderson, L.G. Jankowski, E.M. Lewiecki, L.R.Morse, H.N.Rosen, D.R. Weber, B.S. Zemel, 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). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jocd.2019.07.001>.
- [16] F. Polatti, F. Perotti, N. Filippa, D. Gallina, R.E. Nappi, Bone mass and long-term monophasic oral contraceptive treatment in young women, *Contraception.* 51 (1995) 221–224. [https://doi.org/10.1016/0010-7824\(95\)00036-A](https://doi.org/10.1016/0010-7824(95)00036-A).
- [17] J.M. Tanner, R.H. Whitehouse, W.A. Marshall, B.S. Carter, Prediction of adult height from height, bone age, and occurrence of menarche, at ages 4 to 16 with allowance for midparent height, *Arch. Dis. Child.* 50 (1975) 14–26. <https://doi.org/10.1136/adc.50.1.14>.
- [18] 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>.
- [19] A. Goshtasebi, T. Subotic Brajic, D. Scholes, T. Beres, A. 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>.
- [20] J. Gersten, J. Hsieh, H. Weiss, N.A. Ricciotti, Effect of Extended 30 µg Ethinyl Estradiol with Continuous Low-Dose Ethinyl Estradiol and Cyclic 20 µg Ethinyl Estradiol Oral Contraception on Adolescent Bone Density: A Randomized Trial, *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 29 (2016) 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2016.05.012>.
- [21] S. Ziglar, T.S. Hunter, The Effect of Hormonal Oral Contraception on Acquisition of Peak Bone Mineral Density of Adolescents and Young Women, *J. Pharm. Pract.* 25 (2012) 331–340. <https://doi.org/10.1177/0897190012442066>.
- [22] T.S. Brajic, C. Berger, K. Schlammerl, H. Macdonald, S. Kalyan, D.A. Hanley, J.D. Adachi, C.S. Kovacs, J.C. Prior, 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.

- [23] E.T. Callegari, A. Gorelik, S.M. Garland, C.Y. Chiang, J.D. Wark, Bone turnover marker reference intervals in young females, *Ann. Clin. Biochem.* 54 (2017) 438–447. <https://doi.org/10.1177/0004563216665123>.
- [24] 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.* 55 (2018) 328–340. <https://doi.org/10.1177/0004563217719734>.
- [25] R.B. Wolff, R.C. Teixeira Gomes, C. Verna, G.C.C. Cristofani Maioral, T.C. Rampazo, R.S. Simões, E.C. Baracat, J.M. Soares Júnior, Aspectos moleculares dos esteroides sexuais sobre a cartilagem e os ossos, *Rev. Assoc. Med. Bras.* 58 (2012) 493–497. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000400023>.
- [26] 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>.
- [27] C. Nappi, A. D. S. Sardo, E. Greco, G.A. Tommaselli, E. Giordano, M. Guida, Effects of an oral contraceptive containing drospirenone on bone turnover and bone mineral density, *Obstet. Gynecol.* 105 (2005) 53–60. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000148344.26475.fc>.
- [28] V. Seifert-Klauss, J.C. Prior, Progesterone and Bone: Actions Promoting Bone Health in Women, *J. Osteoporos.* 2010 (2010) 1–18. <https://doi.org/10.4061/2010/845180>.

**Figure 1 - Flowchart for derivation showing the number of participants and the reasons for loss to follow-up.**



**Table 1.** Comparison of anthropometric and densitometric variables and bone formation and resorption markers expressed in absolute values between the Control, ACHO1 and ACHO2 groups at baseline.

