UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de
moléculas de adesão em células endoteliais humanas**

Camila Marques de Andrade

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em **CIÊNCIAS**.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Camila Marques de Andrade

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Regina Torqueti

Ribeirão Preto
2009

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

Andrade, Camila Marques.

Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas. Ribeirão Preto, 2009. 100 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia. Orientadora: Torqueti, Maria Regina.

1.Fitoestrógenos. 2. Moléculas de adesão. 3. Aterosclerose.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Camila Marques de Andrade

Título do Trabalho: Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em **CIÊNCIAS**.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Regina Torqueti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

**Às pessoas mais valiosas de minha
vida...**

Agradecimentos

À Deus por todas as oportunidades de aprendizagem e crescimento concedidas e pelo discernimento e coragem para aproveitá-las.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Professor Dr. Marcelo Dias Baruffi pelos incansáveis esforços diante das dificuldades encontradas.

À Professora Maria Regina Torqueti Toloí pelo apoio e confiança.

Aos funcionários do Centro Cirúrgico e do Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo apoio na coleta de material.

Aos colegas de pós-graduação, aos técnicos dos laboratórios e aos meus colegas de trabalho pelos auxílios prestados.

Às demais pessoas que prestaram suas importantes contribuições: Michele, Sônia, Pita, Pâmela e Elainy.

Aos meus queridos amigos por me ouvirem.

Às raras pessoas que Deus me deu como família: minha mãe, meu pai, minha irmã e meu cunhado e ao Ricardo, pela presença constante e apoio irrestrito.

RESUMO

ANDRADE, C.M. **Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas.** 2009. 101f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os riscos provocados pela Terapia de Reposição Hormonal, levaram à busca de novas terapias, como os fitoestrógenos. São substâncias com ação estrogênica e propriedades que podem retardar a formação de placas ateroscleróticas. Isoflavonas são os fitoestrógenos mais estudados e são encontradas na soja, no “*red clover*” e em outras plantas. Avaliamos os efeitos dos fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*: genisteína, formononetina, biocanina A e daidzeína; a mistura entre eles (Mix1); o extrato padronizado de “*red clover*” (Menoflavon 40mg) e uma segunda mistura com os fitoestrógenos extraídos da *Glycine max* nas concentrações encontradas no Menoflavon (Mix2), na expressão de moléculas de adesão de leucócitos, VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, em cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), assim como na linhagem modificada de célula endotelial, ECV304, estimuladas com LPS. Resultados: foram padronizados os tempos e concentrações de exposição ao LPS no cultivo de HUVEC de 1ug durante 12 horas de exposição para as três moléculas de adesão; e no cultivo de ECV304 para a expressão de VCAM-1, de 500ng durante 12 horas, para ICAM-1 de 1ug durante 18 horas, para E-selectina 100ng durante 18 horas na superfície celular e 200ng durante 24 horas no sobrenadante de culturas de ECV304, permitindo que este tipo celular seja utilizado como modelo de inflamação. Os fitoestrógenos reduziram VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na superfície celular assim como as formas solúveis dessas moléculas, tanto em ECV304 como em HUVEC, sendo efetivos como agentes preventivos e também para tratamento da aterosclerose. A mistura entre os fitoestrógenos não apresentou maior eficiência na redução das moléculas de adesão na superfície celular, mas apresentou diferenças significativas na produção das formas solúveis. Tanto em ECV304, quanto em HUVEC os fitoestrógenos extraídos do *red clover* e os extraídos da soja *Glycine max* reduziram as moléculas de adesão na superfície celular e no sobrenadante, sendo que o Menoflavon, apresentou maior efetividade na redução das moléculas de adesão que os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*, em HUVEC. Ocorreram interações entre os fitoestrógenos e o 17 β estradiol, tanto em ECV304 quanto em HUVEC, principalmente quando este se encontrava em baixas concentrações, sugerindo proteção para mulheres na menopausa. Esses efeitos dos fitoestrógenos ocorreram via receptor de estrogênio, como demonstrado pela inibição de suas ações por ICI. Conclusão: tanto os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max* quanto os extraídos do *red clover* apresentaram efeitos anti-aterogênicos, podendo atuar como cardioprotetores para mulheres pós-menopausa.

Palavras-chave: fitoestrógenos, moléculas de adesão, aterosclerose, células endoteliais.

ABSTRACT

ANDRADE, C.M. **Phytoestrogens antiatherogenic effect on adhesion molecules expression on endothelial cells.** 2009. 101f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The risks of hormone replacement therapy have led to a search for new alternatives such as the use of phytoestrogens, plant compounds with estrogen-like biological activity. Isoflavones are the phytoestrogens most extensively studied and can be found in soy, red clover and other plants. Due this estrogen-like activity phytoestrogens can have some effect on atherosclerosis. We evaluated the effects of the phytoestrogens extracts from *Glycine max* soy: genistein, formononetin, biochanin A and daidzein; a Mix between them (Mix1); a standardized *red clover* extracts (Menoflavon 40mg) and a second Mix using phytoestrogens from *Glycine max* with same Menoflavon concentrations (Mix2) on adhesion molecules expression, VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin by endothelial cell HUVEC, and by endothelial cell line ECV304, stimulated with LPS. Results: were standardized time and concentration to LPS exposure, being 1 μ g during 12 hours for the three adhesion molecules expression on HUVEC, and 500ng during 12 hours for VCAM-1 expression, 1 μ g during 18 hours for ICAM-1 expression and 100ng during 18 hours for E-selectin expression on cell surface as well as 200ng during 24 hours to E-selectin increase on culture supernatant, on ECV 304 cell line. The phytoestrogens decreased VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin levels on cell surface and on culture supernatant in HUVEC and ECV304, being useful as preventive agents as well as treatment agents. Mix1 were not most effective than isolated phytoestrogens on cell surface, but presented decreased results on soluble forms. Menoflavon presented more effectiveness than *Glycine max* on HUVEC. Phytoestrogens interacted with 17 β oestradiol mainly, in low concentrations (10pg), showing protection for post menopausal women. These phytoestrogens effects happened by oestrogen receptor activation, this was demonstrated through phytoestrogens inhibition by ICI. Conclusions: the phytoestrogens from *Glycine max* as well as phytoestrogens from *red clover* presented antiatherogenic effects, mainly when 17 β estradiol is low, being usefull for postmenopausal women.

Keywords: adhesion molecules, phytoestrogens, atherosclerosis, endothelial cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Dosagens de VCAM-1 em ECV304 expostas ao LPS.....	28
Figura 2-	Dosagens de ICAM-1 em ECV304 expostas ao LPS.....	28
Figura 3-	Dosagens de E-selectina em ECV304 expostas ao LPS.....	29
Figura 4-	Dosagens de VCAM-1 em células HUVEC expostas ao LPS.....	32
Figura 5-	Dosagens de ICAM-1 em células HUVEC expostas ao LPS.....	32
Figura 6-	Dosagens de E-selectina em HUVEC expostas ao LPS.....	33
Figura 7-	Dosagens de VCAM-1 em ECV304 expostas aos fitoestrógenos.....	36
Figura 8-	Dosagens de ICAM-1 em ECV304 expostas aos fitoestrógenos.....	38
Figura 9-	Dosagens de E-selectina em ECV304 expostas aos fitoestrógenos....	39
Figura 10-	Dosagens de VCAM-1 em HUVEC expostas aos fitoestrógenos.....	40
Figura 11-	Dosagens de ICAM-1 em HUVEC expostas aos fitoestrógenos.....	40
Figura 12-	Dosagens de E-selectina em HUVEC expostas aos fitoestrógenos....	41
Figura 13-	Dosagens de VCAM-1 em ECV304 expostas ao Menoflavon.....	43
Figura 14-	Dosagens de ICAM-1 em ECV304 expostas ao Menoflavon.....	44
Figura 15-	Dosagens de E-selectina em ECV304 expostas ao Menoflavon.....	45
Figura 16-	Dosagens de VCAM-1 em HUVEC expostas ao Menoflavon.....	45
Figura 17-	Dosagens de ICAM-1 em HUVEC expostas ao Menoflavon.....	47
Figura 18-	Dosagens de E-selectina em HUVEC expostas ao Menoflavon.....	47
Figura 19-	VCAM-1: ação terapêutica dos fitoestrógenos em ECV304.....	48
Figura 20-	ICAM-1: ação terapêutica dos fitoestrógenos em ECV304...	49
Figura 21-	E-selectina: ação terapêutica dos fitoestrógenos em ECV304.....	50
Figura 22-	VCAM-1: ação terapêutica dos fitoestrógenos em HUVEC..	51
Figura 23-	ICAM-1: ação terapêutica dos fitoestrógenos em HUVEC...	52
Figura 24-	E-selectina: ação terapêutica dos fitoestrógenos em HUVEC.....	53
Figura 25-	VCAM-1: adição de estradiol-10pg aos fitoestrógenos em ECV304....	55
Figura 26-	VCAM-1: adição de estradiol-100pg aos fitoestrógenos em ECV304..	55
Figura 27-	ICAM-1: adição de estradiol-10pg aos fitoestrógenos em ECV304.....	58
Figura 28-	ICAM-1: adição de estradiol-100pg aos fitoestrógenos em ECV304....	59
Figura 29-	E-selectina: adição de estradiol-10pg aos fitoestrógenos em ECV304	60
Figura 30-	E-selectina: adição de estradiol-100pg aos fitoestróg. em ECV304.....	60
Figura 31-	VCAM-1: adição de estradiol-10pg aos fitoestrógenos em HUVEC.....	61
Figura 32-	VCAM-1: adição de estradiol-100pg aos fitoestrógenos em HUVEC...	62
Figura 33-	ICAM-1: adição de estradiol-10pg aos fitoestrógenos em HUVEC.....	63
Figura 34-	ICAM-1: adição de estradiol-100pg aos fitoestrógenos em HUVEC.....	63
Figura 35-	E-selectina: adição de estradiol-10pg aos fitoestrógenos em HUVEC.	66
Figura 36-	E-selectina: adição de estradiol-100pg aos fitoestróg. em HUVEC.....	67
Figura 37-	VCAM-1: tratamento frente ao ICI em ECV304.....	68
Figura 38-	ICAM-1: tratamento frente ao ICI em ECV304.....	69
Figura 39-	E-selectina: tratamento frente ao ICI em ECV304.....	69
Figura 40-	VCAM-1: tratamento frente ao ICI em HUVEC.....	70
Figura 41-	ICAM-1: tratamento frente ao ICI em HUVEC.....	71
Figura 42-	E-selectina: tratamento frente ao ICI em HUVEC.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de VCAM-1 por ECV304 após estímulo por LPS.....	29
Tabela 2 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de ICAM-1 por ECV304 após estímulo por LPS.....	30
Tabela 3 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de E-selectina por ECV304 após estímulo por LPS.....	31
Tabela 4 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de VCAM-1 por HUVEC após estímulo por LPS.....	33
Tabela 5 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de ICAM-1 por HUVEC após estímulo por LPS.....	34
Tabela 6 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de E-selectina por HUVEC após estímulo por LPS.....	34
Tabela 7 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 24 horas.....	37
Tabela 8 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 48 horas.....	37
Tabela 9 -	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 24 horas.....	41
Tabela 10-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 48 horas.....	42
Tabela 11-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 24 horas.....	43
Tabela 12-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 48 horas.....	44
Tabela 13-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 24 horas.....	46
Tabela 14-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 48 horas.....	46
Tabela 15-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 24 horas.....	49
Tabela 16-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 48 horas.....	50
Tabela 17-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 24	

	horas.....	52
Tabela 18-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 48 horas.....	53
Tabela 19-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 10pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.....	56
Tabela 20-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 10pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.....	57
Tabela 21-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.....	57
Tabela 22-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.....	58
Tabela 23-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 10pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.....	64
Tabela 24-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 10pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.....	65
Tabela 25-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.....	65
Tabela 26-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.....	66
Tabela 27-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com antiestrógenos (ICI) e fitoestrógenos, durante 24 horas.....	68
Tabela 28-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente tratadas com antiestrógenos e fitoestrógenos, durante 24 horas...	72
Tabela 29-	Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente tratadas com antiestrógenos e fitoestrógenos, durante 48 horas...	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAM	Cell Adhesion Molecules
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECV	Transformed Human Endothelial Vein Cell Line
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócito-macrófago
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM ou CD54	Intercellular Adhesion Molecule
ICI	Antiestrógeno
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
JAMs	Junctional Adhesion Molecules
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína 1 quimioatraente para monócitos
Mix1	Mistura 1
Mix2	Mistura 2
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM ou CD31	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PLB	Ligand Protein Binding
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTH	Paratormônio
rhEGF	Epidermal Growth Factor Human Recombinant
rhFGF	Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-B
rhVEGF	Endothelial Growth Factor Vascular Human Recombinant
R ³ -IGF-1	Recombinant Long R Insulin-like Growth Factor-1
RPM	Rotações por minuto
sCAM	Soluble Cell Adhesion Molecule
sICAM	Soluble Intercellular Adhesion Molecule
SMCs	Smooth Muscular Cell
sVCAM	Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule
TER	Terapia de Reposição de Estrogênio
TNF	Fator de necrose tumoral
TRH	Hormonal Replacement Therapy
VCAM ou CD106	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Células endoteliais.....	1
1.2 Moléculas de adesão e processo inflamatório.....	2
1.3 Moléculas de adesão e aterosclerose.....	4
1.4 Aterosclerose e estrógeno.....	5
1.5 Terapia de Reposição Hormonal.....	6
1.6 Fitoestrógenos.....	8
1.7 Cultura de células endoteliais.....	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivos gerais.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Coleta, extração, cultivo e identificação de células endoteliais humanas de cordão umbilical.....	14
3.1.1 Coleta de cordão umbilical.....	14
3.1.2 Extração de células endoteliais humanas de cordão umbilical (HUVEC).....	14
3.1.3 Cultivo de HUVECs.....	15
3.1.4. Identificação das HUVECs.....	16
3.2. Cultivo de ECV 304.....	16
3.3 Metodologias empregadas.....	17
3.4. Padronização do estímulo por LPS nas células endoteliais, ECV304 e HUVEC.....	17
3.4.1. Padronização do estímulo por LPS nas células ECV304 e HUVEC para a produção de sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina no sobrenadante das culturas por ELISA.....	17
3.4.2. Padronização do estímulo por LPS nas células ECV304 e HUVEC para a produção de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na superfície celular por EIA....	18
3.5. Avaliação da ação dos fitoestrógenos nas células ECV304 e HUVEC.....	19
3.5.1. Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 por ELISA.....	19
3.5.2. Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 por EIA.....	20
3.6. Avaliação da ação do Menoflavon e do Mix2 em ECV304 e HUVEC.....	21
3.6.1 Avaliação do Menoflavon e Mix2 por Elisa.....	21
3.6.2. Avaliação do Menoflavon e Mix2 por EIA.....	22
3.7. Verificação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos, em ECV304 e HUVEC.....	22
3.7.1. Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica por ELISA.....	22
3.7.2. Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica por EIA.....	23
3.8. Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais HUVEC e ECV304, tratadas com 17 β estradiol.....	23
3.8.1. Avaliação da existência de interações entre fitoestrógenos e 17B	

estradiol por ELISA.....	23
3.8.2.Avaliação da existência de interações entre fitoestrógenos e 17B estradiol por EIA.....	24
3.9. Determinação da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais ECV304 e HUVEC, frente ao tratamento com fitoestrógenos e com antiestrógeno puro (ICI, 182.780).....	25
3.9.1 Avaliação frente ao tratamento com antiestrógeno ICI por ELISA.....	25
3.9.2. Avaliação frente ao tratamento com antiestrógeno ICI por EIA.....	26
3.10.Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Padronização do estímulo por LPS nas células endoteliais, ECV304 e HUVEC e análise da expressão de CD31 em HUVECs.....	28
4.1.1. Padronização do estímulo por LPS em ECV304, por ELISA e por EIA....	28
4.1.2. Expressão de CD31 em HUVEC.....	31
4.1.3. Padronização do estímulo por LPS em HUVECs, por ELISA e por EIA...	32
4.2.Avaliação da ação dos fitoestrógenos nas células ECV304 e HUVEC, por ELISA e por EIA.....	35
4.2.1 Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 em ECV304, por ELISA e por EIA..	35
4.2.2. Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 em HUVEC, por ELISA e por EIA..	40
4.3. Avaliação da ação do Menoflavon e do Mix2 em ECV304 e HUVEC, por ELISA e por EIA.....	43
4.3.1 Avaliação do Menoflavon e Mix2 em ECV304.....	43
4.3.2.Avaliação do Menoflavon e Mix2 em HUVEC.....	45
4.4. Verificação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos, em ECV304 e HUVEC, por ELISA e por EIA.....	48
4.4.1 Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos em ECV304.....	48
4.4.2 Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos em HUVEC.....	51
4.5 Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais HUVEC e ECV304, tratadas com 17B estradiol.....	54
4.5.1. Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais ECV304, tratadas com 17 β estradiol , por ELISA e por EIA.....	54
4.5.2. Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais, HUVECs, tratadas com 17 β estradiol, por ELISA e por EIA.....	61
4.6. Determinação da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais ECV304 e HUVEC, frente ao tratamento com fitoestrógenos e com antiestrógeno puro (ICI, 182.780), por ELISA e por EIA.....	67
4.6.1. Avaliação do tratamento com antiestrógeno (ICI) em ECV304, por ELISA e por EIA.....	67
4.6.2. Avaliação do tratamento com antiestrógeno (ICI) em HUVECs, por ELISA e por EIA.....	70
5. DISCUSSÃO.....	75
6.0 CONCLUSÕES.....	87
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1- INTRODUÇÃO

1.1.– Células endoteliais

Células endoteliais são células epiteliais escamosas alongadas que formam uma camada única revestindo internamente todos os vasos sanguíneos, mediando, portanto, as interações entre o sangue e os tecidos. Desempenham assim, funções primordiais na biologia vascular em condições fisiológicas ou patológicas (CINES et al., 1998; WIEL et al., 2005).

Corpúsculos de Weibel-Palade são grânulos secretores especializados encontrados nas células endoteliais. Essas vesículas armazenam pré-hormônios e fatores de crescimento, além de enzimas, receptores e moléculas de adesão, que podem ser liberados e/ou expressos na superfície da célula sem síntese protéica “de novo” por exocitose regulada em resposta à ativação da célula. (MICHAUX; CUTLER, 2004). Células endoteliais são heterogêneas quanto a sua capacidade funcional e morfologia celular e têm funções distintas em diferentes vasos, tecidos e órgãos (GEBB; STEVENS, 2004).

A célula endotelial ao formar o endotélio mantém interações não só entre si (junções celulares) (STAEHELIN; HELL, 1976), como também com células musculares lisas que existem na túnica íntima (junções mioendoteliais) (ROBERT; BIREMBAUT, 1989) e, por meio de filamentos ancorantes, com a lâmina basal (constituída principalmente de laminina e colágeno) sobre a qual repousa (MOHAMMAD; BOS, 1990).

Estas interações da célula endotelial participam da função física do endotélio (a de barreira entre o sangue e a camada subendotelial altamente trombogênica), permitindo uma maior resistência aos estresses provocados sobre o vaso, devido a estiramentos e à circulação dos elementos figurados do sangue; também participam da função de filtro desempenhada pela camada endotelial ao regular a passagem seletiva de moléculas, por difusão, da luz para o interior da parede vascular. Tanto a função de

barreira quanto a de filtro se faz por conta principalmente das junções celulares (MILLER; BURNETT, 1990).

Além das funções acima citadas, ganha maior destaque, hoje, o papel modulador do endotélio, pela sua atividade de síntese e secreção de moléculas com atividades sobre a a vasomotricidade (angiotensina II, fator de relaxamento derivado do endotélio, endotelina) (COSENTINO; VOLPE, 2005); hemostasia (anticoagulantes: prostaciclina, antitrombina III, proteínas C e S, trombomodulina; pró-coagulantes: fator de von Willebrand, alfa 2 macroglobulina, tromboplastina) (CHEN; LOPEZ, 2005); formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (GERHARDT; BETSHOLTZ, 2005); processos inflamatórios (interleucinas) e na adesão e trânsito dos leucócitos, as chamadas moléculas de adesão celular, CAM (CAMs – *cell adhesion molecules*) (COOK-MILLS; DEEM, 2005).

1.2-Moléculas de adesão e processo inflamatório

O processo inflamatório controla a resposta complexa do tecido vascularizado à injúria celular. Uma seqüência progressiva de ligações pareadas entre moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais e ligantes dos leucócitos provoca a transmigração do leucócito para o endotélio. Esses passos são descritos como adesão, rolamento, ativação de leucócitos e adesão firme. O passo final desta seqüência, a migração transendotelial, ocorre nas junções entre as células endoteliais (LIU et al, 2004; MULLER, 2002).

As moléculas de adesão celular são implicadas em muitas doenças inflamatórias tais como esclerose múltipla, asma e artrite reumatóide. Diferentes subconjuntos de moléculas de adesão são mostrados como responsáveis pelo rolamento e seqüestro das células inflamatórias circulantes no endotélio vascular (CARLOS; HARLAN, 1994). Isto ocorre via modulação da expressão de CAM na superfície das células endoteliais e sua interação com os leucócitos.