Variables	Control (n=33)				COC1 (n=37)				COC2 (n=57)				p
	Med/Mean	SD	Min	Max	Med/Mean	SD	Min	Max	Med/Mean	SD	Min	Max	
Age (years)*	16.00	1.04	15.00	19.92	16.17	1.40	15.00	20.17	16.42	1.11	15.00	18.75	0.270
Bone age (years)*	17.00	0.83	15.00	18.00	17.00	0.89	15.00	18.00	17.00	0.88	15.00	19.00	0.390
Weight (kg)*	53.00	8.22	42.60	71.00	54.00	8.50	40.50	73.40	54.50	7.49	41.00	72.20	0.700
Height (cm)#	161.00	--	151.00	173.00	159.66	--	149.00	171.00	159.34	--	140.00	172.00	0.450
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	20.48	2.63	16.72	27.39	20.88	2.83	16.63	26.78	21.64	2.67	17.75	29.99	0.320
BMI (percentile)*	55.96	25.21	9.80	92.21	55.61	28.45	8.18	95.00	63.25	23.67	8.18	95.00	0.480
Lumbar BMD (g/cm <sup>2</sup> )#	0.917	--	0.690	1.120	0.953	--	0.773	1.094	0.960	--	0.710	1.180	0.149
Lumbar BMC (g)*	49.98	9.04	28.09	71.63	50.83	8.00	37.70	74.55	49.62	8.15	37.01	79.39	0.820
Lumbar Z-score#	-0.43	--	-1.90	1.00	-0.27	--	-1.80	1.10	-0.11	--	-1.90	1.60	0.370
Total body BMD (g/cm <sup>2</sup> )#	1.090 <sup>A</sup>	--	0.860	1.320	1.000 <sup>B</sup>	--	0.909	1.130	1.020 <sup>B</sup>	--	0.880	1.240	<b>0.001</b>
Total body BMC (g)*	1975.20	314.73	1260.69	2754.08	1850.52	183.67	1401.96	2456.11	1803.33	250.52	1434.14	2719.86	0.070
Total body Z-score#	1.15 <sup>A</sup>	--	-1.60	3.20	-0.91 <sup>B</sup>	--	-1.90	0.50	-0.61 <sup>B</sup>	--	-1.80	1.80	<b>0.001</b>
Subtotal BMD (g/cm <sup>2</sup> )*	0.910	0.070	0.750	1.040	0.870	0.050	0.790	1.000	0.890	0.080	0.800	1.160	0.123
Subtotal BMC (g)*	1375.57	248.82	891.25	1987.54	1420.76	163.65	1047.63	1995.15	1373.94	212.68	1109.76	2254.86	0.750
Fat mass (kg)*	18.150	4.169	10.672	27.394	16.551	5.831	8.594	36.443	17.764	4.896	10.151	30.170	0.315
Lean mass (kg)*	33.489	5.382	27.719	44.072	37.398	4.456	30.858	48.669	35.509	6.885	2.659	51.819	0.267
Total body fat %*	33.18 <sup>A</sup>	3.69	23.90	39.40	29.17 <sup>B</sup>	4.85	21.00	38.50	31.77 <sup>A</sup>	5.15	19.60	41.40	<b>0.010</b>
BAP (U/L)*	30.71	12.15	13.29	621.00	36.10	16.40	15.76	84.82	35.27	12.04	19.31	66.47	0.208
Osteocalcin (ng/mL)*	5.44	5.99	1.01	18.13	7.41	3.90	1.71	21.17	10.32	5.98	0.27	24.35	0.077
S-CTx (ng/ml)*	0.674	0.217	0.271	1.171	0.549	0.357	0.220	1.760	0.605	0.314	0.220	1.710	0.690

**Note:** Mean\* or Median#

COC1, adolescents receiving oral contraceptive containing 20µg EE/150µg desogestrel; COC2, adolescents receiving oral contraceptive containing 30 µg EE/3µg drospirenone \*ANOVA for comparison of means between the three groups and Bonferroni test for multiple comparisons (Mean); #Kruskal--Wallis test for comparison between the three groups and Dunn's multiple comparison (Median); Different uppercase letters indicate significant differences between the three groups (p<0.05); BMD: Bone Mineral Density; BMC: Bone Mineral Content; BAP: Bone Alkaline Phosphatase.

**Table 2.** Comparison of anthropometric and densitometric variables and bone formation and resorption markers expressed in absolute values between the Control, ACHO1 and ACHO2 groups two years follow-up.

Variables	Control (n=21)				COC1 (n=17)				COC2 (n=24)				p
	Med/Mean	SD	Min	Max	Med/Mean	SD	Min	Max	Med/Mean	SD	Min	Max	
Age (years)*	18.00	1.13	17.00	21.83	18.00	1.30	16.50	21.50	18.00	0.94	16.92	20.25	0.980
Bone age (years)*	18.00	0.60	16.00	18.00	18.00	0.41	17.00	18.00	17.00	0.51	17.00	18.00	0.280
Weight (kg)*	54.70	9.20	45.00	77.00	53	12.17	40.10	90.00	55.95	9.04	42.00	72.50	0.380
Height (cm)#	162.17	--	153.00	173.00	160.74	6.23	151.00	170.00	158.92	8.06	140.00	173.00	0.280
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	21.64	2.93	18.18	29.33	20.23	4.04	16.56	31.89	22.05	2.76	18.16	30.17	0.199
BMI (percentile)#	65.32 <sup>A</sup>	--	23.89	93.44	39.60 <sup>B</sup>	--	1.45	96.20	55.81 <sup>AB</sup>	--	10.56	84.61	<b>0.029</b>
Lumbar BMD (g/cm <sup>2</sup> )*	0.963	0.143	0.690	1.120	0.891	0.069	0.820	1.120	0.927	0.107	0.790	1.130	0.330
Lumbar BMC (g)*	51.99	9.30	30.00	73.57	47.92	5.70	41.02	62.67	50.78	7.22	41.32	69.34	0.280
Lumbar Z-score <sup>2</sup>	-0.18 <sup>A</sup>	--	-1.10	1.10	-0.97 <sup>B</sup>	--	-1.80	1.00	-0.37 <sup>AB</sup>	--	-1.70	1.20	<b>0.039</b>
Total body BMD (g/cm <sup>2</sup> )#	1.130 <sup>A</sup>	--	0.900	1.350	1.000 <sup>AB</sup>	--	0.927	1.225	1.040 <sup>B</sup>	--	0.940	1.210	<b>0.001</b>
Total body BMC (g)#	2063.10 <sup>A</sup>	--	1290.32	2876.67	1824.81 <sup>B</sup>	--	1562.33	2153.10	1868.42 <sup>B</sup>	--	1514.59	2570.34	<b>0.016</b>
Total body Z=score*	1.90 <sup>A</sup>	1.15	-0.70	3.30	-1.50 <sup>B</sup>	1.19	-2.00	1.70	-0.90 <sup>B</sup>	0.93	-1.40	3.10	<b>0.027</b>
Subtotal BMD (g/cm <sup>2</sup> )#	0.930 <sup>A</sup>	--	0.780	1.060	0.860 <sup>B</sup>	--	0.798	0.929	0.920 <sup>A</sup>	--	0.890	1.120	<b>0.003</b>
Subtotal BMC (g)#	1508.09	--	1006.32	1944.02	1363.72	--	1169.30	1642.05	1401.66	--	1032.05	1792.41	0.058
Fat mass (kg)*	22.898	5.267	14.963	30.298	18.281	7.222	9.120	34.651	19.987	5.768	8.571	31.029	0.138
Lean mass (kg)*	31.676	6.251	28.714	47.304	35.481	6.810	28.490	53.000	35.969	5.099	26.680	43.231	0.620
Total body fat %*	38.44 <sup>A</sup>	4.99	27.10	46.50	31.49 <sup>B</sup>	5.68	22.70	38.60	33.10 <sup>B</sup>	7.30	16.80	48.20	<b>0.012</b>
BAP (U/L)*	33.48	12.12	14.30	64.33	30.83	10.20	18.61	48.60	27.00	9.45	13.29	49.24	0.170
Osteocalcin (ng/mL)*	5.18	7.85	0.88	28.41	4.44	4.68	0.22	16.78	6.22	5.63	2.09	2121.00	0.313
S-CTx (ng/ml)*	0.511	0.200	0.200	0.960	0.630	0.200	0.309	0.874	0.567	0.240	0.150	1.010	0.343

**Note:** Mean\* or Median#

COC1, adolescents receiving oral contraceptive containing 20µg EE/150µg desogestrel; COC2, adolescents receiving oral contraceptive containing 30 µg EE/3µg drospirenone

\*ANOVA for comparison of means between the three groups and Bonferroni test for multiple comparisons (Mean); #Kruskal--Wallis test for comparison between the three groups and Dunn's multiple comparison (Median); Different uppercase letters indicate significant differences between the three groups (p<0.05); BMD: Bone Mineral Density; BMC: Bone Mineral Content; BAP: Bone Alkaline Phosphatase.

**Table 3.** Comparison of the variation of densitometric variables expressed in absolute values between the Control, ACHO1 and ACHO2 groups between baseline and two years follow-up