As moléculas de adesão pertencem a quatro principais famílias protéicas: selectinas, ligantes de selectina, integrinas e membros da família das imunoglobulinas.

Selectinas são glicoproteínas transmembrana com domínios extracelulares homólogos que variam em comprimento e domínios citoplasmáticos intracelulares sem homologia, que induzem o “*rolling*” dos leucócitos e são moléculas que se ligam a carboidratos, formando três subfamílias (HUO; LEY, 2001): P-selectinas (CD62P, 120-140kd) armazenadas nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais e nos grânulos alfa das plaquetas, são expressas por células endoteliais e plaquetas ativadas, rapidamente translocadas para a superfície das células em resposta a um estímulo pró-inflamatório (TEDDER et al., 1995). A glicoproteína-1 da P-selectina (*PSGL-1- P-selectin glycoprotein ligand-1*) é o principal ligante para P-selectina, e a ligação desses dois fatores é crucial para o “*rolling*” dos leucócitos no local de inflamação (KANSAS, 1996). P-selectina atinge a superfície celular minutos após a estimulação da célula endotelial; E-selectina (CD62E, 107-115kd), outra subfamília de selectina, não é expressa em condições fisiológicas normais, mas é sintetizada e exportada para a superfície da célula endotelial ativada em situações inflamatórias (BEVILACQUA et al., 1987), (sua expressão na superfície requer síntese “de novo”); e finalmente L-selectina (CD62L, 95kd) é expressa em todos os granulócitos, monócitos e na maioria dos linfócitos (LEY, 2003).

Integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas também são mediadores da adesão e transmigração de leucócitos para a parede vascular. Integrinas consistem de uma subunidade beta comum, ligada com várias subunidades alfa. Várias repetições extracelulares de domínios IgG-like, uma região transmembrana e um curto domínio citoplasmático, caracterizam os membros da superfamília das imunoglobulinas (CARLOS; HARLAN, 1994). Entre eles estão as moléculas de adesão intercelular, ICAM, 1, 2 e 3 (*ICAM ou CD54 – intercellular adhesion molecule*), de 97-114 kd, expressas constitutivamente em baixos níveis; moléculas de adesão à célula vascular-1, VCAM-1 (*VCAM ou CD106- vascular cell adhesion molecule*), de 100-110 kd, expressa por células endoteliais ativadas e por células dendríticas foliculares; e molécula de adesão célula endotelial-plaqueta-1, PECAM ou CD31 (*PECAM- platelet endothelial cell adhesion molecule*). A função principal dessas moléculas é agir como receptores de integrinas. A inibição da interação entre as moléculas de adesão e seus

ligantes reduz a adesão dos leucócitos, a diapedese e em alguns casos, também afeta o “*rolling*” dos leucócitos (COLLINS et al., 2000).

Moléculas de adesão juncional, JAM (*JAMs – junctional adhesion molecules*) são membros da superfamília das IgG e são localizadas em junções firmes e ao longo da membrana lateral das células epiteliais. Proteínas JAM são também encontradas em junções intercelulares de células endoteliais e na superfície de leucócitos, plaquetas e eritrócitos (CHAVAKIS et al., 2004).

1.3– Moléculas de adesão e aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, e umas das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (HOMEM DE BITTENCOURT et al., 2006). Hiperlipidemia, diabetes, hipertensão, obesidade e o hábito de fumar são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (HANSSON, 2005).

As lesões se caracterizam pelo acúmulo de lipídios, elementos do tecido conectivo e infiltrados imunes mais comumente nas artérias aorta, carótidas, coronárias, ilíacas e femorais (GLASS; WITZUM, 2001). O processo inflamatório é determinante em todos os estágios da aterosclerose, desde a formação das primeiras lesões, até a ocorrência de complicações clínicas (LIBBY, 2002).

Sob condições normais, as células endoteliais inibem a adesão de leucócitos e plaquetas à superfície vascular. Fatores de risco como hiperlipidemia, agentes tóxicos ou infecciosos (MATTI; ADLERCREUTZ; ADLERCREUTZ, 2000), provocam injúria endotelial, estimulando as células e iniciando uma resposta inflamatória na parede arterial (LTEIF; HAN; MATHER, 2005).

Nas células endoteliais estimuladas ocorre a ativação de genes, alterando a expressão de suas moléculas e, como consequência, moléculas quimiotáticas são secretadas e vários tipos de moléculas de adesão de leucócitos (CAMs) são apresentados em sua superfície. São moléculas citocina induzidas que direcionam o trânsito de leucócitos entre a corrente sanguínea e os tecidos extravasculares.

Essas mudanças celulares causam o “*rolling*” de leucócitos ao longo da superfície vascular e ativação de locais para a adesão de células (NAKASHIMA et al.,

1998), preferencialmente em locais de esforço hemodinâmico. A força de fricção do sangue em movimentação sobre o endotélio, “*shear stress*”, baixo ou oscilatório reduz a produção de óxido nítrico (NO), aumenta a expressão de fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B, aumenta a expressão de moléculas de adesão e regula o padrão de moléculas juncionais nas células endoteliais. Essas alterações contribuem para a migração celular ao local propenso à aterosclerose (CUNNINGHAM; GOTLIEB, 2005).

No local da inflamação os leucócitos circulantes rolam ao longo da parede vascular através de interações mediadas por selectinas com o endotélio. Como consequência, quimiocinas secretadas localmente vão mediar o seqüestro e a diapedese transendotelial dos leucócitos em rolamento. Este último passo também envolve moléculas de adesão como integrinas, membros da família das imunoglobulinas, e também junções gap.

A migração de monócitos, células T e em menor extensão de células musculares lisas, SMCs (*SMCs – smooth muscular cell*) leva a um acúmulo dessas células dentro da íntima vascular, resultando em formação de neo-íntima. Esses processos inflamatórios crônicos iniciais levam à formação da lesão aterosclerótica primária, a camada gordurosa (*fatty streak*).

O contínuo recrutamento de SMCs, juntamente com a proliferação de componentes da matriz extracelular e o acúmulo de lipídios, caracteriza as fases seguintes da aterosclerose, a camada fibro-gordurosa (*fibrofatty*) e a formação da placa fibrosa (ROSS, 1999). Dependendo da estabilidade da lesão, a placa pode se romper e provocar trombose, causando os eventos vasculares agudos (BRAUNERSREUTHER; MACH, 2006).

1.4. Aterosclerose e estrógeno

A incidência de aterosclerose é menor em mulheres pré-menopausa do que em homens da mesma faixa etária, e aumenta drasticamente após a menopausa (LERNER; KANNEL, 1986). Essa diferença tem sido tradicionalmente atribuída ao estrógeno, devido sua ação cardioprotetora através de modificações positivas no perfil lipídico (NABULSI et al., 1993).

Entretanto, têm sido acumuladas evidências suportando o conceito que a principal parte do efeito benéfico dos hormônios esteróides sexuais femininos é exercida diretamente na parede vascular, através de mecanismos independentes dos lipídios (SIMONCINI et al., 2000). Isto porque, muitos tipos celulares vasculares expressam receptores alfa e beta, e são funcionalmente regulados por estrógenos (MENDELSON; KARAS, 1999).

Os estrógenos naturais aumentam a liberação de moléculas anti-aterogênicas derivadas do endotélio como o óxido nítrico (CAULIN-GLASER et al., 1997) e reduzem a expressão das moléculas de adesão (CAMs) envolvidas nas interações endotélio-leucócitos induzidas por citocinas inflamatórias (De CATARINA et al., 1995), indicando seu importante papel anti-aterogênico através da regulação da função das células endoteliais.

Isto levou à hipótese que não somente o estrógeno endógeno mas também os hormônios sexuais exógenos têm efeito cardioprotetor nas mulheres pós-menopausa. Dessa maneira, muitos estudos sugeriram que a terapia de reposição hormonal -TRH- *hormonal replacement therapy* - estaria associada com redução do risco de eventos cardiovasculares (GRODSTEIN et al., 1996).

1.5. Terapia de Reposição Hormonal

A criação do primeiro estrogênio sintético (dietil-estilbestrol) deu início em 1960 ao uso desses medicamentos por mulheres. Inicialmente como anticoncepcionais orais, passando em 1966 a serem utilizados por mulheres na menopausa. A nova terapia passou a ser chamada de terapia de reposição de estrogênio (TRE), sendo este hormônio utilizado isoladamente e em altas doses. Em 1975, um estudo demonstrou que o risco de câncer de endométrio aumentava 7,6 vezes em mulheres que usavam estrogênio. (SELLMAN, 1998).

A partir daí esse hormônio passou a ser associado a uma progesterona sintética, a progestina, mimetizando a ação natural da progesterona na proteção do útero contra os efeitos proliferativos do estrogênio. Surgiu então, a terapia de reposição hormonal estroprogestiva (SELLMAN, 1998). Seu uso se difundiu e esta terapia passou a ser

utilizada para tratar os sintomas da menopausa, como ondas de calor e atrofia urogenital, durante curtos períodos.

Utilizando estrógeno sozinho, em diversas preparações e vias de administração ou combinado com progesterona (RYMMER; MORRIS, 2000), também passou a ser utilizada para prevenção de condições crônicas tais quais: osteoporose (HUMPHREY; CHAN; SOX, 2002), por aumentar a densidade mineral óssea, reduzindo o risco de fraturas (WEISS; URE; BALLARD, 1980; NAESEN; PERSSON; ADAMI, 1990), demência, distúrbios cognitivos, Doença de Alzheimer (HENDERSON et al., 1994; TANG et al., 1996; YAFFE et al., 1998) e doenças cardiovasculares (GRODSTEIN et al., 1996).

Durante este período muitos estudos foram realizados com resultados sempre controversos, que atestavam desde distúrbios tromboembólicos (CANO; VAN BAAL, 2001) até aumento do risco de doença coronariana (GRODSTEIN et al., 1996).

Entretanto, em 2002, o Women's Health Initiative Hormone Program, estudou 16608 mulheres que utilizavam TRH combinando estrógeno eqüino e acetato de medroxyprogesterona ou placebo, avaliando os riscos e benefícios da utilização de hormônios na menopausa.

Após cinco anos de seguimento, o estudo foi interrompido pois os riscos: câncer de mama, infartos, doenças cardiovasculares e tromboembolismo, superaram os benefícios: redução do número de fraturas e de câncer de cólon e reto, concluindo que o regime de TRH utilizado não ofereceu efeito cardioprotetor, sendo somente recomendado para alívio dos sintomas da menopausa durante curtos períodos (WHI, 2002).

Dessa maneira, uma posição conservadora em iniciar uma terapia de reposição hormonal de longa duração passou a ser tomada (STORK et al., 2002), e as mulheres se tornaram hesitantes em iniciar ou continuar um tratamento hormonal, sendo necessário buscar novas alternativas de terapia.

Nesse contexto, muitos grupos começaram a explorar a atividade estrogênica de compostos naturais encontrados em certas plantas em altas concentrações, os chamados fitoestrógenos, partindo da observação que mulheres asiáticas, que mantêm

dietas com alta ingestão de fitoestrógenos, tem uma menor incidência de sintomas da menopausa e de doença cardiovascular (NAGATA; TAKATSUKA; SHIMIZU, 2002).

1.6 Fitoestrógenos

Fitoestrógenos são componentes de plantas polifenólicos não esteroidais com atividade biológica semelhante à do estrogênio e que se ligam aos receptores de estrogênio humano, exercendo as características do hormônio endógeno.

De acordo com sua estrutura química os fitoestrógenos podem ser classificados em quatro grupos: isoflavonas, flavonóides, estilbenes e ligninas (WUTTKE et al., 2002). As isoflavonas são o grupo mais estudado e foram primariamente encontrados na soja *Glycine max* e mais tarde descobertos em outras plantas: Mexican Wild Yam (*Dioscorea composita*), “red clover” (*Trifolium pratense*), *Cimicifuga racemosa*, no linho, centeio e outros (EDEN, 2001) (XU et al., 1995).

As isoflavonas presentes nos produtos de soja, entretanto, podem apresentar grande variação em suas quantidades e qualidade de acordo com a variedade de soja e seu processo de obtenção (WANG; MURPHY, 1994), sendo os extratos de “red clover” referidos freqüentemente como sendo melhores que de outras plantas como fonte de fitoestrógenos, principalmente devido à padronização do processo de extração das isoflavonas, fazendo com que composições confiáveis de medicação possam ser obtidas. Além disso, as isoflavonas contidas nos extratos de “red clover” possuem alta atividade estrogênica, devido à transformação mais ativa dos compostos através da absorção intestinal (BECK et al., 2003).

As principais isoflavonas são genisteína, formononetina, biocanina A e daidzeína que é também metabolizada a equol (BAKHIT; KLEIN; ESSEX-SORLIER, 1994).

Devido a suas características, há um crescente interesse na utilização de fitoestrógenos como alternativa à terapia hormonal, pois se sugere que principalmente as isoflavonas podem reduzir os efeitos do climatério e suas conseqüências, com efeitos colaterais reduzidos se comparada à terapia hormonal (VERHOEVEN et al., 2005), o que tornou disponível no mercado medicamentos a base de fitoestrógenos.

Dentre eles, está o Menoflavon (Named, Itália), cujas isoflavonas são extraídas da planta “*red clover*”.

Os efeitos das isoflavonas em relação aos sintomas da menopausa não estão ainda bem esclarecidos, alguns estudos afirmam que o uso de isoflavonas diminui a ocorrência de ondas de calor, enquanto outros não encontraram resultados significativos (COS et al., 2003). Também em relação a hemostasia (RIOS et al., 2008), demonstraram um menor efeito colateral das isoflavonas quando comparadas a TRH clássica.

Quanto à osteoporose estudos afirmam que as isoflavonas aumentam a densidade óssea, por diminuírem a reabsorção de osso. Pessoas em uso de isoflavonas têm menores índices de PTH (paratormônio) e osteocalcina (MEI; YEUNG; KUNG, 2001). Entretanto, já é sabido que a ingestão de soja e seus metabólitos (genisteína e daidzeína) reduz o colesterol total, principalmente pela redução de LDL, reduz triglicerídeos e aumenta HDL (NESTEL; YAMASHITA; SASAHARA, 1997), (WASHBURN et al., 1999; MERRITT, 2004).

Os fitoestrógenos têm efeito inibitório nas etapas de migração e proliferação das células musculares lisas (FUJIO et al., 1993; SHIMOKADO et al., 1994), provavelmente devido à expressão de beta receptores de estrogênio no tecido vascular e em outros tecidos não reprodutivos. Além disso, a genisteína é um inibidor específico da tirosina quinase (AKIYAMA et al., 1987) e as isoflavonas têm um papel antioxidante, aumentando a resistência das lipoproteínas à oxidação.

De acordo com esses mecanismos de ação, os fitoestrógenos podem retardar o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (MATTI; ADLERCREUTZ; ADLERCREUTZ, 2000), entretanto, seus efeitos sobre a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais humanas ainda não estão bem esclarecidos.

1.7- Cultura de células endoteliais

O uso de células endoteliais humanas em sistemas de cultura “*in vitro*” tem sido indispensável para a padronização de modelos experimentais relevantes de inflamação,

angiogênese, cicatrização, regulação do fluxo sanguíneo, aterosclerose, crescimento tumoral e metástase (UNGER et al., 2002).

Como a lâmina basal das células endoteliais é constituída de laminina e colágeno, a digestão desta lâmina por collagenase permite o isolamento das células endoteliais para seu estudo e cultura “*in vitro*” (MOHAMMAD; BOS, 1990). Métodos de isolamento e cultura de células endoteliais humanas primárias de várias fontes, tais como: prepúcio, medula óssea, placenta, pulmão e cérebro têm sido estabelecidos (HEWETT; MURRAY, 1993; SCHUTZ; FRIEDL, 1996), sendo as células endoteliais da veia umbilical humana, HUVEC (*HUVECs – human umbilical vein endothelial cells*) as de obtenção mais acessível.

HUVECs têm sido usadas extensivamente para estudar a biologia e a patobiologia da célula endotelial humana, e a maioria dos conhecimentos adquiridos é devida aos experimentos com culturas desta célula. A principal vantagem de seu uso é uma maior disponibilidade do cordão umbilical, um método relativamente simples de extração e a pureza da população de células obtida.

Entretanto, o isolamento de células endoteliais humanas é demorado e a produção é freqüentemente baixa. Além disso, o uso de células primárias também tem como desvantagens a presença de células contaminantes, uma progressiva perda de viabilidade, a expressão alterada dos marcadores endoteliais durante o curso da propagação *in vitro* e diferenças genéticas dos isolados.

Dessa maneira, como alternativa à cultura de HUVECs, existe uma linhagem de laboratório, de células endoteliais humanas imortalizadas, denominada ECV (*ECV 304 - transformed human endothelial vein cell line*), que caso apresente utilidade e efetividade como modelo de cultura pode ser utilizada para evitar as desvantagens causadas pela cultura de células primárias.

Células endoteliais exibem características celulares específicas que definem o tipo celular. Células endoteliais primárias exibem uma alta produção de fator de von Willebrand (vWF) constitutivo (JAFFE; HOYER; NACHMAN, 1974), moléculas de adesão célula endotelial-plaquetas (PECAM-1, CD31) (ALBELDA et al., 1990), os dois fatores de crescimento endotelial vascular, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e

In vitro, as células endoteliais, caracteristicamente respondem a estímulos pró-inflamatórios tais como fator de necrose tumoral (TNF), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e interleucina-1 (IL-1) com indução da expressão de moléculas de adesão celulares tais como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (DUSTIN; SPRINGER, 1998; BEVILLACQUA et al., 1987; OSBORN et al., 1989) na superfície celular, além de secretarem citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), proteína 1 quimioatraente para monócitos (MCP-1) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (MAY et al., 1989; GIMBRONE et al., et al., 1990; LENHOFF; OLOFSSON, 1996).

2.- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais: estudar a ação anti-aterogênica das isoflavonas extraída da soja *Glycine max*: genisteína, formononetina, biocanina A e daidzeína individualmente; da mistura entre elas; assim como avaliar a ação anti-aterogênica das isoflavonas extraídas planta “*red clover*” que compõe o medicamento Menoflavon, comparando-as, em cultura de células endoteliais humanas, verificando o possível efeito inibitório destes compostos na expressão das moléculas de adesão endotelial VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, num modelo “*in vitro*” de inflamação endotelial que mimetize as condições da aterogênese inicial.

2.2- Objetivos específicos

- 1) Padronização da coleta do cordão umbilical, extração, cultivo e identificação de HUVECs;
- 2) Determinar se é possível estimular a produção das três moléculas de adesão na linhagem laboratorial de células endoteliais humanas imortalizadas, ECV304, verificando sua utilidade como modelo inflamatório de cultura e qual tempo de exposição e concentração de LPS apresentam essa efetividade;
- 3) Determinação do tempo de exposição e da concentração ideal de LPS para estimular a produção de moléculas de adesão nas células endoteliais, HUVECs;
- 4) Avaliar a ação de cada fitoestrógeno e da mistura entre eles na concentração plasmática (Mix1), verificando a existência de interação quando usados em conjunto, sobre a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais (HUVEC e ECV304);
- 5) Avaliar a ação dos fitoestrógenos extraídos da planta “*red clover*”, que compõem o medicamento Menoflavon e da mistura de fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max* na concentração encontrada no extrato de “*red clover*”, (Mix2) comparando-os, na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina nas células endoteliais, HUVEC e ECV304;

- 6) Verificar a existência de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos, misturas e Menoflavon, adicionando-os anteriormente e posteriormente ao LPS, através da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais HUVEC e ECV304;
- 7) Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais (HUVEC e ECV304) tratadas com 17β estradiol em concentração próxima à encontrada na menopausa (10 pg/mL) e em concentração encontrada nas mulheres em idade fértil (100 pg/mL);
- 8) Determinação da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (HUVEC e ECV304) frente ao tratamento dos fitoestrógenos, misturas e Menoflavon com antiestrógenos puros (ICI, 182.780);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e as pacientes que doaram seus cordões umbilicais deram seu consentimento por escrito.

3.1 Coleta, extração, cultivo e identificação de células endoteliais humanas de cordão umbilical

3.1.1- Coleta de cordão umbilical

Cordões umbilicais de no mínimo 20cm de comprimento, devem ser coletados após partos normais ou cesarianas de pacientes saudáveis, com precauções para que não haja furos nos cordões. Os mesmos são depositados em frascos estéreis contendo solução salina com 1% de antibiótico/antimicótico e pH 7,4, evitando manipulação excessiva dos cordões e exposição prolongada do frasco aberto, para evitar contaminações.