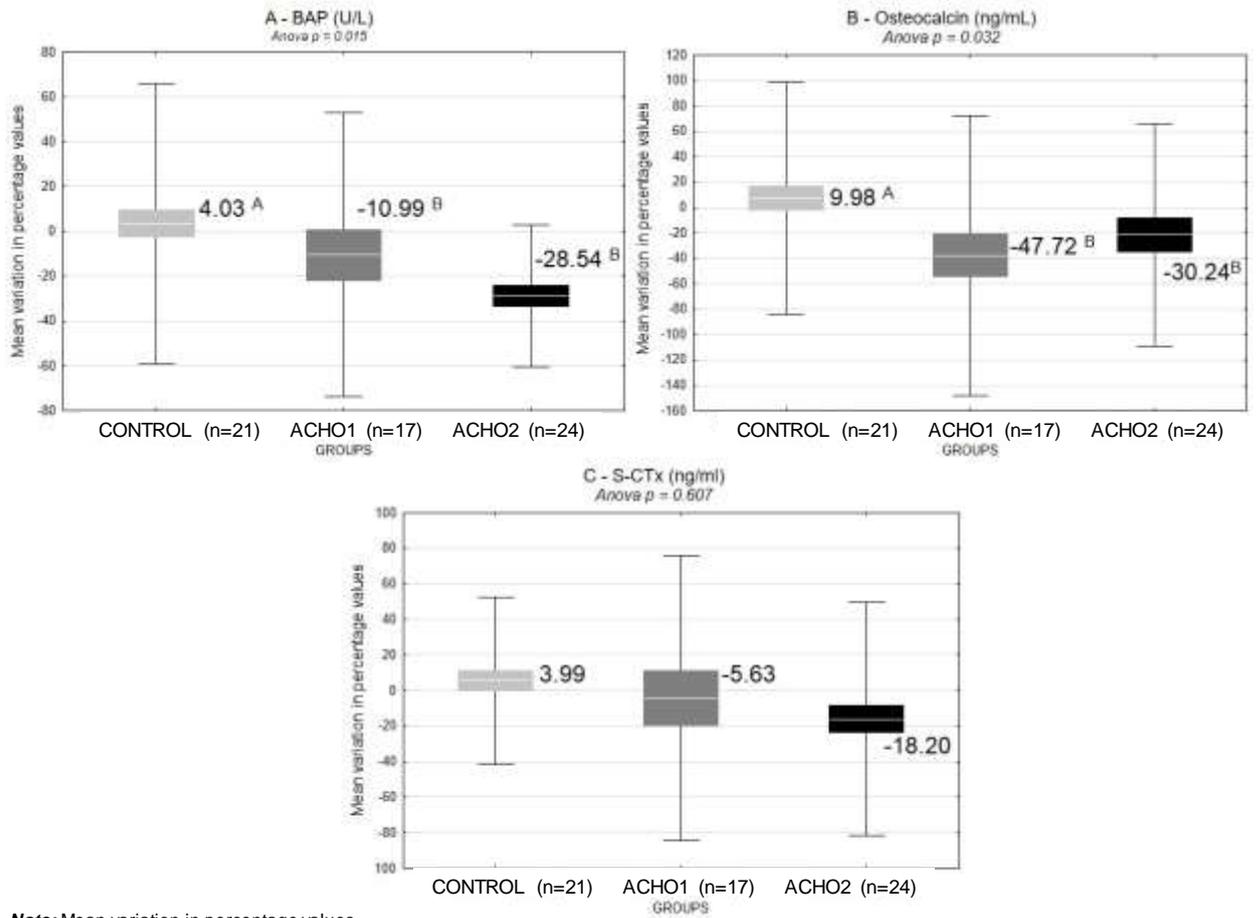
Variables	Control (n=21)				COC1 (n=17)				COC2 (n=24)				p
	Med/Mean	SD	Min	Max	Med/Mean	SD	Min	Max	Med/Mean	SD	Min	Max	
Lumbar BMD (g/cm <sup>2</sup> )*	0.030 <sup>A</sup>	0.084	-0.240	0.340	-0.009 <sup>AB</sup>	0.055	-0.070	0.095	-0.020 <sup>B</sup>	0.062	-0.16	0.10	<b>0.013</b>
Lumbar BMC (g)*	1.92 <sup>A</sup>	4.97	-16.36	11.43	0.22 <sup>AB</sup>	3.37	-3.89	6.97	-0.26 <sup>B</sup>	3.68	-9.76	46.00	<b>0.005</b>
Lumbar Z-score <sup>#</sup>	0.19 <sup>A</sup>	--	-0.30	1.00	-0.27 <sup>B</sup>	--	-1.00	0.80	-0.47 <sup>B</sup>	--	-1.70	0.50	<b>0.005</b>
Total body BMD (g/cm <sup>2</sup> ) <sup>#</sup>	0.073 <sup>A</sup>	--	-0.200	0.160	0.013 <sup>B</sup>	--	-0.034	0.220	0.020 <sup>B</sup>	--	-0.030	0.150	<b>0.005</b>
Total body BMC (g) <sup>#</sup>	98.85 <sup>A</sup>	--	-268.32	349.85	-2.20 <sup>B</sup>	--	-39.10	12.83	15.08 <sup>B</sup>	--	-90.62	509.50	<b>0.005</b>
Total body Z-score*	0.80 <sup>A</sup>	0.42	-0.30	1.20	-0.05 <sup>B</sup>	0.84	-0.70	2.40	-0.20 <sup>B</sup>	0.95	-1.20	2.80	<b>0.002</b>
Subtotal BMD (g/cm <sup>2</sup> ) <sup>#</sup>	0.022	--	-0.040	0.170	0.005	--	-0.033	0.039	0.019	--	-0.030	0.140	0.147
Subtotal BMC (g) <sup>#</sup>	76.63 <sup>A</sup>	--	-59.92	636.85	-18.66 <sup>B</sup>	--	-59.66	270.12	5.72 <sup>B</sup>	--	-77.71	155.60	<b>0.001</b>
BAP (U/L)*	1.03 <sup>A</sup>	9.45	-30.43	23.70	-4.72 <sup>AB</sup>	12.98	-25.80	11.02	-7.02 <sup>B</sup>	10.61	-39.68	3.26	<b>0.014</b>
Osteocalcin (ng/ml)*	0.16	6.07	-12.59	11.82	-3.52	6.34	-13.61	11.54	-2.07	5.19	-10.61	5.80	0.081
S-CTx (ng/ml)*	0.025	0.258	-0.750	0.140	-0.047	0.376	-0.840	0.302	-0.091	0.269	-0.880	0.310	0.692

**Note:** Mean\* or Median<sup>#</sup>

COC1, adolescents receiving oral contraceptive containing 20µg EE/150µg desogestrel; COC2, adolescents receiving oral contraceptive containing 30 µg EE/3µg drospirenone

\*ANOVA for comparison of means between the three groups and Bonferroni test for multiple comparisons (Mean); <sup>#</sup>Kruskal--Wallis test for comparison between the three groups and Dunn's multiple comparison (Median); Different uppercase letters indicate significant differences between the three groups (p<0.05); BMD: Bone Mineral Density; BMC: Bone Mineral Content; BAP: Bone Alkaline Phosphatase.

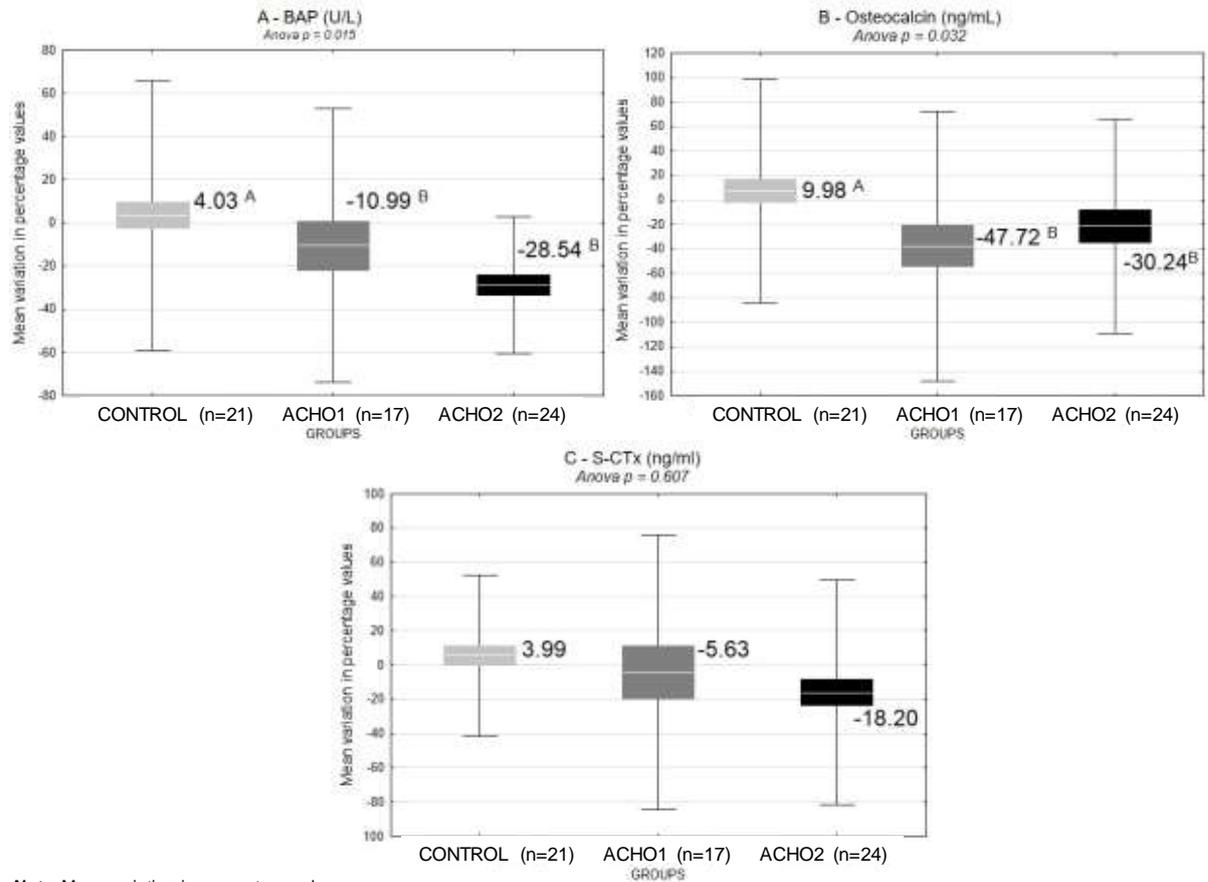
**Figure 2.** Comparison of the variation of densitometric variables expressed in percentage values between the Control, ACHO1 and ACHO2 groups between baseline and two years follow-up.