3.1.2 – Extração de células endoteliais humanas de cordão umbilical (HUVEC)

Em capela de fluxo laminar, sob condições estéreis, limpar o cordão externamente com álcool 70° e canular com torneiras de duas ou três vias as duas extremidades da veia umbilical, amarrando com fio de algodão 2.0 para fixação da cânula. Limpar o cordão internamente com PBS 1X para a retirada de coágulos (≈100 mL de PBS). Fechar a extremidade inferior e com uma seringa injetar na extremidade superior, cerca de 20mL de collagenase (mantida a 37° C) tipo IA a 1mg/mL, filtrada (0,22µm) (LIBBY et al., 1996), (evitar exposição à luz devido a fotossensibilidade), preenchendo toda a veia e colocando o cordão em recipiente estéril em estufa a 37°C durante 15 minutos. Após a incubação, abrir a extremidade inferior do cordão e recolher todo seu conteúdo em tubo estéril contendo meio de cultura 199 sem fenol red, com 1% de antibiótico/antimicótico e pH 7,4, (usado com o objetivo de neutralizar os efeitos

nocivos da collagenase após a extração das células endoteliais), massageando externamente o cordão até o seu total esvaziamento. Passar 20 mL de collagenase para soltar o restante das células e então 10 mL de meio 199 no cordão para assegurar a retirada de todas as células. Centrifugar por 10min a 4°C, 1000g. Descartar o sobrenadante, ressuspender o sedimento celular delicadamente com 1 mL de meio de cultura, procedendo a contagem das células em câmara de Neubauer (VWR Scientifics). A porcentagem de células não coradas pelo azul de Trypan (Trypan Blue) é tomada como medida da viabilidade celular (LIBBY et al., 1996). Passar a suspensão de células para frasco de cultura de 75cm², contendo 10 mL de meio EBM₂, (Lonza Group., Switzerland), com 2% de soro bovino fetal, 0,4 uL/mL de hidrocortisona, 4 uL/mL de rhFGF-B (*rhFGF – Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-B*), 1 uL/mL de VEGF (*VEGF – Endothelial Growth Factor Vascular Human Recombinant*), 1uL/mL de R³-IGF-1 (*R³-IGF-1 – Recombinant Long R Insulin-like Growth Factor-1*), 1uL/mL de ácido ascórbico, 1uL/mL de rhEGF (*rhEGF -Epidermal Growth Factor Human Recombinant*), 1 uL/mL de gentamicina/anfotericina-B e 1 uL/mL de heparina, não havendo necessidade de “coat” de gelatina no frasco de cultura. Incubar a 37°C com CO₂ 5% durante 5 dias. Células isoladas com essa técnica formam monocamadas confluentes de células poligonais (paralelepípedos) e expressam fator de von Willebrand e CD31.

3.1.3 Cultivo de HUVECs

Após a extração (em média $9,5 \times 10^6$ células para um cordão de 36 cm), colocar as células em garrafas de 75 cm² com 10 mL de meio de crescimento EBM₂ e deixar a garrafa cerca de 5 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂, checando diariamente a formação de monocamada confluyente, em microscópio invertido para cultura de células. Após 5 dias, retirar todo o sobrenadante das garrafas, se as células ainda não estiverem confluentes, trocar o meio de cultura colocando 10 mL de meio em cada garrafa. Nas células confluentes, adicionar 7 mL de tripsina por garrafa, e deixar em estufa por 5 minutos. Retirar todo o volume da garrafa, adicionar 1 mL de meio de cultura e centrifugar a 1200 rotações por minuto (RPM), durante 5 minutos. Desprezar o

sobrenadante, ressuspensando o sedimento com 1 mL de meio de cultura, contar em câmara de Neubauer (VWR Scientifics) com azul de Trypan as células viáveis (não coradas em azul). Em placas de 12 poços colocar $4,5 \times 10^4$ células por poço e adicionar 2 mL de meio de cultura, EBM₂. Após 6 a 8 dias, quando o poço estiver confluyente, retirar o meio de crescimento mantendo as culturas em meio de tratamento por 24 horas, antes do início dos testes. Este meio de tratamento foi padronizado como sendo o meio 199 sem fenol red, pH 7,4, HEPES (25 mmol/L), L-glutamina (2 mmol/L), 1% antibiótico/antimicótico e 2% de soro bovino fetal depletado de estrógeno por carvão ativado, utilizado para a manutenção das células durante a realização dos testes.

3.1.4. Identificação das HUVECs

Células endoteliais exibem características celulares específicas que definem o tipo celular. Células endoteliais primárias exibem uma alta produção de moléculas de adesão célula endotelial-plaquetas (PECAM-1, CD31). Assim, as células foram identificadas como HUVECs pela sua morfologia característica em formato de paralelepípedo (cobblestone) e pela presença de CD31.

Células em P0 e P1 (1.10^6 por tubo), sem nenhum tratamento prévio foram incubadas com o anticorpo PE mouse anti-human CD31, durante 20', para análise por citometria de fluxo. O teste foi realizado em duplicata e repetido 6 vezes.

3.2.-Cultivo de ECV 304

Células de linhagem ECV 304 foram cultivadas em meio 199 (Sigma) com fenol red (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD), contendo HEPES (25 mmol/L), heparina (50U/mL), L-glutamina (2mmol/L), antibióticos e 10% de soro bovino fetal depletado de estrógeno. O soro bovino fetal é depletado de estrógeno por carvão ativado. As células foram depositadas em frascos de cultura de 75cm² sem “pre-coated” de gelatina. As células cultivadas pela técnica descrita acima, formam monocamadas confluentes de células poligonais. Após 4 dias de cultivo em média, em estufa a 37°C

com 5% de CO₂, as células atingem a confluência. Após esse período as células foram tripsinizadas e colocadas em placas de 12 poços para a realização dos testes.

3.3- Metodologias empregadas

I) A quantificação das moléculas de adesão solúveis no sobrenadante das culturas de células foi determinada pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando os kits DuoSet ELISA Development System: Human sE-selectin/CD62E (R&D Systems), Human ICAM-1/CD54 (R&D Systems) e Human VCAM-1/CD106 (R&D Systems).

II) A expressão das moléculas de adesão na superfície celular foi determinada pela técnica de EIA (*Enzyme Immuno Assay*) (De CATARINA et al., 1995; JONSSON; PALMBLAD, 2001), também chamado Elisa modificado, devido sua alta sensibilidade e à possibilidade de detectar as moléculas de adesão diretamente na superfície celular, sem necessidade de lise das células, utilizando para isso os anticorpos biotinilados: VCAM-1 CD106 (R&D Systems), ICAM-1 CD54 (R&D Systems) e E-selectina CD62E (R&D Systems).

III) A expressão de CD31 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo PE mouse anti-human CD31 (BD, Pharmingen).

3.4. Padronização do estímulo por LPS, nas células endoteliais, ECV304 e HUVEC

3.4.1 Padronização do estímulo por LPS nas células ECV304 e HUVEC para a produção de sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina no sobrenadante das culturas por ELISA

Células confluentes nos frascos de cultura, (inicialmente ECV304 e posteriormente também HUVECs) foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 12 poços, e após atingirem a confluência foram colocadas durante 24 horas em meio de tratamento. Após esse período os testes foram iniciados, colocando 0 uL (controle), 10 uL, 20 uL, 40 uL, 100 uL e 200 uL respectivamente de uma solução de LPS a 10 ug/mL,

diluído em DMSO (1:1000 em meio de tratamento), e completando-se o volume do poço para 2 mL, resultando nas concentrações de 50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng/mL de LPS.

Para cada uma dessas concentrações foram feitas duplicatas nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas. Após o tempo de exposição de cada poço, o sobrenadante foi retirado, centrifugado e congelado a -20°C para dosagem de sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina por ELISA, utilizando as amostras sem diluição.

3.4.2. Padronização do estímulo por LPS nas células ECV304 e HUVEC para a produção de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na superfície celular por EIA

Células confluentes nos frascos de cultura, foram tripsinizadas e colocadas em placas de 96 poços, sendo placas separadas para cada molécula de adesão. Atingida a confluência, as células (inicialmente ECV304 e posteriormente também HUVECs) permaneceram durante 24 horas em meio de tratamento. Após esse período os testes foram iniciados, colocando 0 uL (controle), 1,5 uL, 3 uL, 6 uL, 15 uL e 30 uL respectivamente de uma solução de LPS a 10 ug/mL, diluído em DMSO (1:1000 em meio de tratamento), e completando-se o volume do poço para 300uL de meio de cultura, resultando nas concentrações de 50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng/mL de LPS. Para cada uma dessas concentrações foram feitos quatro poços nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas.

Após o tempo de exposição de cada poço, os sobrenadantes foram retirados, os poços foram lavados 3 vezes com PBS, as células fixadas com paraformaldeído 2%, durante 30 minutos e bloqueadas com Molico 5%, durante 1 hora. Após o bloqueio foram adicionados os anticorpos anti-VCAM-1, anti-ICAM-1 e anti-E-selectina conjugados com biotina durante 2 horas e estreptavidina-peroxidase por 20 minutos, quando então a reação foi revelada e a leitura realizada a 450 e 540nm (De CATARINA et al., 1995; JONSSON; PALMBLAD, 2001).

3.5. Avaliação da ação dos fitoestrógenos nas células ECV304 e HUVEC

Constatada a efetividade e utilidade das células ECV304 como modelo inflamatório de cultura, estas foram utilizadas nas etapas seguintes deste estudo, e passamos a trabalhar com os dois tipos celulares.

Foi realizada então, a avaliação da ação de cada fitoestrógeno e da mistura entre eles (Mix1), verificando a existência de interação quando utilizados em conjunto. Para isso, avaliamos a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina por Elisa e por EIA.

3.5.1. Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 por ELISA

As células (ECV e HUVEC) foram colocadas em placas de 12 poços, onde permaneceram até atingirem a confluência. Após 24 horas em meio de tratamento, foram realizados os testes em dois poços para cada fitoestrógeno, adicionando-se 4uL/mL (8uL) de genisteína, 2uL/mL (4uL) de biocanina, 10uL/mL (20uL) de daidzeína e 2 uL/mL (4uL) de formononetina de soluções com concentração de 10ug/mL, resultando em concentrações finais de 40ng/mL, 20ng/mL, 100ng/mL e 20ng/mL respectivamente, em um volume total de 2 mL de meio de tratamento. As células foram expostas aos fitoestrógenos durante 24 e 48 horas.

Essas concentrações são as encontradas no plasma de mulheres menopausadas, recebendo extrato padronizado de "*red clover*" (Menoflavon), contendo em sua formulação, 0,6mg de genisteína, 9,6mg de de biocanina A, 2,3mg de daidzeína e 27,5mg formononetina (SIMONCINI et al, 2005a).

Além disso, testamos outros dois poços contendo os quatro fitoestrógenos misturados (mistura que recebeu o nome de Mix1) em suas concentrações plasmáticas, ou seja, 8uL de genisteína adicionados a 4 uL de biocanina, 20uL de daidzeína e 4uL de formononetina, totalizando 36uL, em um volume total de 2mL de meio de tratamento, durante 24 e 48 horas, para verificar a existência de interação entre os fitoestrógenos quando usados em conjunto.

Após esse período foi adicionado LPS, como padronizado anteriormente, nas concentrações para ECV304 de 500ng/mL (100uL em cada poço), durante 12 horas

para VCAM-1; 1ug/mL (200uL em cada poço) durante 18 horas para ICAM-1; e 200ng/mL (40uL em cada poço), durante 24 horas para E-selectina e na concentração de 1ug/mL de LPS durante 12 horas para HUVEC.

Após o tempo de exposição de cada poço, o sobrenadante foi retirado, centrifugado e congelado a -20°C para as dosagens de sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina por ELISA, utilizando as amostras sem diluição.

Para controle das reações e avaliação dos resultados, foram colocados dois controles, sendo um controle sem tratamento algum, contendo somente as células em 2mL de meio de tratamento e outro controle com as células tratadas somente com LPS nas concentrações e tempos de exposição ideais para cada molécula de adesão.

3.5.2. Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 por EIA

As células foram colocadas em placas de 96 poços individuais para VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, onde permaneceram até atingirem a confluência. Após 24 horas em meio de tratamento, foram tratados quatro poços para cada condição. Adicionou-se 1,2uL de genisteína e 3uL de daidzeína de soluções a 10ug/mL; 60uL de biocanina e 60uL de formononetina de soluções a 100ng/mL, resultando em concentrações finais de 40ng/mL, 20ng/mL, 100ng/mL e 20ng/mL respectivamente, em um volume total de 300uL de meio de tratamento. As células foram expostas aos fitoestrógenos durante 24 e 48 horas.

Além disso, testamos outros quatro poços contendo os quatro fitoestrógenos misturados (mistura que recebeu o nome de Mix1) em suas concentrações plasmáticas, ou seja, 4uL/mL de genisteína adicionados a 2 uL/mL de biocanina, 10uL/mL de daidzeína e 2uL/mL de formononetina, totalizando 18uL/mL, ou seja, 5,4uL em cada poço para um volume total de 300uL de meio de tratamento, durante 24 e 48 horas, para verificar a existência de interação entre os fitoestrógenos quando usados em conjunto.

Após esse período foi adicionado LPS, como padronizado anteriormente, para ECV304 e HUVEC, e após o tempo de exposição ao LPS os poços foram dosados por EIA como descrito anteriormente. Para controle das reações e avaliação dos resultados

foram colocados dois controles, sendo um deles sem tratamento algum e outro controle com as células expostas somente ao LPS.

3.6. Avaliação da ação do Menoflavon e do Mix2 em ECV304 e HUVEC

3.6.1 Avaliação do Menoflavon e Mix2 por Elisa

Células confluentes em placas de 12 poços, após 24 horas em meio de tratamento foram testadas. Sendo dois poços para os fitoestrógenos extraídos da planta “red clover”, que compõem o medicamento Menoflavon e dois poços para a mistura de fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max* (Mix2) nas concentrações encontradas no extrato de “red clover”, comparando-os, na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina nas células endoteliais, ECV304 e HUVEC por ELISA.

O teste foi realizado adicionando-se 5,4ug/mL (27uL/mL – 54uL), contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, de uma solução de Menoflavon solubilizado em DMSO diluído em meio de tratamento, com concentração de 200ug/mL em um volume total de 2mL de meio de tratamento, durante 24 e 48 horas.

Para comparação entre os fitoestrógenos desse extrato de “red clover” com os fitoestrógenos presentes na soja *Glycine max*, realizamos uma segunda mistura, chamada de Mix2, contendo as mesmas concentrações encontradas no Menoflavon, ou seja, 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, utilizando 540uL/mL dessa mistura (1080uL em cada poço), para um volume total de 2mL de meio de tratamento, à qual as células ficaram expostas durante 24 e 48 horas, quando então foi adicionado o LPS, nas condições adequadas para cada tipo celular.

Após o tempo de exposição de cada poço, o sobrenadante foi armazenado com descrito para as dosagens por ELISA. Para controle das reações e avaliação dos resultados foram colocados dois controles, sendo um sem tratamento algum e outro com as células tratadas somente com LPS nas concentrações e tempos de exposição padronizados anteriormente.

3.6.2. Avaliação do Menoflavon e Mix2 por EIA

Células confluentes em placas de 96 poços, individuais para cada molécula de adesão, após 24 horas em meio de tratamento foram testadas. Quatro poços com o medicamento Menoflavon, composto por extrato de “*red clover*”, adicionando-se 5,4ug/mL de meio de tratamento (8,1uL em cada poço), contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, de uma solução de Menoflavon solubilizado em DMSO diluído em meio de tratamento, com concentração de 200ug/mL em um volume total de 300uL de meio de tratamento, durante 24 e 48 horas.

Para comparação entre os fitoestrógenos desse extrato de “*red clover*” com os fitoestrógenos presentes na soja *Glycine max*, realizamos uma segunda mistura, chamada de Mix2, com as mesmas concentrações encontradas no Menoflavon, ou seja, 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, utilizando 540uL/mL dessa mistura (162uL em cada poço), para um volume total de 300uL de meio de tratamento, durante 24 e 48 horas, quando então foi adicionado LPS nas condições padronizadas.

Após o tempo de exposição ao LPS, os poços foram dosados por EIA. Para controle das reações e avaliação dos resultados foram colocados dois controles, sendo um sem tratamento algum, e outro controle com as células tratadas somente com LPS.

3.7. Verificação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos, em ECV304 e HUVEC

3.7.1. Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica por ELISA

Além do tratamento descrito anteriormente, que consistiu na adição dos quatro fitoestrógenos, Mix1, Menoflavon e Mix2 durante 24 e 48 horas antes da adição do LPS, como descrito na literatura (SIMONCINI; GENAZZANI, 2000), que demonstraria uma ação preventiva dos fitoestrógenos, anulando ou reduzindo os efeitos causados pelo LPS, também foi realizado outro tratamento, nas mesmas condições anteriores,

alterando, entretanto, a sequência de adição de fitoestrógenos e LPS, para avaliar uma possível ação terapêutica, que reverta os efeitos do LPS já em ação, ou seja, se os tratamentos são capazes de reduzir a expressão das moléculas de adesão em células já estimuladas. Este tratamento consistiu na adição de LPS (nos tempos e concentrações ideais para cada molécula de adesão) anteriormente à exposição de 24 e 48 horas das células aos fitoestrógenos, utilizando os controles sem tratamento e somente com LPS para validação da reação e avaliação dos resultados. Após o tempo de exposição de cada poço, o sobrenadante foi retirado e armazenado para as dosagens por ELISA.

3.7.2. Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica por EIA

O tratamento foi realizado como descrito para Elisa, em placas de 96 poços, com os volumes, quantidade de poços e concentrações descritos anteriormente, e dosados por EIA.

3.8. Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais HUVEC e ECV304, tratadas com 17 β estradiol

Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos, misturas e Menoflavon às células endoteliais ECV304 e HUVEC, tratadas com 17 β estradiol em concentração próxima à encontrada na menopausa (10 pg/mL) e em concentração média encontrada nas mulheres em idade fértil (100 pg/mL), para sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selecitna por Elisa, VCAM-1 e ICAM-1 por EIA.

3.8.1. Avaliação da existência de interações entre fitoestrógenos e 17 β estradiol por ELISA

Células confluentes em placas de 12 poços, após 24 horas em meio de tratamento foram testadas. Dois poços de cada condição para os fitoestrógenos, misturas e Menoflavon, nas concentrações mencionadas anteriormente adicionados a

17 β estradiol na concentração de 10pg/mL (10uL/mL de meio de tratamento de uma solução a 1ng/mL - 20uL em cada poço) e na concentração de 100pg/mL (1uL/mL de meio de tratamento de uma solução a 100ng/mL – 2 uL em cada poço) em um volume total de 2 mL de meio de tratamento, durante 24 horas e 48 horas de exposição. Após esse período foi adicionado o LPS, como padronizado anteriormente para ECV304 e para HUVEC. Após o tempo de exposição de cada poço, o sobrenadante foi retirado e as dosagens por ELISA foram realizadas. Como controles, além dos poços sem tratamento e daqueles contendo somente LPS, utilizamos poços tratados com 17 β estradiol nas concentrações de 10pg e de 100pg durante 24 e 48 horas e então expostos ao LPS nas condições estabelecidas. Os resultados dos poços contendo fitoestrógenos e 17 β estradiol foram comparados com os resultados dos poços controle, contendo somente 17 β estradiol. Assim, é possível observar a existência de interações entre fitoestrógenos e 17 β estradiol, pois havendo interação a redução na expressão das moléculas de adesão nos poços contendo fitoestrógenos e 17 β estradiol deve ser maior do que aquela causada pelo 17 β estradiol utilizado isoladamente.

3.8.2. Avaliação da existência de interações entre fitoestrógenos e 17 β estradiol por EIA

Células confluentes em placas de 96 poços, individuais para cada molécula de adesão, após 24 horas em meio de tratamento foram testadas. Quatro poços para cada condição foram testados. Fitoestrógenos individualmente, misturas e Menoflavan, nas concentrações mencionadas anteriormente adicionados a 17 β estradiol na concentração de 10pg/mL (10uL/mL de meio de tratamento de uma solução a 1ng/mL - 3uL em cada poço) e na concentração de 100pg/mL (100uL/mL de meio de tratamento de uma solução a 1ng/mL – 30uL em cada poço) em um volume total de 300uL de meio de tratamento, durante 24 e 48 horas. Após esse período foi adicionado o LPS, como padronizado anteriormente para ECV304 e para HUVEC. Como controles, além dos poços sem tratamento e daqueles contendo somente LPS, utilizamos poços tratados com 17 β estradiol nas concentrações de 10pg e de 100pg durante 24 e 48 horas e então expostos ao LPS nas condições estabelecidas. Os resultados dos poços

contendo fitoestrógenos e 17 β estradiol foram comparados com os resultados dos poços controle, contendo somente 17 β estradiol. Assim, é possível observar a existência de interações entre fitoestrógenos e 17 β estradiol, pois havendo interação a redução na expressão das moléculas de adesão nos poços contendo fitoestrógenos e 17 β estradiol deve ser maior do que aquela causada pelo 17 β estradiol utilizado isoladamente.

3.9. Determinação da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais ECV304 e HUVEC, frente ao tratamento com fitoestrógenos e com antiestrógeno puro, ICI

3.9.1 Avaliação frente ao tratamento com antiestrógeno ICI por ELISA

Células confluentes (ECV304 e HUVEC) em placas de 96 poços, após 24 horas em meio de tratamento foram utilizadas. Testamos dois poços de cada condição para os fitoestrógenos, misturas e Menoflavon, nas concentrações mencionadas anteriormente adicionados ao antiestrógeno (ICI), colocando-se 60 μ L de uma solução a 10 μ g/mL para ECV304 e 50 μ L em cada poço de uma solução a 10 μ M para HUVEC, em 300 μ L de meio de tratamento, durante 24 horas para ECV304 e durante 24 e 48 horas para HUVEC. Após esse período adicionou-se LPS nas condições estabelecidas anteriormente.

Os controles foram: poços sem tratamento; poços tratados somente com LPS; poços tratados com fitoestrógenos, Mix1, Menoflavon e Mix2 por 24 e 48 horas e então expostos ao LPS; poços contendo 17 β estradiol nas concentrações de 10 e 100pg estimulados por LPS e poços contendo 17 β estradiol nas duas concentrações com a adição de ICI, estimulados por LPS. Assim podemos avaliar a capacidade de inibição do ICI na concentração utilizada, através de sua ação sobre o 17 β estradiol. Comparando para isso, resultados dos poços controle contendo 17 β estradiol com os dos poços contendo 17 β estradiol e ICI, e na ocorrência de inibição os resultados das amostras com ICI devem ser significativos e maiores. O mesmo raciocínio foi utilizado para a avaliação da inibição causada pelo ICI sobre os fitoestrógenos, ou seja, quando

os resultados dos poços contendo fitoestrógenos sem ICI foram comparados com os poços contendo fitoestrógenos e ICI, os resultados destes últimos devem ser significativos e maiores, em caso de inibição pelo ICI. Após realização dos testes os sobrenadantes foram utilizados para as dosagens por ELISA.

3.9.2. Avaliação frente ao tratamento com antiestrógeno ICI por EIA

As células utilizadas foram tratadas como descrito anteriormente, utilizando-se quatro poços para cada teste. Após o término dos ensaios a expressão das moléculas de adesão na superfície celular foi analisada por EIA.

3.10. Análise estatística

Comparações entre as condições de tratamento e os controles foram realizadas com teste t “*student*” para amostras não pareadas, com nível de significância $p < 0,05$. Os resultados foram exibidos como média $\pm$ desvio padrão.

Comparações entre as diversas condições de um mesmo tratamento foram realizadas por ANOVA, com nível de significância $p < 0,05$, com pós-teste de Dunnett, que compara todas as colunas com uma coluna controle.

4. RESULTADOS

Devido às dificuldades encontradas com a padronização do cultivo de HUVEC, levantamos a possibilidade de trabalhar com outro tipo celular, a linhagem laboratorial de células endoteliais humanas imortalizadas, ECV304. Para isso, foi necessário inicialmente verificar se este tipo celular tinha utilidade como alternativa à utilização de células endoteliais primárias, apresentando efetividade como modelo inflamatório de cultura para avaliação da atividade estrogênica de compostos naturais.

Para confirmar sua efetividade como modelo de cultura esse tipo celular deveria expressar as três moléculas de adesão na superfície celular e liberar as formas solúveis dessas moléculas nos sobrenadantes das culturas, quando estimuladas por LPS. Isto porque os dados encontrados na literatura não são conclusivos, principalmente quanto à produção de E-selectina, pois realizam análises somente na superfície celular por citometria de fluxo e não avaliam as formas solúveis dessas moléculas.

Assim, foi necessário determinar qual tempo de exposição e concentração de LPS apresentariam essa efetividade, utilizando para isso, a análise por Elisa do sobrenadante das culturas de células e análise da expressão das moléculas na superfície celular por EIA.

4.1. Padronização do estímulo por LPS em ECV304 e HUVECs, por ELISA e por EIA, e análise da expressão de CD31 por HUVECs

4.1.1. Padronização do estímulo por LPS em ECV304, por ELISA e por EIA

Fig.1. Dosagens da produção de VCAM-1 em células ECV304 por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura (à direita), quando expostas nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas a concentrações crescentes de LPS (50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng), apresentando um controle em cada grupo onde não houve adição de LPS (0ng) às células (colunas brancas). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão ($n=4$) e ($n=2$), respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p<0,05$, em comparação ao controle do mesmo grupo. Números acima dos asteriscos destacam o percentual de aumento na produção de VCAM-1.

Fig.2. Dosagens da produção de ICAM-1 em células ECV304 por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura (à direita), quando expostas nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas a concentrações crescentes de LPS (50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng), apresentando um controle em cada grupo onde não houve adição de LPS (0ng) às células (colunas brancas). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão ($n=4$) e ($n=2$), respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p<0,05$, em comparação ao controle do mesmo grupo. Números acima dos asteriscos destacam o percentual de aumento na produção de ICAM-1.

Fig.3. Dosagens da produção de E-selectina em células ECV304 por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura (à direita), quando expostas nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas a concentrações crescentes de LPS (50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng), apresentando um controle em cada grupo onde não houve adição de LPS (0ng) às células (colunas brancas). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle do mesmo grupo. Números acima dos asteriscos destacam o percentual de aumento na produção de E-selectina.

Tabela 1- Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de VCAM-1 por ECV304 após estímulo por LPS.

ECV	6h				12h				18h				24h			
Cc	sVCAM	VCAM	sVCAM	VCAM	sVCAM	VCAM	sVCAM	VCAM	sVCAM	VCAM	sVCAM	VCAM	sVCAM	VCAM	sVCAM	VCAM
ng/mL	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
50	-	-	-	-	-	-	0,0039	41,8	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	0,0142	26,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	0,0028	60,4	0,0234	34,5	-	-	0,0454	30,3	-	-	-	-
500	-	-	-	-	0,0060	45,2	0,0163	66,6	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	0,0249	34,9	-	-	-	-	0,0237	34,6	-	-	-	-

De acordo com os resultados obtidos, o pico da secreção de sVCAM-1 no sobrenadante (fig.1, à direita) se deu com 200ng, durante 12 horas de exposição (aumento de 60,4%, tabela 1), a partir desta concentração sua secreção, embora ainda significativa, começou a diminuir. Já na superfície celular (fig. 1, à esquerda) a expressão máxima de VCAM-1 se deu com 500ng, durante 12 horas de exposição ao LPS (aumento de 66,6%, tabela 1). Assim, as concentrações mais adequadas para estimulação da produção de VCAM-1 em ECV 304 foram as de 200ng e 500ng durante 12 horas de exposição, quando então estas células são capazes de liberar estas

moléculas para o sobrenadante e também expressá-las na superfície celular. Demonstrando também que tão logo esta molécula passa a ser expressa em níveis significativos, ocorre sua liberação para o sobrenadante. Dentre estas duas concentrações 200ng em 12 horas de exposição ainda não atingiu o pico da expressão de VCAM-1, que ocorre com 18 horas, quando então passar a decair. Já 500ng atingiu seu pico de expressão com 12 horas, a partir das quais não mais se mostrou em níveis significativos. Provavelmente por se tratar de uma concentração menor, demorou mais tempo que outra maior para atingir o pico de expressão da molécula.

Tabela 2 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de ICAM-1 por ECV304 após estímulo por LPS.

ECV	6h				12h				18h				24h			
Cc	sICAM	ICAM	sICAM	ICAM	sICAM	ICAM	sICAM	ICAM	sICAM	ICAM	sICAM	ICAM	sICAM	ICAM	sICAM	ICAM
ng/mL	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0012	25,0	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0001	29,2	-	-	0,0317	36,4	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0025	36,8	0,0461	71,9	-	-	-	-

Quanto a ICAM-1, as dosagens no sobrenadante (fig.2, à direita), demonstraram aumento de sICAM-1 dependente de concentração, sendo o maior aumento (36,8%, tabela 2), observado com 1ug durante 18 horas de exposição, assim como as dosagens na superfície celular (fig.2, à esquerda), com aumento de 71,9%, demonstrando que o pico da secreção de ICAM-1 no sobrenadante se deu com 1ug durante 18 horas de exposição, assim como seu pico de expressão na superfície celular após a estimulação com LPS.

Tabela 3 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de E-selectina por ECV304 após estímulo por LPS.

ECV	6h				12h				18h				24h			
Cc	sE-sel.	E-sel.	sE-sel.	E-sel.	sE-sel.	E-sel.	sE-sel.	E-sel.	sE-sel.	E-sel.	sE-sel.	E-sel.	sE-sel.	E-sel.	sE-sel.	E-sel.
ng/mL	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0073	43,2	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0144	50,4	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0161	32,3	0,0111	24,8	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,174	16,8	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

As dosagens de E-selectina apresentaram os maiores resultados significativos no sobrenadante (fig.3, à direita) com 200ng durante 24 horas de exposição (24,8%, tabela 3) e na superfície celular (fig.3, à esquerda) com 100ng durante 18 horas de exposição ao LPS (50,4%).

4.1.2. Expressão de CD31 em HUVEC

Após a obtenção da padronização do cultivo de HUVECs com a utilização do meio de cultura EBM₂ foi possível dar seguimento aos testes com essas células, sendo necessário inicialmente confirmar a identidade das células como HUVECs.

As células foram identificadas como HUVECs pela sua morfologia característica e pela dosagem de CD31 por citometria de fluxo. A média das dosagens foi utilizada. 78,8% das células foram marcadas por anti-CD31 no momento da extração e 77,8% das células foram marcadas por anti-CD31 na primeira passagem, quando foram utilizadas para os testes propostos. A comparação entre essas duas dosagens não apresentou resultados significativos.

4.1.3. Padronização do estímulo por LPS em HUVECs, por ELISA e por EIA

Fig4. Dosagens da produção de VCAM-1 em HUVEC por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura (à direita), quando expostas nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas a concentrações crescentes de LPS (50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng), apresentando um controle em cada grupo onde não houve adição de LPS (0ng) às células (colunas brancas). Resultados expressos em média +/- desvio-padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle do mesmo grupo. Números acima dos asteriscos destacam o percentual de aumento na produção de VCAM-1.

Fig.5. Dosagens da produção de ICAM-1 em HUVEC por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura (à direita), quando expostas nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas a concentrações crescentes de LPS (50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng), apresentando um controle em cada grupo onde não houve adição de LPS (0ng) às células (colunas brancas). Resultados expressos em média +/- desvio-padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle do mesmo grupo. Números acima dos asteriscos destacam o percentual de aumento na produção de ICAM-1.

Fig.6. Dosagens da produção de E-selectina em HUVEC por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura (à direita), quando expostas nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas a concentrações crescentes de LPS (50ng, 100ng, 200ng, 500ng e 1000ng), apresentando um controle em cada grupo onde não houve adição de LPS (0ng) às células (colunas brancas). Resultados expressos em média +/- desvio-padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle do mesmo grupo. Números acima dos asteriscos destacam o percentual de aumento na produção de E-selectina.

Tabela 4 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de VCAM-1 por HUVEC após estímulo por LPS.

HUVEC	6h				12h				18h				24h			
	Cc	sVCAM	VCAM		sVCAM	VCAM			sVCAM	VCAM			sVCAM	VCAM		
Ng/mL	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
50	0,0003	30,7	-	-	-	-	-	-	0,0002	97,5	0,0340	20,4	0,0002	23,1	0,0073	21,4
100	0,002	40,6	-	-	0,001	35,9	0,0037	18,4	0,0011	93,5	0,0228	28,0	0,0005	25,4	0,0013	26,3
200	0,0002	46,6	-	-	0,0011	34,0	-	-	0,0002	94,1	0,0029	44,3	0,0004	25,5	0,0001	32,6
500	0,0022	47,5	-	-	0,0042	15,4	-	-	0,0006	42,6	0,0011	43,6	0,0004	26,6	0,0001	39,1
1000	0,0276	39,3	0,0026	44,0	0,0012	36,4	0,0180	29,5	0,0011	42,7	0,0068	36,3	0,0111	5,7	0,0002	41,4

De acordo com nossos resultados, o aumento na produção de sVCAM-1 (fig.4, à direita), se deu em praticamente todos os tempos e concentrações, exceto 50ng durante 12 horas, atingindo, entretanto, valores máximos com 50ng (97,53% de aumento, tabela 4) durante a exposição de 18 horas e se mantendo elevado com até 24 horas, que foi o tempo máximo analisado. Já na superfície celular (fig.4, à esquerda), não se obteve valores significativos em todos os tempos e concentrações, sendo o maior aumento observado com a concentração de 200ng durante 18 horas de exposição (44,3%). A estimulação máxima tanto na superfície celular quanto no sobrenadante ocorreu com 18 horas de exposição e o pico de expressão de VCAM-1

na superfície celular (200ng), corresponde-se com o segundo maior aumento observado (94,1%) no sobrenadante.

Tabela 5 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de ICAM-1 por HUVEC após estímulo por LPS.

HUVEC	6h				12h				18h				24h			
Cc	sICAM	ICAM			sICAM	ICAM			sICAM	ICAM			sICAM	ICAM		
ng/mL	<i>P</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
50	-	-	-	-	0,0016	155,9	-	-	0,0075	62,7	-	-	0,0015	66,6	-	-
100	0,0073	26,8	-	-	0,0003	186,1	0,0243	6,0	0,0189	29,7	-	-	0,0014	71,0	-	-
200	0,0496	27,9	-	-	0,0002	175,6	-	-	0,0052	59,7	-	-	0,0010	75,5	0,0171	7,5
500	-	-	0,0369	51,0	0,0002	172,4	0,0101	8,8	0,263	24,8	0,0212	9,9	0,0015	73,8	0,0060	9,1
1000	0,0154	26,0	0,0410	47,0	0,0003	194,8	0,0041	10,8	0,0072	59,9	-	-	0,0019	56,2	-	-

Para ICAM-1, as dosagens no sobrenadante (fig.5, à direita) demonstraram que o aumento se iniciou com 6 horas de exposição e atingiu valores máximos com 12 horas na concentração de 1ug (194,8%, tabela 5), permanecendo elevado até as 24 horas finais. Já na superfície celular (fig.5, à esquerda), o maior aumento observado foi com 500ng (51%) e 1ug (47%) durante 6 horas de exposição. Como a concentração de 500ng durante 6 horas não foi significativa na dosagem realizada no sobrenadante, o resultado maior e concordante foi o obtido com 1 ug durante 6 horas.

Tabela 6 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de aumento na produção de E-selectina por HUVEC após estímulo por LPS.

HUVEC	6h				12h				18h				24h			
Cc	sE-sel.	E-sel.			sE-sel.	E-sel.			sE-sel.	E-sel.			sE-sel.	E-sel.		
ng/mL	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
50	0,0277	13,1	-	-	0,0013	117,9	0,0118	78,6	0,0241	8,2	0,0386	24,0	0,0001	515,2	-	-
100	0,0166	43,7	-	-	0,0003	394,0	0,0001	179,2	0,0011	17,3	0,0145	79,6	0,0001	666,1	-	-
200	0,0065	32,8	-	-	0,0001	424,7	0,0009	258,9	0,0011	641,2	0,0005	116,4	0,0004	587,6	-	-
500	0,0006	26,2	-	-	0,0001	225,1	0,0001	325,4	0,0017	149,8	0,0001	133,4	0,0003	515,1	-	-
1000	0,0012	28,4	-	-	0,0001	393,2	0,0001	388,2	0,0001	663,8	0,0002	222,9	0,0010	241,3	0,0130	60,3

Para E-selectina as dosagens realizadas nos sobrenadantes das culturas (fig.6, à direita), demonstraram que todas as concentrações em todos os tempos apresentaram resultados significativos, sendo o aumento iniciado com 6 horas, atingindo valores máximos com concentrações de 100ng (666,1%, tabela 6) durante 24 horas, 200ng (641,0%) e 1ug (663,78%) durante 18 horas de exposição. Já na superfície celular (fig.6, à esquerda), o aumento se iniciou com 50ng durante 12 horas, tempo no qual foram encontrados os maiores resultados significativos, nas concentrações de 200ng (258,9%), 500ng (325,4%) e 1ug (388,2%), demonstrando aumento diretamente proporcional ao aumento da concentração.

Dessa maneira, dois resultados concordantes se destacam, sendo a concentração de 1ug durante 12 horas de exposição e 1ug durante 18 horas de exposição. Na superfície celular a exposição de 12 horas foi mais significativa, enquanto a de 18 horas foi mais significativa no sobrenadante.

4.2. Avaliação da ação dos fitoestrógenos nas células ECV304 e HUVEC, por ELISA e por EIA

4.2.1 Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 em ECV304, por ELISA e por EIA

Neste estudo, utilizamos concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina. Essas concentrações são as encontradas no plasma de mulheres menopausadas, recebendo extrato padronizado de "*red clover*" (Menoflavon), contendo 0,6mg de genisteína, 9,6mg de biocanina A, 2,3mg de daidzeína e 27,5mg formononetina (SIMONCINI et al., 2005).

As células foram tratadas com os fitoestrógenos individualmente e em conjunto, o qual foi chamado de Mix1, por consistir na mistura dos quatro fitoestrógenos em suas concentrações plasmáticas. Os resultados obtidos para cada fitoestrógeno, assim como os do Mix1, foram comparados com os do controle contendo somente LPS, para avaliação de suas ações sobre a produção das moléculas de adesão. Já para verificar a existência de interações entre os diversos fitoestrógenos, potencializando sua ação,

quando usados em conjunto, os resultados dos fitoestrógeno individuais foram comparados com os do Mix1, por análise de variância.

O tratamento descrito na literatura, (SIMONCINI; GENAZZANI, 2000) consiste na exposição prévia das células aos fitoestrógenos com posterior adição de LPS. Esse tratamento, foi considerado como padrão.

Fig.7. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células ECV304 expostas previamente aos fitoestrógenos nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina e Mix1 que é a mistura dos quatro fitoestrógenos nas concentrações anteriores, durante 24 e 48 horas com posterior adição de LPS 500ng por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e controles onde houve somente a adição de LPS (500ng-12 horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos p<0,05, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Em ECV304 os resultados obtidos no sobrenadante (fig.7, à direita), demonstraram redução de sVCAM-1 pelos quatro fitoestrógenos e pelo Mix1, tanto com 24 horas quanto com 48 horas, sendo Mix1 mais efetivo somente que genisteína (p=0,0276), que apresentou a menor porcentagem de redução dessa molécula, com 24 horas e mais efetivo que genisteína e daidzeína (p<0,01) com 48 horas de tratamento.

As dosagens na superfície celular (fig.7, à esquerda), demonstraram que somente formononetina não reduziu a expressão dessa molécula, com 24 horas de exposição (tabelas 7 e 8), sendo necessário um maior tempo de exposição a esse fitoestrógeno para redução de VCAM-1 na superfície celular, por haver maior concentração da molécula. Isto foi confirmado com a redução de VCAM-1 causada por formononetina quando as células foram tratadas durante 48 horas. A redução

provocada pelos demais fitoestrógenos foi mantida durante a exposição de 48 horas, e a mistura não se mostrou mais efetiva do que os fitoestrógenos utilizados isoladamente.

Tabela 7 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 24 horas.

ECV304		VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tratamentos		sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo	24 horas	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Genisteína + LPS		0,0108	54,6	0,0497	40,8	0,0101	14,2	-	-	-	-	0,0134	72,7
Biocanina + LPS		0,0118	70,9	0,0498	39,7	0,0295	21,0	-	-	-	-	0,0059	85,1
Daidzeína + LPS		0,0108	78,2	0,0267	49,2	0,0011	20,4	-	-	-	-	0,0198	62,3
Formononetina + LPS		0,0018	86,5	-	-	0,0001	23,2	-	-	-	-	0,0058	85,1
Mix1 + LPS		0,0019	86,0	0,0403	47,5	0,0052	40,3	-	-	-	-	0,121	73,8

Tabela 8 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 48 horas.

ECV304		VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tratamentos		sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo	48h	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Genist. + PS		0,0150	31,8	0,0075	47,73	0,0269	20,7	0,0300	17,18	0,0360	33,2	0,0002	67,77
Bioc. + LPS		0,0008	59,4	0,0093	48,34	0,0128	23,3	0,0182	12,91	0,0010	41,2	0,0002	71,73
Daidz. + LPS		0,0005	34,4	0,0391	36,44	0,0473	18,1	0,0241	13,08	0,0006	56,6	0,0003	69,25
Form. + LPS		0,0003	42,3	0,0181	48,01	0,0092	23,2	0,0145	13,37	0,0016	43,1	0,0003	70,74
Mix1 + LPS		0,0001	50,2	0,0289	44,6	0,0118	23,9	0,0050	24,56	0,0011	40,8	0,0003	69,01

Fig.8. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células ECV304 expostas previamente aos fitoestrógenos nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina e Mix1 que é a mistura dos quatro fitoestrógenos nas concentrações anteriores, durante 24 e 48 horas com posterior adição de LPS 1ug por 18 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1ug-18 horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

As análises das dosagens do sobrenadante para sICAM-1(fig.8, à direita), demonstraram redução dessa molécula causada pelos quatro fitoestrógenos e por Mix1, tanto com 24 horas quanto com 48 horas. Mix1 apresentou maior redução dessa molécula que os fitoestrógenos individualmente, e a análise de variância apresentou resultado significativo ($p=0,0030$), quando os quatro fitoestrógenos foram comparados com Mix1 ($p < 0,01$), no tempo de 24 horas, mas não no de 48 horas.