**Note:** Mean variation in percentage values.

COC1, adolescents receiving oral contraceptive containing 20µg EE/150µg desogestrel; COC2, adolescents receiving oral contraceptive containing 30 µg EE/3µg drospirenone; ANOVA for comparison of means between the three groups and Bonferroni test for multiple comparisons (Mean); Different uppercase letters indicate significant differences between the three groups (p<0.05);BAP: Bone AlkalinePhosphatase.

**Figure 3.** Comparison of the variation of bone formation and resorption markers expressed in percentage values between the Control, ACHO1 and ACHO2 groups between baseline and two years follow-up.



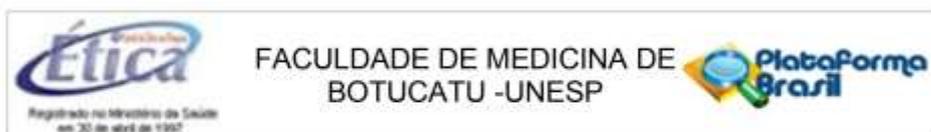
**Note:** Mean variation in percentage values.

COC1, adolescents receiving oral contraceptive containing 20µg EE/150µg desogestrel; COC2, adolescents receiving oral contraceptive containing 30 µg EE/3µg drospirenone; ANOVA for comparison of means between the three groups and Bonferroni test for multiple comparisons (Mean); Different uppercase letters indicate significant differences between the three groups ( $p < 0.05$ ); BAP: Bone AlkalinePhosphatase.



*Parte III*  
*Anexos*

## ANEXO 1



### 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:

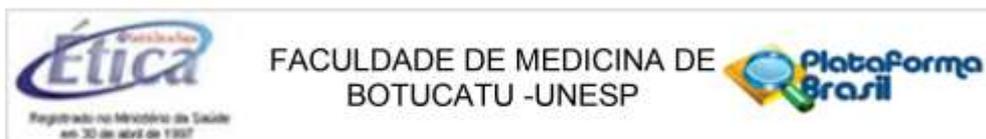
**Objetivo Primário:**

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

Página 02 de 04



Continuação do Parecer: 1.441.169

pacientes. Constatam 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 11:08:20	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	25/01/2016 11:05:35	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito

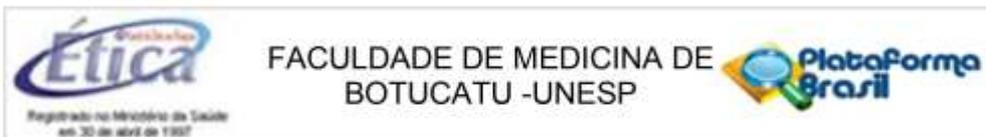
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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



Continuação do Parecer: 1.441.169

BOTUCATU, 07 de Março de 2016

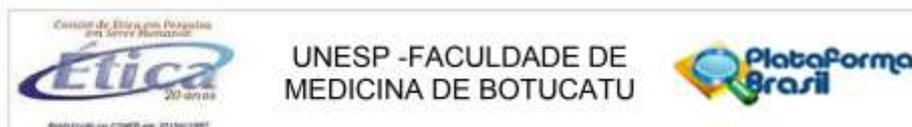
---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)

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

Página 04 de 04

## ANEXO 2



### 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:** 2

**CAAE:** 52928416.6.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Pediatria

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

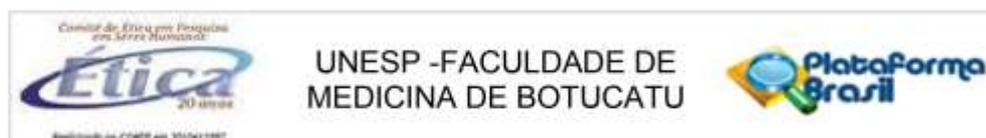
**Número do Parecer:** 2.709.808

#### 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. Constataram 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 Butignoli, s/n  
Bairro: Rubião Junior  
UF: SP Município: BOTUCATU CEP: 16.618-970  
Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.709.808

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.

**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:**

No projeto original houve dispensa do TCLE devido a uso de dados já coletados e aprovados por este CEP, mas com a inclusão de tamanho amostral, será aplicado o TCLE para os novos sujeitos da pesquisa. A pesquisadora apresenta o TCLE em forma de convite, mas não está citado o tempo de duração dos procedimentos e o endereço do Cep.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A emenda apresentada encontra-se PENDENTE, até que seja sanada a pendência.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 04 de junho de 2018, o documento enviado na forma de "Emenda", encontra-se PENDENTE:

Pendência:

1.Adequação do TCLE: Citar no texto o tempo de duração dos procedimentos e o endereço do CEP.

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: 2.709.808

A pendência deverá ser respondida e apresentada por ofício explicativo, contendo a pergunta e a resposta, e anexado no sistema Plataforma Brasil até o dia 15 de junho de 2018 para que o projeto seja apreciado novamente em reunião extraordinária, a realizar-se em 19 de junho de 2018.

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	16/05/2018 21:20:11		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 10:56:56	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	25/01/2016 11:05:35	Anapaula da Conceição Bisi Rizzo	Aceito

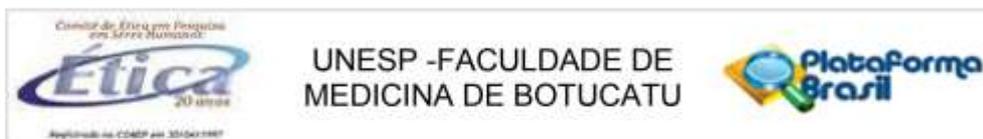
**Situação do Parecer:**

Pendente

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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: 2.709.808

BOTUCATU, 13 de Junho de 2018

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)

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

Página 04 de 04

## ANEXO 3



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 Irmã 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**.

 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 Caurina, 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 PATROCINADA, 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	



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

ANS-nº 300713



Avenida Walter A. Fontana, 1997  
19615-340, Vila Cláudia, Assis - SP  
(38) 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.



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

#### CLAUSULA 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.

#### CLAUSULA 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.

#### CLAUSULA 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.



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

Assis/SP, 30 de outubro de 2017

**Unimed Assis**  
Dr. Eduardo Henrique Aires Coelho  
Superintendente

**UNIMED DE ASSIS COOPERATIVA DE TRABALHO MÉDICO**

*R. Ortolini*

**PRUDENSOL - PRUDENTE SOLUÇÕES EM ENERGIA LTDA**

TESTEMUNHAS:



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



## ANEXO 4

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Lilian Rodrigues Orsolini, médica especialista em ginecologia e obstetria, aluna de mestrado e Talita Caldeirão, enfermeira mestre especialista em obstetria, aluna de doutorado da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de medicina de Botucatu, convidamos 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. **Pesquisador responsável:** Lilian Rodrigues Orsolini (Médica especialista em ginecologia e obstetria sob CRM 139084).

2. **Título da pesquisa:** EFEITOS DO USO DE ANTICONCEPCIONAIS HORMONAIS ORAIS COMBINADOS SOBRE A REMODELAÇÃO ÓSSEA DE ADOLESCENTES. **Pesquisador responsável:** Talita Caldeirão (Enfermeira especialista em obstetria e mestre sob COREN 212212).

**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 os objetivos da pesquisa:

O presente trabalho se justifica por meio das seguintes constatações: 1) embora existam alguns estudos nacionais, dos quais pelo menos dez realizados por pesquisadores da Faculdade de Medicina de Botucatu, e internacionais, para avaliar a massa óssea em indivíduos saudáveis durante a segunda década de vida, são poucas as investigações que pesquisaram a densidade mineral óssea de adolescentes usuárias de anticoncepcional oral combinado, principalmente entre pacientes do nosso meio. 2) Em relação a estes poucos estudos realizados, obtidos através de revisão da literatura, observa-se a falta de padronização do anticoncepcional prescrito, da avaliação precisa dos eventos da puberdade e da caracterização da maturidade esquelética. São raros, ainda, os trabalhos que correlacionam o exame de Densitometria Óssea (DXA) e os marcadores bioquímicos de remodelação óssea. 3) as avaliações relativas à massa óssea serão obtidas pelo exame chamado de Densitometria Óssea (DXA). Pretende-se com a avaliação da Densidade Mineral Óssea (DMO) utilizando o exame de Densitometria Óssea de coluna, fêmur proximal e corpo total esclarecer o possível efeito do anticoncepcional oral combinado sobre o ganho de massa óssea em adolescentes de 10 a 20 anos incompletos de idade.

Pesquisadora: Lilian Rodrigues Orsolini Rua Benedito Spinardi, 1440 Jardim Europa CEP 19815-110 Assis – SP. Fone: (18) 3325-1445 E-mail: [lorsolini@yahoo.com.br](mailto:lorsolini@yahoo.com.br) Orientadora: Dra. Tamara Beres Lederer Goldberg, Faculdade de Medicina de Botucatu – Departamento de Pediatria, Distrito de Rubião Júnior – Cep: 19618970, Botucatu – SP. Caixa postal: 530. Fone: (14) 3811.6274. Fax: (14) 3811.6083. E-mail: [tamarab@fmb.unesp.br](mailto:tamarab@fmb.unesp.br). Site [www.fmb.unesp.br](http://www.fmb.unesp.br)

## OBJETIVOS

1. Avaliar a densidade mineral óssea de adolescentes do sexo feminino de 10 a 20 anos incompletos usuárias e não usuárias de anticoncepcional oral combinado;
2. Realizar, interpretar e correlacionar: as avaliações antropométricas, as avaliações dos caracteres sexuais secundários, as idades ósseas através de radiografia da mão e punho, os exames de Densitometria Óssea para avaliação da massa óssea, os inquéritos e consumo alimentar, os marcadores bioquímicos de remodelação óssea destas adolescentes;
3. Investigar o impacto do uso do anticoncepcional oral combinado sobre a mineralização óssea das adolescentes.