Para as dosagens realizadas na superfície celular (fig.8, à esquerda), nenhum dos fitoestrógenos durante o tratamento com 24 horas de exposição foi capaz de reduzir a expressão de ICAM-1, e Mix1 também não provocou redução dessa molécula e não apresentou resultados significativos quando comparado com os demais fitoestrógenos. A redução de ICAM-1 na superfície celular somente ocorreu com a exposição de 48 horas (tabelas 7 e 8), demonstrando que realmente é necessário um maior tempo de exposição para que ocorra redução dessa molécula de adesão na superfície celular, uma vez que ICAM-1 é expresso em níveis basais nas células. Todos os fitoestrógenos e também Mix 1 provocaram redução de ICAM-1 com 48 horas na superfície celular. Entretanto, Mix1 não provocou maior redução que os fitoestrógenos isoladamente.

Fig.9. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de E-selectina em células ECV304 expostas previamente aos fitoestrógenos nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina e Mix1 que é a mistura dos quatro fitoestrógenos nas concentrações anteriores, durante 24 e 48 horas com posterior adição de LPS 200ng/mL-24 horas para ELISA e 100ng por 18 horas para EIA. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Para E-selectina, as dosagens no sobrenadante (fig.9, à direita) não apresentaram resultados significativos para nenhum dos fitoestrógenos e nem para Mix1, assim como a comparação entre eles também não demonstrou interação, durante a exposição de 24 horas. A redução de sE-selectina somente ocorreu com 48 horas de exposição e os quatro fitoestrógenos, assim como Mix1 foram capazes de provocá-la. Além disso, Mix1 não apresentou maior efetividade que os fitoestrógenos utilizados isoladamente (tabelas 7 e 8).

Já na superfície celular (fig.9, à esquerda) a redução dessa molécula foi provocada pelos quatro fitoestrógenos e por Mix1 durante 24 e 48 horas de exposição. A comparação entre os fitoestrógenos isolados e Mix1 também não apresentou resultados significativos nem para 24 horas nem para 48 horas.

4.2.2. Avaliação dos fitoestrógenos e Mix1 em HUVEC, por ELISA e por EIA

Fig.10. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de VCAM-1 em HUVEC expostas previamente aos fitoestrógenos nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina e Mix1 que é a mistura dos quatro fitoestrógenos nas concentrações anteriores, durante 24 e 48 horas com posterior adição de LPS 1ug por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1ug-12 horas). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Fig.11. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de ICAM-1 em HUVEC expostas previamente aos fitoestrógenos nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina e Mix1 que é a mistura dos quatro fitoestrógenos nas concentrações anteriores, durante 24 e 48 horas com posterior adição de LPS 1ug por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1ug-12 horas). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Fig.12. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de E-selectina em HUVEC expostas previamente aos fitoestrógenos nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina e Mix1 que é a mistura dos quatro fitoestrógenos nas concentrações anteriores, durante 24 e 48 horas com posterior adição de LPS 1ug por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1ug-12 horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Tabela 9 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 24 horas.

HUVEC Tratamentos	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo 24h	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
Gen.+ LPS	0,0235	55,7	0,0138	25,4	0,0008	50,5	0,0001	29,3	0,0004	43,4	0,0268	21,5
Bioc. + LPS	0,0064	50,0	0,0106	24,5	0,0005	46,3	0,0040	34,9	0,0009	43,8	0,0334	19,9
Daid. + LPS	0,0006	57,5	0,0034	31,9	0,0010	47,1	0,0044	38,3	0,0367	38,7	0,0149	23,4
Form.+ LPS	0,0019	58,2	0,0030	31,4	0,0004	51,8	0,0001	28,7	0,0065	31,9	0,0353	18,3
Mix1 + LPS	0,0096	63,8	0,0048	31,7	0,0004	51,3	0,0001	33,0	0,0447	54,2	0,0237	21,6

Tabela 10 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo por fitoestrógenos, com duração de 48 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tratamentos	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo 48h	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen. + PS	0,0110	58,9	0,0004	53,1	0,0001	43,9	0,0001	50,5	0,0095	57,4	0,0001	44,6
Bioc. + LPS	0,0008	61,2	0,0004	54,6	0,0002	39,4	0,0001	48,1	0,0493	33,0	0,0001	45,6
Daid. + LPS	0,0010	62,8	0,0010	46,3	0,0005	49,2	0,0001	50,2	0,0176	53,2	0,0001	36,1
Form.+ LPS	0,0014	59,9	0,0009	50,6	0,0002	44,9	0,0001	49,3	0,0001	56,3	0,0001	41,9
Mix1 + LPS	0,0020	53,3	0,0008	47,3	0,0001	53,4	0,0001	48,1	0,0101	56,1	0,0002	38,1

As análises das dosagens realizadas em HUVECs, demonstraram que, os quatro fitoestrógenos e também Mix1 foram capazes de reduzir as três moléculas de adesão tanto no sobrenadante (figuras 10, 11 e 12, à direita) como na superfície celular (figuras 10, 11 e 12, à esquerda) ainda com 24 horas de exposição, e mantendo essa capacidade durante 48 horas.

Foram observados menores valores das moléculas de adesão com 48 horas de exposição, para VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, na superfície celular e para sVCAM-1 e sE-selectina no sobrenadante, sugerindo que quanto maior o tempo de tratamento, maior a redução causada na produção das moléculas (tabelas 9 e 10). Entretanto, assim como ocorreu com ECV304, sICAM-1 apresentou maiores resultados no sobrenadante, com 48 horas de exposição, o que pode ser devido ao fato de ICAM-1 ser expresso constitutivamente.

A mistura entre os fitoestrógenos (Mix1) não apresentou maior eficiência na redução das moléculas de adesão na superfície celular, entretanto, assim como ocorreu com ECV304, apresentou resultados significativos para sICAM-1 ($p < 0,01$) quando comparado com biocanina durante 24 horas de exposição e com genisteína, biocanina e formononetina com 48 horas de exposição. Mix1 apresentou resultado significativo ($p < 0,05$) para sE-selectina quando comparado com biocanina na exposição de 48 horas, o que significa que Mix1 é capaz de reduzir sE-selectina mais eficientemente que biocanina.

4.3. Avaliação da ação do Menoflavon e do Mix2 em ECV304 e HUVEC, por ELISA e por EIA

4.3.1 Avaliação do Menoflavon e Mix2 em ECV304

Fig13. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células ECV304 expostas previamente ao Menoflavon 5,4ug/mL, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e ao Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina durante 24 e 48 horas e então expostas ao LPS 500ng por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (500ng-12 horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

De acordo com os resultados obtidos, em ECV304, para VCAM-1 o tratamento padrão (exposição prévia ao estímulo por LPS) apresentou resultados significativos (tabelas 11 e 12) com o Menoflavon e com o Mix2, tanto no sobrenadante (fig 13, à direita) quanto na superfície celular (fig 13, à esquerda), com 24 e com 48 horas de exposição, não havendo diferenças significativas entre eles, quando comparados.

Tabela 11 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 24 horas.

ECV	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tratamentos	<i>P</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Tempo 24h												
Menoflavon + LPS	0,0020	85,8	0,0214	54,3	0,0166	23,5	-	-	0,0128	15,5	0,0327	56,4
Mix 2 + LPS	0,0018	85,8	0,0228	55,6	0,0016	43,1	-	-	0,0325	29,3	0,0045	89,9

Tabela 12 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 48 horas.

ECV	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tratamentos	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo 48h	<i>P</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Men. + LPS	0,0004	37,6	0,0019	62,3	0,0042	43,0	0,0001	57,9	0,0059	38,5	0,0001	78,7
Mix 2 + LPS	0,0028	43,9	0,0366	42,5	0,0052	37,9	0,0040	21,4	0,0322	54,9	0,0003	68,0

Fig.14. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células ECV304 expostas previamente ao Menoflavon 5,4ug/mL, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e ao Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina durante 24 e 48 horas e então expostas ao LPS 1ug por 18 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1ug por 18 horas). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=4$) e ($n=2$) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Para ICAM-1 o tratamento padrão apresentou redução significativa (tabelas 11 e 12) dessa molécula no sobrenadante (fig.14, à direita), tanto por Menoflavon quanto por Mix2, nos tempos de 24 e de 48 horas, mas a comparação entre eles apresentou resultado significativo ($p=0,0308$) e menor para Mix2, no tempo de 24 horas.

As dosagens na superfície celular (fig.14, à esquerda) não demonstraram redução significativa de ICAM-1 nem por Menoflavon nem por Mix2, durante 24 horas de exposição, o que só ocorreu com exposição de 48 horas, sendo a comparação entre eles significativa ($p=0,0001$), com resultados menores para Menoflavon.

Fig15. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de E-selectina em células ECV304 expostas previamente ao Menoflavin 5,4ug/mL, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e ao Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina durante 24 e 48 horas e então expostas ao LPS 200ng/mL por 24 horas para ELISA e 100ng/mL por 18 horas para EIA. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS nas condições padronizadas. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Já as dosagens de sE-selectina (fig.15, à direita) apresentaram redução significativa (tabelas 11 e 12) dessa molécula por Menoflavin e pelo Mix2, durante 24 e 48 horas de exposição, não havendo diferenças significativas na comparação entre eles. A análise de E-selectina na superfície celular (fig.15, à esquerda) apresentou também redução para o Menoflavin e para Mix2, durante 24 e 48 horas de exposição, com diferenças significativas quando comparados, sendo que Mix2 apresentou os menores resultados no tratamento de 24 horas ($p=0,001$) e Menoflavin os apresentou no tratamento de 48 horas ($p=0,0371$).

4.3.2.Avaliação do Menoflavin e Mix2 em HUVEC

Fig16. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células HUVEC expostas previamente ao Menoflavin 5,4ug/mL, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e ao Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina durante 24 e 48 horas e então expostas ao LPS 200ng/mL por 24 horas para ELISA e 100ng/mL por 18 horas para EIA. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS nas condições padronizadas. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

5,4ug/mL, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e ao Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina durante 24 e 48 horas e então expostas ao LPS 1ug por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1ug-12 horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Em HUVECs, a análise dos resultados apresentou redução de VCAM na superfície celular (fig.16, à esquerda) e no sobrenadante (fig. 16, à direita) para Menoflavon e para Mix2, durante 24 e 48 horas de tratamento (tabelas 13 e 14). Sendo a comparação entre eles significativa na superfície celular, tanto com 24 horas ($p=0,0001$) quanto com 48 horas ($p=0,0012$), apresentando Menoflavon os menores resultados, assim como no sobrenadante com 24 horas ($p=0,0080$) e com 48 horas ($p=0,0090$), também com menores resultados para o Menoflavon.

Tabela 13 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 24 horas.

HUVEC Tratamentos	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo 24h	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Men. + LPS	0,0008	84,5	0,0001	95,1	0,0009	56,3	0,0001	58,1	0,0031	48,8	0,0001	74,6
Mix 2 + LPS	0,0004	61,9	0,0012	39,0	0,0007	40,3	0,0053	28,5	0,0438	33,6	0,0017	37,8

Tabela 14 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC após tratamento preventivo com Menoflavon e Mix2, durante 48 horas.

HUVEC Tratamentos	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo 48h	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Men. + LPS	0,0002	78,6	0,0001	77,1	0,0001	53,4	0,0001	56,2	0,0276	17,9	0,0001	71,1
Mix 2 + LPS	0,0006	65,4	0,0006	54,7	0,0002	37,5	0,0001	51,3	0,0423	30,5	0,0001	50,7

Fig17. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células HUVEC expostas previamente ao Menoflavon 5,4ug/mL, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e ao Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina durante 24 e 48 horas e então expostas ao LPS 1ug por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

A análise de ICAM na superfície celular (fig.17, à esquerda) e no sobrenadante (fig. 17, à direita) apresentou redução para Menoflavon e para Mix2 durante 24 e 48 horas (tabelas 13 e 14). A comparação entre eles apresentou resultados significativos com Menoflavon demonstrando menores valores na exposição de 24 horas ($p=0,0069$) na superfície celular, e com 24 horas ($p=0,0066$) e 48 horas ($p=0,0291$) no sobrenadante.

Fig18. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA em sobrenadante de cultura de células (à direita) da produção de E-selectina em células HUVEC expostas previamente ao Menoflavon 5,4ug/mL, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e ao Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina durante 24 e 48 horas e então expostas ao LPS 1ug por 12 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

A análise de E-selectina na superfície celular (fig.18, à esquerda) e no sobrenadante (fig. 18, à direita), também demonstrou redução para Menoflavon e para Mix2 com 24 e 48 horas de exposição (tabelas 13 e 14), sendo a comparação entre eles significativa na superfície celular tanto para 24 horas ($p=0,0001$) quanto para 48 horas ($p=0,0002$), com resultados menores para Menoflavon, mas não apresentando resultados significativos no sobrenadante.

4.4. Verificação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos, em ECV304 e HUVEC, por ELISA e por EIA

4.4.1 Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos em ECV304

Fig. 19. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células ECV304, expostas previamente ao LPS (500ng –12 horas) e então expostas aos fitoestrógenos, misturas e ao Menoflavon, nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina; mix dessas concentrações, Mix1, 5,4ug/mL de Menoflavon, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, durante 24 e 48 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (500ng-12 horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p<0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

De acordo com os resultados obtidos, em ECV304, a dosagem de VCAM-1 no sobrenadante (fig. 19, à direita), demonstrou que os quatro fitoestrógenos, as duas misturas e o Menoflavon reduziram sVCAM-1 (tabelas 15 e 16) quando expostos por 24 horas, após a adição do estímulo por LPS. Já com 48 horas Menoflavon e Mix2 não foram capazes de provocar essa redução.

Na superfície celular (fig.19, à esquerda) genisteína, biocanina A, daidzeína, formononetina, Mix1 e Menoflavon reduziram significativamente a expressão de VCAM-1 quando adicionadas posteriormente ao LPS, durante 24 horas e 48 horas. Mix2 não provocou redução de VCAM-1 na superfície celular, em nenhum dos tempos de exposição.

Fig.20. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células ECV304, expostas previamente ao LPS (1ug/mL -18 horas) e então expostas aos fitoestrógenos, misturas e ao Menoflavon, nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina; mix dessas concentrações, Mix1, 5,4ug/mL de Menoflavon, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, durante 24 e 48 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1ug/mL -18 horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Tabela 15 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 24 horas.

ECV	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tratamentos	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
Tempo 24h												
LPS + Gen.	0,0163	65,7	0,0328	45,5	0,0015	48,2	-	-	-	-	0,0110	74,9
LPS + Bioc.	0,0073	75,1	0,0334	46,0	0,0001	43,6	-	-	-	-	0,0054	86,8
LPS + Daid.	0,0018	86,4	0,0299	47,1	0,0001	23,1	-	-	-	-	0,0143	72,5
LPS + Form.	0,0017	86,4	0,0340	44,4	0,0001	49,2	-	-	-	-	0,0055	86,4
LPS + Mix1	0,0017	86,7	0,0375	44,9	0,0354	37,2	-	-	-	-	0,0212	65,1
LPS + Menof.	0,0018	86,0	0,0189	53,7	0,0004	49,9	-	-	0,0045	33,9	0,0345	56,0
LPS + Mix2	0,0017	86,7	-	-	0,0001	47,9	-	-	0,0140	28,6	0,0063	83,7

Tabela 16 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 48 horas.

ECV	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tratamentos	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo 48h	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
LPS + Gen.	0,0142	44,3	0,0259	44,8	0,0034	40,7	0,0029	25,8	0,0025	34,6	0,0002	69,8
LPS + Bioc.	0,0068	40,3	0,0159	41,5	0,0036	37,1	0,0066	20,2	0,0012	38,5	0,0002	68,0
LPS + Daid.	0,0001	38,6	0,0357	40,5	0,0035	42,1	0,0013	17,0	0,0081	55,8	0,0003	71,0
LPS+ Form.	0,0053	36,4	0,0355	35,1	0,0021	51,7	0,0090	25,4	0,0048	65,1	0,0003	67,5
LPS + Mix1	0,0069	39,7	0,0495	32,0	0,0025	47,3	0,0141	17,9	0,0195	48,7	0,0007	63,6
LPS+Menof.	-	-	0,0048	52,0	0,0023	49,3	0,0013	37,3	0,0281	34,6	0,0016	68,0
LPS + Mix2	-	-	-	-	0,0039	44,7	0,0099	20,1	0,0451	38,2	0,0002	68,0

Para sICAM-1 (fig.20, à direita), as dosagens apresentaram resultados significativos para os quatro fitoestrógenos, as duas misturas e o Menoflavon, durante exposição de 24 e 48 horas, mas na superfície celular (fig.20, à esquerda), não houve resultados significativos com 24 horas de exposição, o que só aconteceu com 48 horas, quando os quatro fitoestrógenos, as duas misturas e o Menoflavon, foram então capazes de reduzir essa molécula (tabelas 15 e 16).

Fig 21. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de E-selectina em células ECV304, expostas previamente ao LPS (200ng/mL-24 horas para ELISA e 100ng 18h para EIA) e então expostas aos fitoestrógenos, misturas e ao Menoflavon, nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biochanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina; mix dessas concentrações, Mix1, 5,4ug/mL de Menoflavon, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biochanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biochanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, durante 24 e 48 horas. Apresentando um controle onde não

houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Para sE-selectina (fig.21, à direita) somente Menoflavon e Mix2 apresentaram resultados significativos durante 24 horas de exposição. A ação de todos os fitoestrógenos só foi observada com 48 horas de exposição (tabelas 15 e 16). Já na superfície celular (fig.21, à esquerda), a redução causada pelos quatro fitoestrógenos pelas duas misturas e pelo Menoflavon foi observada já com 24 horas e permaneceu com 48 horas de exposição, não havendo correspondência como esperado entre a redução na superfície celular e sua conseqüente redução no sobrenadante, o que só ocorreu com 48 horas.

4.4.2 Avaliação de ação preventiva e/ou terapêutica dos fitoestrógenos em HUVEC

Fig. 22. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células HUVEC, expostas previamente ao LPS (1 μ g – 12 horas) e então expostas aos fitoestrógenos, misturas e ao Menoflavon, nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina; mix dessas concentrações, Mix1, 5,4 μ g/mL de Menoflavon, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, durante 24 e 48 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

As análises das dosagens com HUVEC, demonstraram para VCAM-1 na superfície celular (fig.22, à esquerda), redução dos quatro fitoestrógenos, das duas misturas e do Menoflavon com 24 e com 48 horas, mas no sobrenadante essa redução só foi observada com 24 horas, pois 48 horas somente genisteína, Menoflavon e Mix2

apresentaram redução dessa molécula (tabelas 17 e 18), demonstrando que assim como ocorreu em ECV304, quando os fitoestrógenos são adicionados posteriormente ao estímulo diminuem sua efetividade com o aumento do tempo de exposição.

Fig. 23. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células HUVEC, expostas previamente ao LPS (1 μ g –12 horas) e então expostas aos fitoestrógenos, misturas e ao Menoflavon, nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina; mix dessas concentrações, Mix1, 5,4 μ g/mL de Menoflavon, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, durante 24 e 48 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Tabela 17 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 24 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tratamentos	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Tempo 24h												
LPS + Gen.	0,0010	54,7	0,0004	49,5	0,0008	39,3	0,0002	32,5	0,0433	13,7	0,0155	31,6
LPS + Bioc.	0,0176	48,9	0,0005	45,2	0,0008	38,8	0,0001	32,7	0,0096	17,9	0,0034	33,3
LPS + Daid.	0,0006	54,6	0,0005	56,2	0,0029	38,0	0,0003	32,0	0,0024	22,8	0,0054	34,2
LPS + Form.	0,0008	53,0	0,0003	50,8	0,0041	39,5	0,0001	34,3	0,0485	20,0	0,0034	37,1
LPS + Mix1	0,0031	51,4	0,0005	47,4	0,0016	41,5	0,0001	26,9	0,0430	12,3	0,0049	29,1
LPS+Menof.	0,0067	45,4	0,0001	87,9	0,0009	38,2	0,0001	50,1	0,0427	9,5	0,0001	73,8
LPS + Mix2	0,0007	49,7	0,0010	41,5	0,0023	39,3	0,0001	25,1	0,0017	42,5	0,0053	31,1

Tabela 18 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente estimuladas com LPS, e tratadas com fitoestrógenos, durante 48 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tratamentos	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
Tempo 48h	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
LPS + Gen.	0,0091	29,7	0,0005	50,4	0,0008	41,9	0,0001	41,1	0,0232	31,2	0,0001	43,0
LPS + Bioc.	-	-	0,0057	31,7	0,0042	31,7	0,0001	34,6	0,0430	27,2	0,0002	30,7
LPS + Daid.	-	-	0,0063	30,8	0,0011	27,5	0,0001	32,4	-	-	0,0005	27,0
LPS + Form.	-	-	0,0075	30,2	0,0094	32,6	0,0001	28,9	-	-	-	-
LPS + Mix1	-	-	0,0062	31,1	0,0003	37,0	0,0001	31,8	0,0425	29,5	-	-
LPS+Menof.	0,0009	33,7	0,0001	84,9	0,0001	54,4	0,0001	66,3	0,0349	30,6	0,0105	16,8
LPS + Mix2	0,0460	10,6	0,0045	34	0,0004	30,8	0,0003	33,1	-	-	-	-

Para ICAM, tanto na superfície celular (fig.23, à esquerda) como no sobrenadante (fig. 23, à direita), foram observadas reduções durante os tratamentos com os quatro fitoestrógenos, as duas misturas e o Menoflavon com 24 e com 48 horas (tabelas 17 e 18). Neste caso, na superfície celular, não observamos redução da efetividade com o aumento do tempo de exposição, possivelmente porque ICAM-1 é expresso nas células em condições normais, mas no sobrenadante, com exceção de genisteína e Menoflavon, também se observou redução da efetividade com o aumento do tempo de exposição.