## 4. Procedimentos que serão utilizados:

Avaliação Corporal: serão medidos o peso e a altura das adolescentes. Estes dados serão utilizados para fazer o cálculo do IMC (índice de massa corporal) classificando-as de acordo com seu peso e altura em: baixo peso, normal, com sobrepeso ou obesos. Será realizado também exame geral e específico das adolescentes, para que qualquer alteração física possa ser encontrada aplicando o exame de avaliação dos caracteres sexuais secundários como: desenvolvimento das mamas e dos pêlos pubianos. Este exame será realizado por um profissional médico especializado. Radiografia de Mão e Punho: será feita para avaliar a idade óssea (IO) das adolescentes e o seu grau de maturação esquelética através de um Rx do punho. Avaliação da Densidade Mineral Óssea: as adolescentes que cumprirem todas as etapas anteriores farão uma avaliação da quantidade de massa óssea através de um exame chamado Densitometria Óssea, onde serão observadas as regiões da coluna lombar, das pernas (osso do fêmur total) e corpo total. 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. Inquérito Alimentar: a avaliação alimentar será realizada por meio do registro alimentar de 3 dias. Este será entregue na primeira consulta. Serão fornecidas explicações e detalhes do preenchimento do registro nesta oportunidade, incluindo a necessidade do preenchimento do mesmo em dias alternados, ou seja, o adolescente deverá recordar o que comeu durante dois dias durante a semana e um dia da alimentação do fim de semana, irão anotar todos os alimentos e preparações consumidas, na forma de medidas caseiras, colocando a marca do produto, quando possível. Isto tudo para descobrir a quantidade de energia (kcal), carboidratos (açúcar), proteínas, gorduras e cálcio (mg) presentes na alimentação diária. Coleta de sangue: serão coletados 10 mL de sangue total com agulhas descartáveis e sistema de coleta a vácuo por profissional treinada, lotada em laboratório, após avaliação médica, durante o período de 8:00 às 9:00h, após jejum noturno de pelo menos dez horas, para observação dos marcadores de remodelação óssea em soro. Os procedimentos serão realizados uma vez por ano por um período de dois anos, nos momentos inicial, 12 e 24 meses.

## 5. Desconfortos e riscos esperados:

Para que participem deste trabalho, os adolescentes e seus responsáveis serão voluntários e os interessados assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido, uma vez estando cientes do conteúdo do projeto, de seus benefícios à sua saúde e sabendo que se retirarem seu consentimento para esta participação, não sofrerão qualquer prejuízo em seu acompanhamento de saúde. Todos os procedimentos serão realizados em horários que não conflitem com seu período de frequência à atividade escolar. Como já apresentado detalhadamente em outros Projetos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), desde 2002, os exames em questão: idade óssea e DXA, não ocasionam qualquer desconforto. Quanto à coleta sanguínea, existe um pequeno desconforto, porém a profissional que a realizará tem experiência e saberá como contornar a situação.

Pesquisadora: Lilian Rodrigues Orsolini Rua Benedito Spinardi, 1440 Jardim Europa CEP 19815-110 Assis - SP. Fone: (18) 3325-1445 E-mail: [lrosolini@yahoo.com.br](mailto:lrosolini@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](mailto:tamara@fmb.unesp.br). Site [www.fmb.unesp.br](http://www.fmb.unesp.br)

#### **6. Benefícios que poderão ser obtidos:**

Os benefícios estão relacionados aos conhecimentos obtidos pela pesquisa, uma vez que quase que de imediato 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. Métodos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:**

Não há outros procedimentos alternativos que possam avaliar o conteúdo mineral ósseo, bem como a perda de massa óssea.

#### **8. Duração da pesquisa:** 2 anos após a aprovação do comitê de ética

**9. Endereço do Comitê de Ética e Pesquisa:** Rua Chácara Butignolli , s/n Rubião Junior  
CEP:18.618-970 Município: Botucatu UF: São Paulo Telefone: (14)3880-1609 E-mail:  
cep@fmb.unesp.br

#### **CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Ficaram claros para mim 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 apresentado 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 após a aprovação do CEP 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.