Fig. 24. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de E-selectina em células HUVEC, expostas previamente ao LPS (1 μ g – 12 horas) e então expostas aos fitoestrógenos, misturas e ao Menoflavon, nas concentrações de 40ng/mL para genisteína, 20ng/mL para biocanina, 100ng/mL para daidzeína e 20ng/mL para formononetina; mix dessas concentrações, Mix1, 5,4 μ g/mL de Menoflavon, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina; e

Mix2, contendo 81ng/mL de genisteína, 1296ng/mL de biocanina A, 310,5ng/mL de daidzeína e 3712,5ng/mL de formononetina, durante 24 e 48 horas. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2) respectivamente. Asteriscos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle contendo somente LPS.

Para E-selectina, na superfície celular (fig.24, à esquerda), ocorreu redução com todos os fitoestrógenos durante o tratamento de 24 horas, mas houve redução da efetividade quando o tempo de tratamento aumentou e somente genisteína, biocanina, daidzeína e Menoflavon apresentaram resultados significativos (tabelas 17 e 18). Estes resultados apresentaram correspondência com os do sobrenadante (fig.24, à direita), onde também se observou redução de todos os fitoestrógenos durante 24 horas de exposição, mas resultados significativos somente para genisteína, biocanina, Menoflavon e Mix2 durante o tratamento de 48 horas.

4.5. Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais HUVEC e ECV304, tratadas com 17 β estradiol

4.5.1. Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais ECV304, tratadas com 17 β estradiol, por ELISA e por EIA

O objetivo desse experimento foi analisar se há interação entre os fitoestrógenos e o 17 β estradiol. Para isso, foram colocados controles, contendo 17 β estradiol com LPS, para verificar se o estradiol é capaz de impedir a ação do LPS. Esses controles foram colocados nas concentrações de 10pg (concentração próxima à encontrada na menopausa) e de 100pg, concentração fisiológica de estrógeno, correspondente a 0,29nM, ou aproximadamente 90pg/mL (concentração média encontrada em mulheres em idade fértil) (SIMONCINI et al., 2005b) e comparados com os resultados dos poços que continham somente LPS, devendo apresentar menores resultados. Os resultados dos poços tratados com fitoestrógenos e 17 β estradiol foram comparados com os resultados dos controles contendo somente 17 β estradiol.

Fig 25. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 10pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (500ng-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (500ng-12 horas). Controles na concentração de 10pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Fig 26. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 100pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (500ng-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (500ng-12 horas). Controles na concentração 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Para VCAM-1, em ECV304, tanto no sobrenadante (figs. 25 e 26, à direita) quanto na superfície celular (figs. 25 e 26, à esquerda), os controles de 17β estradiol com concentrações de 10pg e 100pg apresentaram redução dessa molécula, mesmo em baixa concentração de 17β estradiol, com 24 e 48 horas.

Dos fitoestrógenos, genisteína apresentou resultados significativos (tabelas 19, 20, 21 e 22) apresentando valores menores que aqueles observados para o controle de 17 β estradiol, na concentração de 10pg e 100pg, na superfície celular, e somente com 24 horas de exposição, demonstrando a ocorrência de interação entre genisteína e 17 β estradiol, mesmo em baixa concentração, para a redução de VCAM-1. No sobrenadante, Menoflavon e Mix2 adicionados a 10pg de 17 β estradiol apresentaram resultados significativos e menores que o observado no controle de 17 β estradiol com 48 horas de exposição.

Tabela 19 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 10pg de 17 β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.

ECV304 Tempo 24h	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.10pg +	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	0,0053	30,3	0,0179	22,4	0,0365	25,0	-	-	-	-
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	0,0116	9,8	-	-	-	-
Daid. + LPS	-	-	-	-	-	-	0,0014	6,9	0,0036	8,1	0,0039	48,6
Form.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix1 + LPS	-	-	-	-	-	-	0,0215	5,6	-	-	-	-
Men.+ LPS	-	-	-	-	-	-	<0,0001	17,6	-	-	-	-
Mix2. + LPS	-	-	-	-	-	-	0,0204	6,2	-	-	0,0048	20,9
Cont.17 β +LPS	0,0018	86,5	0,0374	44,1	0,0003	58,1	-	-	0,0034	30,6	0,0230	62,0

Tabela 20 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 10pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.

ECV304	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 48h	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.10pg +	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	0,0067	9,4	-	-	-	-	0,0001	28,9
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0103	33,7
Daid. + LPS	-	-	-	-	0,0002	27,1	-	-	-	-	0,0018	25,6
Form.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0001	54,9
Mix1 + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0005	50,4
Men.+ LPS	0,0438	35,3	-	-	-	-	0,0008	32,3	-	-	0,0010	54,1
Mix2. + LPS	0,0392	35,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0094	43,9
Cont. 17 β +LPS	0,0212	31,1	0,0161	42,2	0,0016	56,9	0,0017	26,7	0,0051	63,5	0,0036	38,9

Tabela 21 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.

ECV304	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 24h	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.100pg +	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	0,0405	32,4	0,0101	25,9	<0,0001	43,4	-	-	-	-
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0040	41,2
Daid. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Form.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	72,1
Mix1 + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0002	23,6
Men.+ LPS	-	-	0,0065	13,3	0,0039	11,9	-	-	-	-	0,0022	15,1
Mix2. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0363	11,0
Cont.17 β +LPS	0,0017	86,7	0,0390	32,4	-	-	<0,0001	55,0	0,0175	30,6	0,0324	56,6

Tabela 22 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.

ECV304	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 48h	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.100pg +	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0443	21,6
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daid. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Form.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix1 + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Men.+ LPS	-	-	-	-	<0,0001	39,2	-	-	-	-	-	-
Mix2. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cont.17 β +LPS	0,0488	34,4	0,0489	16,3	0,0018	55,9	0,0011	25,3	0,0051	63,5	0,0023	47,1

Fig 27. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 10pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS (1 μ g- 18h). Controles na concentração de 10pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=4$) e ($n=2$), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Fig 28. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 100pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Para ICAM-1 as dosagens no sobrenadante (figs. 27 e 28, à direita) apresentaram resultados significativos e menores para os controles de 10 e 100pg durante 24 e 48 horas e para genisteína com 10pg durante 24 e 48 horas e 100pg com 24 horas; e para daidzeína com 10pg, no tempo de 48 horas, demonstrando interação entre genisteína e 17β estradiol, com 10 e 100pg, e daidzeína e 17β estradiol com 10pg para redução de sICAM-1.

Já na superfície celular (figs. 27 e 28, à esquerda), os controles de 17β estradiol apresentaram resultados significativos (tabelas 19, 20, 21 e 22) somente com 100pg durante 48 horas de exposição. Quando comparados com os controles contendo somente 17β estradiol estimulados por LPS, genisteína, biocanina, daidzeína, Mix 1, Menoflavon e Mix2 apresentaram resultados significativos e menores, durante 24 horas de exposição com 10pg de 17β estradiol. Com 100pg de 17β estradiol somente genisteína e Menoflavon apresentaram resultados significativos, durante 24 horas de exposição e também para 48 horas de exposição com Menoflavon, comparados com o controle contendo 17β estradiol.

Fig 29. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de E-selectina em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 10pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração de 10pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Fig 30. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de E-selectina em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 100pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

As dosagens de E-selectina apresentaram resultados significativos no sobrenadante (figs.29 e 30, à direita) para os controles contendo 10pg e 100pg de 17β estradiol durante 24 e 48 horas, e para daidzeína com 10pg de 17β estradiol, durante 24 horas de exposição, demonstrando interação entre 17β estradiol 10pg com

daidzeína. Na superfície celular (figs. 29 e 30, à esquerda) o 17 β estradiol nas concentrações de 10pg e 100pg também foi capaz de reduzir a expressão dessa molécula durante 24 e 48 horas. Daidzeína e Mix2, apresentaram resultados significativos com 10pg de 17 β estradiol, durante 24 horas de exposição. Já com 17 β estradiol 100pg durante 24 horas de exposição, ocorreram resultados significativos com biocanina, formononetina, Mix1, Menoflavon e Mix2. Com 48 horas de exposição todos os fitoestrógenos apresentaram resultados significativos quando comparados com 17 β estradiol na concentração de 10pg e somente genisteína apresentou resultado significativo com 100pg de 17 β estradiol (tabelas 19, 20, 21 e 22).

4.5.2. Avaliação dos efeitos da adição de fitoestrógenos a células endoteliais, HUVECs, tratadas com 17 β estradiol, por ELISA e por EIA

Fig 31. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 10pg de 17 β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (1 μ g-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração 10pg de 17 β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos p<0,05, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17 β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17 β estradiol.

Fig 32. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 100pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (1ug-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS.. Controles na concentração 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Em HUVEC, para VCAM-1, 17β estradiol utilizado como controle, apresentou resultados significativos nas concentrações de 10pg e 100pg durante 24 e 48 horas de exposição no sobrenadante (figs.31 e 32, à direita) e durante 48 horas de exposição na superfície celular (figs.31 e 32, à esquerda). Ocorreram resultados significativos com daidzeína, formononetina, Mix1, Menoflavon e Mix2, comparados com controle contendo 10pg de 17β estradiol, durante 24 horas de exposição, e com Menoflavon e Mix 2 para 48 horas de exposição, tanto no sobrenadante como na superfície celular.

Em comparação com controle contendo 100pg de 17β estradiol ocorreram resultados significativos durante 24 horas de exposição para daidzeína, Menoflavon e Mix 2 e durante 48 horas com Menoflavon e Mix 2 na superfície celular; para daidzeína, formononetina, Mix1, Menoflavon e Mix 2 no sobrenadante (tabelas 23, 24, 25 e 26).

Fig 33. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 10pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (1ug-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração de 10pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos p<0,05, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Fig 34. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 100pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (1ug-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração de 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos p<0,05, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Para ICAM-1 os controles contendo 17β estradiol se apresentaram significativos tanto com 10pg como com 100pg durante 24 e 48 horas de exposição na superfície celular (fig. 33 e 34, à esquerda) e no sobrenadante (figs. 33 e 34, à direita). Também

ocorreram resultados significativos (tabelas 23, 24, 25 e 26) com daidzeína, formononetina, Mix1, Menoflavon e Mix2 comparados com controle contendo 10pg de 17 β estradiol, durante 24 horas de exposição na superfície celular, e daidzeína, Mix1 e Menoflavon no sobrenadante. Em comparação com o controle contendo 100pg de 17 β estradiol, ocorreram resultados significativos para daidzeína, Mix 1, Menoflavon e Mix2 na superfície celular e para daidzeína e Menoflavon no sobrenadante, durante 24 horas de exposição.

Tabela 23 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 10pg de 17 β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 24h	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.10pg +	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daid. + LPS	0,0021	35,6	0,0453	11,4	0,0259	13,6	0,0153	11,0	0,0371	25,1	0,0152	11,9
Form.+ LPS	0,0166	57,3	0,0063	15,9	-	-	0,0002	18,7	0,0381	26,6	0,0002	20,1
Mix1 + LPS	0,0241	46,3	0,0112	15,7	0,0139	25,4	0,0001	18,8	0,0218	42,4	0,0001	20,3
Men.+ LPS	0,0086	78,7	0,0001	90,9	0,0052	37,9	0,0001	58,1	0,0152	39,8	0,0001	61,2
Mix2. + LPS	0,0185	53,4	0,0005	27,9	-	-	0,0007	16,1	0,0166	44,9	0,0007	17,3
Cont. 17 β +LPS	0,0077	46,6	-	-	0,0006	56,6	0,0002	28,1	0,0163	27,8	-	-

Tabela 24 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 10pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 48h	sVCAM		VCAM		Sicam		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.10pg +	<i>p</i>	%	<i>P</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daid. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Form.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix1 + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Men.+ LPS	-	-	0,0005	49,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix2. + LPS	-	-	0,0048	8	-	-	-	-	-	-	-	-
Cont. 17 β +LPS	0,0034	60,5	0,0039	25,5	0,0007	63,6	0,0001	43,5	0,0046	64,5	-	-

Tabela 25 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 24 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 24h	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.100pg +	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daid. + LPS	0,0023	47,6	0,0149	9,8	0,0166	7,5	0,0056	13,3	-	-	0,0057	14,3
Form.+ LPS	0,0274	29,8	-	-	-	-	0,0230	11,6	-	-	-	-
Mix1 + LPS	0,0015	41,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0235	12,5
Men.+ LPS	0,0011	74,1	0,0001	91,1	0,0048	24,1	0,0001	52,8	-	-	0,0001	55,8
Mix2. + LPS	0,0018	49,6	0,0001	22,9	-	-	0,0143	15,8	0,0254	20,3	0,0143	17,0
Cont. 17 β +LPS	0,0008	48,6	-	-	0,0003	58,6	0,0008	17,4	0,0004	52,4	-	-

Tabela 26 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e porcentagem de redução na produção das moléculas de adesão por HUVEC previamente tratadas com 100pg de 17β estradiol e fitoestrógenos, durante 48 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 48h	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
17 β est.100pg +	<i>p</i>	%	<i>P</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bioc. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daid. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Form.+ LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix1 + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Men.+ LPS	-	-	0,0033	50,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix2. + LPS	-	-	0,0059	13,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Cont. 17 β +LPS	0,0062	45,8	0,0127	34,4	0,0005	58,0	0,0001	38,9	0,0079	69,1	-	-

Fig 35. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de E-selectina em células HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 10pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (1 μ g-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração de 10pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=4$) e ($n=2$), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Fig 36. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de E-selectina em células HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados a 100pg de 17β estradiol, durante 24 e 48 horas com posterior exposição ao LPS (1ug-12h). Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles na concentração de 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS. Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação entre os resultados dos poços contendo somente 17β estradiol com os dos poços contendo fitoestrógenos e 17β estradiol.

Para E-selectina os controles apresentaram resultados significativos com 17β estradiol 10pg e 100pg durante 24 e 48 horas de exposição no sobrenadante (figs. 35 e 36, à direita), não apresentando resultados significativos na superfície celular (figs. 35 e 36, à esquerda). Ocorreram resultados significativos (tabelas 23, 24, 25 e 26) com daidzeína, formononetina, Mix1, Menoflavon e Mix2 quando comparados com controle contendo 10pg de 17β estradiol, durante 24 horas de exposição, no sobrenadante e na superfície celular. Em comparação com o 17β estradiol controle na concentração de 100pg, ocorreram resultados significativos para daidzeína, Mix1, Menoflavon e Mix2 na superfície celular e para Mix2 no sobrenadante, durante 24 horas de exposição.

4.6. Determinação da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais ECV304 e HUVEC, frente ao tratamento com fitoestrógenos e com antiestrógeno puro (ICI), por ELISA e por EIA

4.6.1. Avaliação do tratamento com ICI em ECV304, por ELISA e por EIA

Esse ensaio foi realizado inicialmente em ECV304, quando testamos primeiramente uma quantidade menor de ICI (1nM), e somente com 24 horas de exposição. Para esta concentração testada, os controles contendo ICI não se

comportaram como o esperado, não inibindo a ação do 17β-estradiol, nem no sobrenadante nem na superfície celular, para nenhuma das moléculas de adesão, com 24 horas de exposição.

Fig 37. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de VCAM-1 em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados ao antiestrógeno (ICI 1nM), durante 24 horas com posterior exposição ao LPS . Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles nas concentrações de 10pg e de 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS e ainda outros controles com as mesmas concentrações contendo 17β estradiol e ICI e posteriormente LPS, e controles contendo somente fitoestrógenos, misturas e Menoflavon por 24 horas com a adição posterior de LPS (500ng-12horas). Resultados expressos em média +/- desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos p<0,05, após comparação com os resultados dos poços controle (colunas pretas).

Tabela 27 - Resultados significativos (p<0,05) e porcentagem de aumento na produção das moléculas de adesão por ECV304 previamente tratadas com antiestrógenos (ICI) e fitoestrógenos, durante 24 horas.

ECV	VCAM-1		ICAM-1		E-selectina	
	sVCAM	VCAM	sICAM	ICAM	sE-sel.	E-sel.
Tempo 24h						
ICI						
+	p	%	p	%	p	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	-	-
Bioc. + LPS	-	-	-	-	<0,0001	285,5
Daid. + LPS	-	-	-	-	-	-
Form.+ LPS	-	-	-	-	-	-
Mix1 + LPS	-	-	-	-	0,0059	189,5
Men.+ LPS	-	-	-	-	-	-
Mix2. + LPS	0,0383	221,0	-	-	<0,0001	501,9
Cont.17β10+LPS	-	-	-	-	-	-
Cont.17β100+LPS	-	-	-	-	-	-

Quanto aos fitoestrógenos, para VCAM-1 não houve resultado significativo na superfície celular (fig. 37, à esquerda) e somente Mix2 ($p=0,0383$) apresentou resultado significativo (tabela 27) na análise do sobrenadante (fig. 37, à direita).

Fig 38. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de ICAM-1 em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados ao antiestrógeno (ICI 1nM), durante 24 horas com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles nas concentrações de 10pg e de 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS e ainda outros controles com as mesmas concentrações contendo 17β estradiol e ICI e posteriormente LPS, e controles contendo somente fitoestrógenos, misturas e Menoflavon por 24 horas com a adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=4$) e ($n=2$), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p<0,05$, após comparação com os resultados dos poços controle (colunas pretas).

Para ICAM-1 não ocorreram resultados significativos (tabela 27) na superfície celular (fig. 38, à esquerda), nem no sobrenadante (fig. 38, à direita).

Fig 39. Dosagens por EIA na superfície celular (à esquerda) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (à direita) da produção de E-selectina em células ECV304, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados ao antiestrógeno (ICI 1nM), durante 24 horas com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles nas concentrações de 10pg e de 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS e ainda outros controles com as mesmas concentrações contendo 17β estradiol e ICI e posteriormente LPS, e controles

contendo somente fitoestrógenos, misturas e Menoflavon por 24 horas com a adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação com os resultados dos poços controle (colunas pretas).

Para E-selectina os resultados foram significativos (tabela 27) para biocanina, Mix1 e Mix2 adicionados ao ICI, durante 24 horas de exposição, na superfície celular (fig.39, à esquerda), mas não ocorreram resultados significativos no sobrenadante (fig. 39, à direita).

4.6.2. Avaliação do tratamento com antiestrógeno (ICI) em HUVECs, por ELISA e por EIA

Fig.40. Dosagens por EIA na superfície celular (superiores) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (inferiores) da produção de VCAM-1 em HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados ao antiestrógeno (ICI 1mM), durante 24 horas (superior e inferior à esquerda) e 48 horas (superior e inferior à direita) com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles nas concentrações de 10pg e de 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS e ainda outros controles com as mesmas concentrações contendo 17β estradiol e ICI e posteriormente LPS, e controles contendo somente fitoestrógenos, misturas e Menoflavon por 24 e 48 horas com a adição posterior de LPS. Resultados expressos em média $\pm$ desvio

padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação com os resultados dos poços controle (colunas pretas).

Em HUVEC, para VCAM-1, somente o controle contendo 10pg de 17β estradiol durante 48 horas de exposição apresentou resultado significativo no sobrenadante (fig.40, inferior direita). Ocorreu inibição pelo ICI somente de Menoflavon durante 24 horas de exposição, tanto na superfície celular quanto no sobrenadante (fig. 40, superior e inferior esquerda). Já com 48 horas de exposição, genisteína, biocanina, daidzeína, formononetina e Mix1 foram inibidas pelo ICI com resultados significativos no sobrenadante (fig. 40, inferior direita). Na superfície celular os resultados também mostraram a ocorrência de inibição com 48 horas de exposição, sendo os resultados significativos para genisteína, biocanina, daidzeína, formononetina e Mix 1 (fig. 40, superior direita).

Fig. 41. Dosagens por EIA na superfície celular (superiores) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (inferiores) da produção de ICAM-1 em células HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados ao antiestrógeno (ICI 1mM), durante 24 horas (superior e inferior à esquerda) e 48 horas (superior e inferior à direita) com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e outro onde houve somente a adição de LPS. Controles nas concentrações de 10pg e de 100pg de 17β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS e ainda outros controles com as mesmas concentrações contendo 17β estradiol e ICI e posteriormente LPS, e controles contendo somente fitoestrógenos, misturas e Menoflavon por 24 e 48 horas com a adição posterior de LPS). Resultados

Tabela 28 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e percentagem de aumento na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente tratadas com antiestrógenos e fitoestrógenos, durante 24 horas.

HUVEC	VCAM-1				ICAM-1				E-selectina			
Tempo 24h	sVCAM		VCAM		sICAM		ICAM		sE-sel.		E-sel.	
ICI +	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%
Gen.+ LPS	-	-	-	-	0,0411	114,9	-	-	0,0130	197,0	<0,0001	213,2
Bioc. + LPS	-	-	-	-	0,0039	103,9	-	-	-	-	<0,0001	212,2
Daid. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0417	184,6	<0,0001	208,6
Form.+ LPS	-	-	-	-	0,0011	124,3	-	-	-	-	0,0002	197
Mix1 + LPS	-	-	-	-	0,0011	109	-	-	0,0250	336,3	<0,0001	202,6
Men.+ LPS	0,0245	187,9	0,0001	168,6	-	-	-	-	0,0425	132,0	<0,0001	366,5
Mix2. + LPS	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0471	177,4	<0,0001	249,1

Tabela 29 - Resultados significativos ($p < 0,05$) e percentagem de aumento na produção das moléculas de adesão por HUVECs previamente tratadas com antiestrógenos e fitoestrógenos, durante 48 horas.

[illegible]

Para ICAM-1 (fig.41), os controles apresentaram resultados significativos, demonstrando inibição de 17β estradiol nas concentrações de 10pg e 100pg durante 24 horas de exposição e na concentração de 10pg durante 48 horas de exposição no sobrenadante. ICI não provocou inibição da ação de nenhum fitoestrógeno na superfície celular durante 24 horas de exposição (fig. 41, superior esquerda), o que ocorreu somente com 48 horas, havendo inibição de genisteína, biocanina, daidzeína, formononetina e Mix1 (fig. 41, superior direita). Já no sobrenadante, ocorreram resultados significativos para genisteína, biocanina, formononetina e Mix1 com 24 horas de exposição (fig. 41, inferior esquerda), entretanto, diferentemente do que ocorreu na superfície celular, com 48 horas de exposição não ocorreram resultados significativos (fig. 41, inferior direita), o que pode ser devido à expressão de ICAM-1 em condições normais, levando a uma menor liberação dessa molécula para o sobrenadante. Assim como para VCAM-1, ICI somente foi capaz de inibir a ação dos fitoestrógenos na superfície celular com 48 horas de exposição.

Fig. 42. Dosagens por EIA na superfície celular (superiores) e por ELISA nos sobrenadantes das culturas de células (inferiores) da produção de E-selectina em HUVEC, expostas previamente aos fitoestrógenos e misturas nas concentrações descritas anteriormente, adicionados ao antiestrógeno (ICI 1mM), durante 24 horas (superior e inferior à esquerda) e 48 horas (superior e inferior à direita) com posterior exposição ao LPS. Apresentando um controle onde não houve adição de LPS às células, e

outro onde houve somente a adição de LPS. Controles nas concentrações de 10pg e de 100pg de 17 β estradiol, sem fitoestrógenos, com adição posterior de LPS e ainda outros controles com as mesmas concentrações contendo 17 β estradiol e ICI e posteriormente LPS, e controles contendo somente fitoestrógenos, misturas e Menoflavon por 24 e 48 horas com a adição posterior de LPS). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4) e (n=2), respectivamente. Asteriscos nos testes ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, após comparação com os resultados dos poços controle (colunas pretas).

Para E-selectina (fig.42) os resultados foram significativos somente com as dosagens dos sobrenadante dos controles de 17 β estradiol com ICI nas concentrações de 10pg e 100pg durante 48 horas de exposição. Ocorreram resultados significativos para genisteína, biocanina, daidzeína, formononetina, Mix1, Menoflavon e Mix2 na superfície celular durante 24 e 48 horas de exposição ao ICI (fig. 42, superior esquerda e direita). No sobrenadante os resultados foram significativos para genisteína, daidzeína, Mix1, Menoflavon e Mix2 durante 24 horas e para biocanina e daidzeína durante 48 horas (fig. 42, inferior esquerda e direita).

5. DISCUSSÃO

Lipopolissacarídeo (LPS), um componente principal da parede celular de bactérias gram-negativas, é um potente ativador das células imunes e do sistema inflamatório (WOLK et al., 2003). Uma vez em circulação o LPS se une a uma proteína ligante de LPS, PLB, (*PLB, ligand protein binding*) formando um complexo que se liga com alta afinidade a um receptor de superfície celular de monócitos e macrófagos, CD14 (VERBON et al., 2001). Um sinal transmembrana é gerado e o resultado é a ativação celular de NF- κ B e a secreção de citocinas inflamatórias. CD14 solúvel pode também se ligar ao complexo LPS/PLB e ativar as células endoteliais, as quais não expressam CD14 na superfície (NOUBIR; HMANA; REINER, 2004).

ECVs 304 são células endoteliais humanas de linhagem imortalizadas, derivadas das células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), e, portanto, mantêm algumas características endoteliais tais como a expressão na superfície celular de ICAM-1 (ANTONELLI et al., 2001).

É sabido que ICAM-1 é expressa basalmente em baixos níveis no endotélio vascular, mas pode ser induzida a altos níveis quando estimulada com LPS bacteriano. Estudos realizados demonstraram que a estimulação de ECV304 com 1 μ g de LPS, durante 1, 2 e 4 horas induz a produção de RNAm para ICAM-1 (ANTONELLI et al., 2001), e dosagens por citometria de fluxo, demonstraram que 8 horas após a estimulação com LPS, ocorre aumento na expressão de ICAM-1 (MORENO, 2001).

E-selectina geralmente está ausente sob condições normais e sua transcrição é induzida por citocinas tais como interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa, e LPS (TEDDER et al., 1999). Ocorre indução da expressão de E-selectina, em ECV 304 quando estimuladas com 1 μ g de LPS, atingindo valores máximos após uma hora de incubação, quando analisadas por citometria de fluxo (MORENO, 2001).

A literatura não aponta dados a respeito das formas solúveis das moléculas de adesão produzidas por ECV304 quando estimulada por LPS.

Nossos resultados demonstraram que as células ECV304 foram capazes de expressar VCAM-1 na superfície celular e liberá-la para o sobrenadante quando

estimuladas por LPS, entretanto, existem condições específicas para que isto ocorra, sendo mais indicada a utilização de 500ng de LPS durante 12 horas de exposição.

Quanto a ICAM-1, de acordo com nossos resultados a estimulação com 1ug de LPS só provocou aumento significativo da expressão de ICAM-1 após 18 horas de sua indução, com a expressão na superfície celular e subsequente liberação dessa molécula no sobrenadante da cultura, confirmando que as células ECV304 são capazes de expressar ICAM-1 na superfície celular e também liberá-la para o sobrenadante quando estimuladas por LPS, na concentração de 1ug de LPS durante 18 horas de exposição.

Em relação a E-selectina, nossos resultados foram obtidos por metodologia diferente da encontrada na literatura, iniciamos a monitorização com 6 horas, entretanto, não obtivemos secreção de E-selectina com o tempo mínimo de exposição, o que ocorreu somente com 18 horas na superfície celular e com 24 horas no sobrenadante, o que pode significar um maior tempo entre o aumento da expressão de E-selectina e sua liberação para o sobrenadante, diferentemente de VCAM-1 e ICAM-1, que ocorrem rapidamente, o que pode estar relacionado ao fato da expressão de E-selectina na superfície celular necessitar de síntese “de novo”.

Entretanto, pudemos verificar que as células ECV304 são capazes de expressar E-selectina na superfície celular e liberá-la para o sobrenadante quando estimuladas por LPS, sob condições específicas, utilizando 100ng de LPS durante 18 horas de exposição, para estimular a expressão dessa molécula na superfície celular e 200ng de LPS, durante 24 horas de exposição para que seja liberada ao sobrenadante.

Como existem essas formas solúveis das moléculas de adesão, que penetram na corrente sanguínea após a liberação da superfície celular, funcionando como marcadores do estado de ativação endotelial, as concentrações e tempos de LPS que apresentaram resultados significativos nos sobrenadantes, devem refletir os resultados encontrados na superfície celular. Isto somente não ocorreu com a E-selectina, entretanto, isto pode ter ocorrido por uma maior demora na liberação desta molécula da superfície celular para o sobrenadante. Na tentativa de uniformizar os procedimentos, procuramos por resultados que fossem significativos e comuns para as três moléculas de adesão, tanto no sobrenadante como na superfície celular, entretanto, esses

resultados não ocorreram, apresentando cada molécula suas condições específicas de estímulo.

Portanto, verificamos que essa capacidade das células ECV304 em produzir as três moléculas de adesão e suas formas solúveis, quando estimuladas por LPS, demonstra sua efetividade como modelo inflamatório de cultura com utilidade para a avaliação da atividade estrogênica de compostos naturais.

Então, os resultados significativos e concordantes encontrados e que foram utilizados nas próximas etapas deste estudo, foram: para ICAM-1 1ug durante 18 horas, para VCAM-1 500ng durante 12 horas e para E-selectina 100ng durante 18 horas para os ensaios de superfície celular e 200ng durante 24 horas para os ensaios realizados no sobrenadante das culturas de células.

Células endoteliais exibem características celulares específicas que definem o tipo celular. Células endoteliais primárias exibem uma alta produção de moléculas de adesão célula endotelial-plaquetas (PECAM-1, CD31). Assim, nossas dosagens de CD31, demonstraram que as células podem ser caracterizadas como células endoteliais primárias, HUVECs, e que não perderam sua capacidade de expressão das moléculas de adesão no decorrer da propagação das culturas.

De acordo com a literatura, a incubação de HUVECs, com 100 ng/mL de LPS durante 18 horas é capaz de ativar a expressão de VCAM-1 e ICAM-1, e essa mesma concentração durante 6 horas de incubação ativa a expressão de E-selectina para ensaios imunoenzimáticos na superfície celular (SIMONCINI et al., 2005a).

Todavia, outros estudos relatam que a expressão máxima de VCAM-1 em HUVEC, na superfície celular, ocorre entre 6 e 12 horas após a estimulação, e se mantém elevado durante 48 horas (LAFRENIE; BUCHANAN; ORR, 1993). Nossos resultados não demonstraram máxima expressão nesse período, demonstrando estimulação máxima tanto na superfície celular quanto no sobrenadante com 18 horas de exposição, estando mais de acordo com os dados obtidos por Simoncini et al. (2005a), entretanto, se mantiveram elevados até 24 horas de exposição que foi o tempo máximo de realização do experimento.

ICAM-1 é expresso constitutivamente na célula em repouso e seu aumento em HUVEC, se dá entre 6 e 8 horas após a estimulação, permanecendo com níveis

elevados durante 48 horas (VAN DE STOLPE; VAN DER SAAG, 1996). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois obtivemos aumento dessa molécula já com 6 horas de exposição, tanto no sobrenadante quanto na superfície celular. Nessas condições a concentração que mais estimulou a produção de ICAM-1 na superfície celular foi a de 1 μ g, durante 6 horas, entretanto, nessa mesma concentração a estimulação máxima no sobrenadante só se deu com 12 horas, não ocorrendo a estimulação máxima no sobrenadante concomitantemente à da superfície celular, como ocorreu com a ECV304.

Assim, para ICAM-1 em HUVEC, dois resultados concordantes se destacam, sendo a concentração de 1 μ g durante 12 horas de exposição e 1 μ g durante 18 horas de exposição. Na superfície celular a exposição de 12 horas foi mais significativa, enquanto a de 18 horas foi mais significativa no sobrenadante, o que pode indicar um maior tempo entre a liberação dessas moléculas da superfície para o sobrenadante, assim como ocorreu em ECV304.

E-selectina está ausente na HUVEC em repouso, e *in vitro*, alcança valores máximos entre 4-6 horas após a estimulação, declinando de volta aos valores basais após 12-16 horas (RICE et al., 1991). Neste estudo, não obtivemos valores máximos da expressão de E-selectina com 6 horas de exposição e sim com 12 e 18 horas, após a qual iniciou-se a redução dos níveis dessa molécula, tanto no sobrenadante quanto na superfície, entretanto, mesmo após 12 horas de aumento, não houve retorno aos níveis basais.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, a melhor concentração de VCAM-1 se deu com 200ng durante 18 horas; para ICAM-1 1 μ g durante 6 horas e para E-selectina 1 μ g durante 12 ou 18 horas de exposição ao LPS. Entretanto, com o objetivo de uniformizar os testes, procuramos por condições que tivessem provocado aumento significativo nas três moléculas de adesão, tanto na superfície como no sobrenadante. Dessa maneira, encontramos que as concentrações de 100ng e 1 μ g durante 12 horas e a concentração de 500ng durante 18 horas, preenchem essa necessidade, sendo os maiores aumentos encontrados na concentração de 1 μ g durante 12 horas de exposição.

Por isso, a concentração e o tempo de exposição ao LPS utilizados nos demais testes realizados foram 1ug durante 12 horas, tanto para VCAM-1, como para ICAM-1 e para E-selectina.

Tem sido mostrado que os fitoestrógenos exercem efeitos favoráveis em alguns fatores relevantes para a saúde cardiovascular, como o perfil lipídico e outros parâmetros relacionados à aterosclerose. Entretanto, pouco é sabido sobre a ação cardiovascular dos fitoestrógenos mediada através de modificações diretas da fisiologia endotelial e seus mecanismos específicos de ação nessas células (HERMENEGILDO et al., 2005).

Um possível efeito antiinflamatório tem sido proposto para explicar alguns dos efeitos benéficos das isoflavonas nas células endoteliais. Estudos em macacas ovariectomizadas mostraram que os fitoestrógenos diminuíram o desenvolvimento e a progressão das lesões ateroscleróticas (APPT, 2004). A supressão da expressão de VCAM-1 pode representar um mecanismo através do qual os fitoestrógenos induzem essa ação (CLARKSON; ANTHONY; MORGAN, 2001), uma vez que na patologia da aterosclerose, as moléculas de adesão são mediadores cruciais em vários passos do recrutamento de leucócitos. (NAKASHIMA et al., 1998),

Por outro lado, a administração de fitoestrógenos a mulheres menopausadas está associada com efeitos neutros nos marcadores solúveis de inflamação vascular, como proteína C reativa e E-selectina (HALL et al., 2005).

Recentes estudos confirmaram que os fitoestrógenos exercem uma série de efeitos positivos nos marcadores de risco cardiovascular em mulheres menopausadas, incluindo a redução das formas solúveis de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina no sangue periférico dessas mulheres, reforçando a hipótese que esses compostos podem exercer ações antiinflamatórias nas células endoteliais (COLACURCI, 2005).

Concentrações de 0,01 a 100 uM dos fitoestrógenos genisteína e daidzeína, em HUVECs durante 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas utilizadas para avaliar a produção de prostaciclina, demonstraram aumento na produção de prostaciclina com concentrações de 0,1 e 1uM, durante incubação de 16, 24 e 48 horas (HERMENEGILDO et al., 2005).

Já para a utilização de fitoestrógenos na avaliação da produção de óxido nítrico, a literatura aponta aumentos em sua produção com concentrações a partir de 40 ng/mL

para genisteína e 100 ng/mL para daidzeína, durante 48 horas de exposição, não ocorrendo alterações significativas para biocanina e formononetina (SIMONCINI et al., 2005a).

De acordo com nossos resultados, os fitoestrógenos foram capazes de reduzir a expressão de VCAM-1 em ECV304, tanto na superfície celular como no sobrenadante, mas a utilização dos fitoestrógenos em conjunto não provocou maior redução na produção dessa molécula do que aquela observada quando os fitoestrógenos foram utilizados separadamente. Não havendo portanto, interação entre eles para redução da produção de VCAM-1 em ECV 304.

Quanto às dosagens de ICAM-1 em ECV304, obtivemos que os fitoestrógenos foram capazes de reduzir a expressão dessa molécula, tanto no sobrenadante como na superfície celular, sendo entretanto, necessário maior tempo de exposição das células aos fitoestrógenos para que ocorresse essa redução. Além disso, a utilização dos fitoestrógenos em conjunto provocou maior redução na produção de sICAM-1 do que aquela observada quando os fitoestrógenos foram utilizados separadamente, havendo interação entre eles para redução da produção de sICAM-1 em ECV 304. Um maior tempo de exposição também reduziu a produção dessa molécula, entretanto, isto ocorreu somente na superfície celular.

Todos os fitoestrógenos também reduziram a expressão de E-selectina em ECV304, tanto no sobrenadante como na superfície celular, sendo entretanto, necessário maior tempo de exposição das células aos fitoestrógenos para que ocorresse essa redução no sobrenadante. Além disso, a utilização dos fitoestrógenos em conjunto não provocou redução na produção de E-selectina maior do que aquela observada quando os fitoestrógenos foram utilizados separadamente.

A mistura entre os fitoestrógenos não apresentou maior eficiência na redução das moléculas de adesão na superfície celular, entretanto, parece provocar maior redução de sICAM-1, mas não de sVCAM-1 nem de sE-selectina.

Os resultados demonstraram também, correspondência da expressão das moléculas de adesão na superfície celular e sua liberação para o sobrenadante, podendo os testes de dosagens das formas solúveis das moléculas, serem utilizados

para estudos “in vivo”, onde a avaliação da expressão dessas moléculas na superfície celular, apresenta maiores dificuldades.

Em relação a HUVEC, os quatro fitoestrógenos e Mix1 foram capazes de reduzir a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na superfície celular que se refletiu também em redução dessas moléculas no sobrenadante, a partir de 24 horas de exposição, causando maior redução dessas moléculas quanto maior o tempo de exposição, com exceção de ICAM no sobrenadante, quando a exposição com 48 horas produziu menores efeitos. Já a eficiência de Mix1 não se mostrou maior que a dos fitoestrógenos isolados para nenhuma molécula de adesão na superfície celular, entretanto, apresentou maior eficácia para sICAM-1 e sE-selectina, mas não para sVCAM-1.

As isoflavonas presentes nos produtos de soja, podem apresentar grande variação em suas quantidades e qualidade de acordo com a variedade de soja e seu processo de obtenção (WANG; MURPHY, 1994), portanto, os extratos de “*red clover*” são referidos freqüentemente como sendo melhores que de outras plantas como fonte de fitoestrógenos, principalmente devido à padronização do processo de extração das isoflavonas, fazendo com que composições confiáveis de medicação possam ser obtidas.

Além disso, as isoflavonas contidas nos extratos de “*red clover*” possuem alta atividade estrogênica, devido à transformação mais ativa dos compostos através da absorção intestinal (BECK et al., 2003).

Extratos de *Trifolium pratense* (*red clover*), *Cimifuga racemosa* e *Trifolium pratense* suplementado com cálcio e vitamina D₃, também são capazes de aumentar a produção de óxido nítrico, assim como o polifenol resveratrol, um fitoestrógeno encontrado na uva e seus derivados, além de proteger as células endoteliais contra os efeitos danosos do peróxido de hidrogênio (PAULO et al., 2008; SALVADOR et al., 2008).

Fitoestrógenos derivados do “*red clover*” também previnem a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 induzida pelo LPS em células endoteliais humanas (SIMONCINI et al., 2008). Por essa razão decidimos testar a ação do medicamento Menoflavon,

composto por extrato de “*red clover*” na expressão das moléculas de adesão, além de compará-lo com as isoflavonas extraídas da soja *Glycine max*.

Os testes em ECV304 revelaram que tanto os fitoestrógenos extraídos do “*red clover*”, quanto os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*, foram capazes de reduzir sVCAM-1, sICAM-1 sE-selectina, além de reduzir VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na superfície celular, ainda que para ICAM-1, tenha sido necessária uma maior exposição, ocorrendo apenas com 48 horas. Além disso, não houve diferenças significativas entre eles nas dosagens de VCAM-1, mas houve prevalência de Mix2 na dosagem de sICAM-1 e de E-selectina na superfície celular com 24 horas de exposição, enquanto Menoflavon foi mais efetivo na redução de ICAM-1 na superfície celular e na redução de E-selectina na superfície celular com 48 horas de exposição.

Os testes em HUVEC também revelaram que tanto os fitoestrógenos extraídos do *red clover*, quanto os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*, foram capazes de reduzir as três moléculas de adesão, tanto no sobrenadante como na superfície celular, com 24 horas e com 48 horas de exposição. Entretanto, enquanto Menoflavon foi mais eficiente com 24 horas de exposição, Mix 2 provocou maiores reduções com 48 horas. Além disso, a comparação entre Menoflavon e Mix 2 apresentou resultados significativos e menores para Menoflavon com VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina e para sVCAM-1 e sICAM-1, apresentando portanto, os fitoestrógenos extraídos do *red clover* maior efetividade na redução das moléculas de adesão que aqueles extraídos da soja *Glycine max*.

A exposição de células em cultura a concentrações crescentes (de 10nM a 10mM) de Tibolona previamente à estimulação com LPS, reduz significativamente a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na superfície celular de uma maneira concentração dependente (SIMONCINI; GENAZZANI, 2000). Assim sendo, esse tipo de exposição age de maneira preventiva aos eventos provocados pelo LPS.

Por isso, estabelecemos a exposição aos fitoestrógenos previamente à estimulação com LPS, como o tratamento padrão a ser realizado para a avaliação da ação preventiva dos fitoestrógenos frente às consequências provocadas pelo LPS. Entretanto, decidimos testar se mesmo com as células previamente expostas ao LPS, os fitoestrógenos seriam capazes de reduzir a produção das moléculas de adesão, o

que caracterizaria uma ação terapêutica dos fitoestrógenos, possibilitando que sejam utilizados em um possível tratamento da aterosclerose.

Obtivemos como resultados em ECV304, que com exceção de Mix2 que não reduziu VCAM na superfície, mesmo com 48 horas de exposição, os demais fitoestrógenos foram capazes de reduzir as três moléculas de adesão nesse tipo celular, tanto na superfície celular quanto no sobrenadante, seja já com 24 horas, ou sendo necessárias 48 horas, como ocorreu para ICAM-1 na superfície celular, quando adicionados após o início do estímulo. Assim, os fitoestrógenos foram capazes de reduzir as moléculas de adesão mesmo quando o LPS já estava agindo, demonstrando que podem ser utilizados tanto preventivamente como para tratamento. Entretanto, observamos também, que quando adicionados anteriormente são mais efetivos para redução de VCAM-1 e E-selectina, com maior tempo de exposição, enquanto que quando adicionados posteriormente diminuem sua ação quando o tempo de exposição aumenta.

Os resultados em HUVEC, também demonstraram a capacidade dos fitoestrógenos em reduzir as três moléculas de adesão, tanto na superfície celular quanto no sobrenadante, seja com 24 horas, ou sendo necessárias 48 horas, quando adicionados após o início do estímulo por LPS. Sendo também mais efetivos com maior tempo de incubação quando adicionados anteriormente ao LPS enquanto que quando adicionados posteriormente diminuem sua efetividade com o aumento do tempo de exposição, embora ainda apresentem resultados significativos. Assim, os fitoestrógenos foram capazes de reduzir as moléculas de adesão em HUVEC, mesmo quando o LPS já está agindo, demonstrando que podem ser utilizados tanto preventivamente como para tratamento.

A incidência de aterosclerose e aumenta drasticamente nas mulheres após a menopausa (LERNER; KANNEL, 1986). Isto porque, muitos tipos celulares vasculares expressam receptores alfa e beta, e são funcionalmente regulados por estrógenos (MENDELSON; KARAS, 1999).

Os estrógenos naturais aumentam a liberação de moléculas anti-aterogênicas derivadas do endotélio como o óxido nítrico (CAULIN-GLASER et al., 1997) e reduzem a expressão das moléculas de adesão (CAMs) envolvidas na interação endotélio-

leucócitos induzida por citocinas inflamatórias (De CATARINA et al., 1995), indicando seu importante papel anti-aterogênico através da regulação da função das células endoteliais, pois na patologia da aterosclerose, as moléculas de adesão são mediadores cruciais em vários passos do recrutamento de leucócitos. (NAKASHIMA et al., 1998).

A importância da modulação da expressão das moléculas de adesão pelo estrógeno, se deve ao fato de que as disfunções nesses processos são as causadoras dos primeiros eventos da aterogênese e estão intimamente envolvidas na patogênese das lesões primárias (CYBULSKY; GIMBRONE, 1991).

Em adição, os fitoestrógenos extraídos do “red clover” não alteram a inibição dependente de estrogênio das moléculas de adesão na presença de concentrações de estrógeno correspondentes àsquelas encontradas na idade fértil, mas se adicionam aos efeitos antiinflamatórios do estrógeno nas concentrações encontradas após a menopausa, em HUVECs (SIMONCINI et al., 2008).

Nossos resultados com ECV304, também demonstraram essa interação observada por Simoncini, tanto para o “red clover”, como para os fitoestrógenos extraídos da soja, principalmente quando estes foram adicionados à concentração de estrógeno encontrada na menopausa (10pg), mas também observamos algumas interações com estrógeno na concentração encontrada em mulheres em idade fértil (100pg), principalmente com genisteína e com Menoflavon.

Também com HUVEC, as interações ocorreram principalmente com o 17β estradiol na concentração de 10pg, que é aquela encontrada em mulheres menopausadas, mas foram observadas interações com o 17β -estradiol na concentração encontrada na idade fértil (100pg), demonstrando que os fitoestrógenos possivelmente atuam na redução das moléculas de adesão quando o 17β estradiol sozinho não consegue obter essa redução. Portanto, de acordo com nossos resultados realmente ocorrem interações entre os fitoestrógenos e o 17β estradiol, principalmente quando este se encontra em baixas concentrações como aquelas encontradas nas mulheres menopausadas.

De acordo com a literatura a utilização de um excesso de antagonista de receptor de estrógeno ICI 182,780 (1mM), bloqueia completamente a redução da expressão de VCAM-1 induzida pela Tibolona (SIMONCINI; GENAZZANI, 2000).

Então, para determinar se a ação dos fitoestrógenos na expressão das moléculas de adesão está relacionada com a ativação do receptor de estrógeno, como ocorre para outros compostos sintéticos, as células foram pré-tratadas com os compostos pesquisados na presença ou ausência de ICI e então estimuladas com LPS, avaliando se o antiestrógeno é capaz de inibir os fitoestrógenos como faz com o 17 β estradiol e com a Tibolona.

A inibição deficiente observada com ECV304 neste ensaio foi devida ou à concentração utilizada ou ao tempo de incubação, ou ainda a ambos. Entretanto, para ECV304 não foram realizados novos testes com ICI, devido a pouca disponibilidade deste produto.

Para HUVEC, observamos que o ICI foi capaz de inibir a ação dos fitoestrógenos sobre a expressão das três moléculas de adesão, na superfície celular e no sobrenadante, seja com 24 horas de exposição, ou necessitando de maior tempo. Os resultados observados nas análises do sobrenadante são compatíveis com aqueles encontrados na superfície celular, refletindo a liberação dessa molécula da superfície celular para o sobrenadante, demonstrando que a ação dos fitoestrógenos ocorre através da ativação dos receptores de estrógeno, principalmente ER α , como demonstrado por Simoncini et al. (2008).

Os mecanismos pelos quais os fitoestrógenos exercem suas ações ainda não são conhecidos. Entretanto, estudos sugerem que esteja relacionado ao NF- κ B, pois sua forma ativa é gerada por uma variedade de estímulos inflamatórios ou ambientais. Esta forma ativa se move para o núcleo onde ativa genes alvo.

Estudos realizados mostraram que a genisteína exerce efeito inibitório na atividade de NF- κ B em células cancerígenas, induzindo aumento de apoptose (WANG, et al., 2006), assim como mostraram que a genisteína exerce atividade anti-NF- κ B durante injúria aguda do pulmão induzida por LPS (KANG et al., 2003).

Além disso, extratos de red clover, principalmente devido à genisteína, estão associados com redução da translocação nuclear de NF- κ B em células endoteliais

humanas. Esta inibição de NF- κ B pelas isoflavonas pode ser relevante para a redução da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 nas células endoteliais causada por esses compostos. Entretanto, os mecanismos da inibição de NF- κ B por isoflavonas ainda não são conhecidos (SIMONCINI et al., 2008).

Estes mecanismos podem estar relacionados com a Src quinase, que segundo estudos está envolvida na ativação de NF- κ B, e como genisteína é também conhecida como inibidor da Src quinase (DIXON; FERREIRA, 2004), esta ação pode representar um possível mecanismo de inibição. Outras possibilidades podem ser a interferência na ativação de NF- κ B via recrutamento do receptor de estrógeno (SIMONCINI et al., 2000), ou efeitos antioxidantes (DIXON; FERREIRA, 2004), ou ainda, podem estar relacionados ao óxido nítrico, um conhecido agente anti-inflamatório que interfere nas vias de sinalização de NF- κ B (SIMONCINI et al., 2008).

6.0 CONCLUSÕES

- 1) Foi possível padronizar a coleta do cordão umbilical, a extração e o cultivo das HUVECs e identificar as células endoteliais extraídas como sendo HUVECs;
- 2) A linhagem laboratorial de células endoteliais humanas imortalizadas, ECV304, apresentou efetividade como modelo de cultura inflamatório, sendo capaz de expressar as três moléculas de adesão na superfície celular e liberar formas solúveis dessas moléculas no sobrenadante, existindo para isso condições de estímulo por LPS ideais para cada molécula;
- 3) A condição mais adequada para que houvesse aumento da produção das três moléculas de adesão em HUVEC, tanto na superfície celular como no sobrenadante foi a de 1 μ g/mL de LPS, durante 12 horas de exposição.
- 4) Tanto em ECV quanto em HUVEC, os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*, foram capazes de reduzir VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, e as formas solúveis dessas moléculas de adesão, sendo efetivos como agentes preventivos, mas também como agentes terapêuticos;
- 5) A mistura entre os fitoestrógenos extraídos da soja não apresentou maior eficiência que os fitoestrógenos isolados na redução das moléculas de adesão na superfície celular, entretanto, apresentou maior redução das formas solúveis dessas moléculas;
- 6) As isoflavonas extraídas do *red clover* foram mais efetivas na redução das moléculas de adesão do que as isoflavonas extraídas da soja em HUVECs.
- 7) Tanto em ECV quanto em HUVEC os fitoestrógenos apresentaram interação com o 17 β estradiol, principalmente quando este se encontrava em baixas concentrações, sugerindo um efeito protetor para mulheres pós-menopausa.
- 8) A ação dos fitoestrógenos ocorre via ativação do receptor de estrógeno, como demonstrado pela inibição da ação desses compostos por ICI;
- 9) Embora com algumas pequenas diferenças, HUVEC e ECV304 apresentaram os mesmos resultados finais, podendo esta linhagem celular ser utilizada como modelo de cultura.

- 10) As formas solúveis das moléculas de adesão refletiram o que ocorreu na superfície celular, podendo ser utilizadas como marcadores do estado de ativação endotelial para pesquisas *in vivo*.
- 11) Por se tratar de um ensaio *in vitro*, pesquisas *in vivo* são necessárias para confirmação destes resultados.
- 12) Tanto os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*, quanto os fitoestrógenos extraídos do *red clover*, apresentaram efeitos anti-aterogênicos, demonstrando um possível efeito cardioprotetor para mulheres pós-menopausa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBELDA, S.M.; OLIVER, P.D.; ROMER, L.H.; BUCK, C.A. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 110, n. 4, p.1227-1237, Abril 1990.

AKIYAMA T.; ISHIDA J.; NAKAGAWA S.; OGAWARA H.; WATANABE S.; ITOH N.; SHIBUYA M.; FUKAMI Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 12, p. 5592–5595, April 1987.

ANTONELLI A.; BIANCHI M.; CRINELLI R.; GENTILINI L.; MAGNANI M. Modulation of ICAM-1 Expression in ECV304 Cells by Macrophage-Released Cytokines. **Blood Cells, molecules & diseases**, California, v. 27, n. 6, p. 978-991, nov./dec. 2001.

APPT, S.E. Usefulness of the monkey model to investigate the role soy in postmenopausal women's health. **ILAR J**, Washington, v. 45, n. 2, p. 200-211, 2004.

BAKHIT R.M. et al. Intake of 25g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 124, n.2, p. 213-22, February 1994.

BECK V. et al. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plants extracts for large scale use in hormone replacement therapy. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 84, n.2-3, p.259-268, February 2003.

BEVILACQUA, M.P. et al. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, Washington, v. 84, n. 24, p.9238-9242, December 1987.

BRAUNERSREUTHER, V.; MACH, F. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, n. 18, p. 2079-2088, September 2006.

CANO A.; VAN BAAL W.M. The mechanisms of thrombotic risk induced by hormone replacement therapy. **Maturitas**, Limerick, v. 40, n. 1, p.17-38, October 2001.

CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, New York, v. 84, n. 7, p. 2068-2101, October 1994.

CAULIN-GLASER, T. et al. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. **Circulation Research**, Dallas, v. 81, n. 5, p. 885-892, November 1997.

CHAVAKIS, T. et al. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 53, p. 55602-55608, December 2004.

CHEN, J.; LÓPEZ, J.A. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. **Microcirculation**, New York, v. 12, n. 3, p. 235-246, ap./may 2005.

CINES, D.B. et al. Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, New York, v. 91, n. 10, p. 3527-3561, May 1998.

CLARKSON, T.B.; ANTHONY, M.S.; MORGAN, T.M. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine strogens and soy phytoestrogens. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v. 86, n 1, p.41-47, January 2001.

COLACURCI, N. et al. Effects of soy isoflavones on endothelial function in healthy postmenopausal women. **Menopause**, New York, v.12, n. 3, p.299-307, may/jn. 2005.

COLLINS, R.G.; VELJI, R.; GUEVARA, N.V.; HICKS, M.J.; CHAN, L.; BEAUDET, A.L. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 191, n. 1, p. 189-194, January 2000.

COOK-MILLS, J.M.; DEEM, T.L. Active participation of endothelial cell in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v. 77, n. 4, p. 487-495, April 2005.

COS, P. et al. Phytoestrogens: recent developments. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 7, p. 589-599, July 2003.

COSENTINO, F.; VOLPE, M. Hypertension, stroke and endothelium. **Current Hypertension Reports**, Philadelphia, v. 7, n. 1, p. 68-71, February 2005.

CUNNINGHAM, K.S.; GOTLIEB, A.I. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 85, n. 1, p. 9-23, January 2005.

CYBULSKY, M.; GIMBRONE, M.J. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. **Science**, Washington, v. 251, n. 4995, p. 788–791, February, 1991.

De CATERINA, R. et al. Nitric oxide decreases cytokine – induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 96, n. 1, p. 60-68, July 1995.

DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, New York, v. 60, n.3, p. 205-211, June 2002.

DUSTIN, M.L.; SPRINGER, T.A. Lymphocyte function associated antigen (LFA-1) interacting with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to culture endothelial cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 107, n. 1, p. 321-331, July 1988.

EDEN, J.A. Managing the menopause: phytoestrogens or hormone replacement therapy? **Annals of Medicine**, Helsinki, v. 33, n. 1, p. 4-6, February 2001.

FUJIO, Y. et al. Responses of smooth muscle cells to platelet-derived growth factor are inhibited by herbimycin-A tyrosine kinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 195, n. 1, p. 79-83, August 1993.

GEBB, S.; STEVENS, T. On lung endothelial cell heterogeneity. **Microvascular Research**, New York, v. 68, n. 1, p. 1-12, July 2004.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. How do endothelial cells orientate? **EXS**, Basel, v. 94, n. 1, p. 3-15, 2005.

GIMBRONE, M.A. et al. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. **Science**, Washington, v. 246, n. 4937, p. 1601-1603, December 1989.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J.L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**, Cambridge, v. 104, n. 4, p. 503-516, February 2001.

GRODSTEIN, F. et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 335, n. 7, p. 453-461, August 1996.

HALL, W.L. et al. Soy-isoflavone-enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular disease risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 82, n. 6, p. 1260-1268, December 2005.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, April 2005.

HENDERSON, V.W. et al. Estrogen replacement therapy in older women: comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. **Archives of Neurology**, Chicago, v. 51, n. 9, p. 896-900, September 1994.

HERMENEGILDO, C. et al. A. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 315, n. 2, p. 722-728, November 2005.

HEWETT, P.W.; MURRAY, J.C. Human lung microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. **Microvascular Research**, New York, v. 46, n. 1, p. 89-102, July 1993.

HEWETT, P.W.; MURRAY, J.C. Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 221, n. 3, p. 697-702, April 1996.

HOMEM DE BITTENCOURT, P. I. et al. LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.193, n. 2, p. 245-258, August 2007.

HUMPHREY, L.L.; CHAN, B.K.S.; SOX, H.C. Postmenopausal Hormone Replacement Therapy and the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 137, n. 4, p. 273-284, August 2002.

HUO, Y.; LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 173, n. 1, p. 35-43, September 2001.

JAFFE, E. A.; HOYER, L.W.; NACHMAN, R.L. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, Washington, v. 71, n. 5, p. 1906-1909, May 1974.

JONSSON, A.S.; PALMBLAD, J.E. Effects of ethanol on NF-kappa B activation, production of myeloid growth factors, and adhesive events in human endothelial cells. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 184, n. 6, p. 761-769, September 2001.

KANG, J.L. et al. Time course for inhibition of lipopolysaccharide-induced lung injury by genistein: relationship to alteration in nuclear factor kB activity and inflammatory agents. **Critical Care Medicine**, New York, v. 31, n. 2, p. 517-524, February 2003.

KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood**, New York, v. 88, n. 9, p. 3259-3287, November 1996.

LAFRENIE, R.M.; BUCHANAN, M.R.; ORR, F.W. Adhesion molecules and their role in cancer metastasis. **Cell Biophysics**, London, v. 23, n. 1-3, p. 3-89, aug./dec. 1993.

LENHOFF, S.; OLOFSSON, T. Cytokine regulation of GM-CSF and G-CSF secretion by human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC). **Cytokine**, San Diego, v. 8, n. 9, p. 702-709, September 1996.

LERNER, S.J.; KANNEL, W.B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of Framingham population. **American Heart Journal**, St. Louis, v. 111, n. 2, p. 383-390, February 1986.

LEY, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 263-268, June 2003.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 868-874, December 2002.

LIBBY, P. et al. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. **American Journal of Pathology**, New York, v. 124, n. 2, p. 179-185, August 1986.

LIU, Y. et al. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 1, p. 7-13, January 2004.

LIU, D.; HOMAN, L.L.; DILLON, J.S. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. **Endocrinology**, Baltimore, v. 145, n. 12, p. 5532-5539, December 2004.

LTEIF, A.A.; HAN, K.; MATHER, K.J. Obesity, insulin resistance and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks. **Circulation**, Dallas, v. 112, n. 1, p. 32-38, July 2005.

MATTI, J.; ADLERCREUTZ, T.; ADLERCREUTZ, H. Dietary Soy-Derived Isoflavone Phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 1-5, July 2000.

MAY, L.T.; TORZIA, G.; COZZOLINO, F.; RAY, A.; TATTER, S.B.; SANTHANAM, U. et al. Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 159, n. 3, p. 991-998, March 1989.

MEI, J.; YEUNG, S.S.C.; KUNG, A.W.C. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v. 86, n. 11, p. 5217-5221, November 2001.

MENDELSON, M.E.; KARAS, R.H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 23, p. 1801-1811, June 1999.

MERRITT, J.C. Metabolic Syndrome: Soybean Foods and Serum Lipids. **Journal of National Medical Association**, New York, v. 96, n. 8, p. 1032-1041, August 2004.

MICHAUX, G.; CLUTLER, D.F. How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. **Traffic**, v. 5, n. 2, p. 69-78, February 2004.

MILLER, W.L.; BURNETT, J.C. Blood vessel physiology and pathophysiology. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, Pennsylvania, v. 16, n. 2, p. 251-260, May 1990.

MOHAMMAD, S.F.; BOS, W.J.W. - Physiology of the vessel blood interface. In: Bunt, T.J. (ed.) - Iatrogenic vascular injury. A Discourse an surgical technique. New York, Futura Publishing, p. 14, 1990.

MORENO, J.J. Antiflammin-2 Prevents HL-60 Adhesion to Endothelial Cells and Prostanoid Production Induced by Lipopolysaccharides. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 296, n. 3, p. 884-889, March 2001.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 82, n. 5, p. 521-533, May 2002.

NABULSI, A.A.; FOLSOM, A.R.; WHITE, A. et al. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The atherosclerosis risk in communities study investigators. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 328, n. 15, p. 1069-1075, April 1993.

NAESSEN, T.; PERSSON, I.; ADAMI, H. O. Hormone replacement therapy and the risk for first hip fracture. A prospective population-based cohort study. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 113, n. 2, p. 95-103, July 1990.

NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; SHIMIZU, H. Soy and fish oil intake and mortality in a Japanese community. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 156, n. 9, p. 824-831, November 2002.

NAKASHIMA, Y. et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the apo-E-deficient mouse. **Arteriosclerosis, Thrombosis vascular Biology**, Dallas, v. 18, n. 5, p. 842-851, May 1998.

NESTEL, P.J. ; YAMASHITA, T. ; SASAHARA, T. et al. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. **Arteriosclerosis, Thrombosis vascular Biology**, Dallas, v. 17, n. 12, p. 3392-3398, December 1997.

NOUBIR, S.; HMANA, Z.; REINER, N.E. Dual receptors and distinct pathways mediate IRAK degradation in response to lipopolysaccharide: involvement of CD14/TLR4, CR3 and phosphatidylinositol 3-kinase, **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 24, p. 25189-25195, June 2004.

OSBORN, L. et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. **Cell**, Cambridge, v. 59, n. 6, p. 1203-1211, December 1989.

PAULO, M. et al. Activation of nitric oxide synthesis in endothelial cell by different phytoestrogens. **Gynecological Endocrinology**, Carnforth, v. 24, n. 1, p. 216, 2008. Supplement.

RICE, G. E. et al. Vascular and nonvascular expression of ICAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. **American Journal of Pathology**, New York, v. 138, n. 2, p. 385-393, February 1991.

RIDKER, P.M. et al. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. **Lancet**, London, v. 351, n.9096, p. 88-92, January 1998.

RIOS, D.R. et al. Effects of isoflavones on the coagulation and fibrinolytic system of postmenopausal women. **Nutrition**, Paris, v. 24, n. 2, p. 120-126, February 2008.

ROBERT, L.; BIREMBAUT, P. - Extracellular matrix of the arterial vessel wall. In: Camilleri, J.P. (ed.) - Diseases of the arterial wall. London, Springer-Verlag, p. 43-54, 1989.

ROLLINS, B.J. et al. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. **American Journal of Pathology**, New York, v. 136, n. 6, p. 1229-1233, June 1990.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 2, p. 115-126, January 1999.

RYMER, J.; MORRIS, E. P. Extracts from Clinical Evidence: Menopausal symptoms. **BMJ**, London, v. 321, n. 7275, p.1516-1519, December 2000.

SALVADOR, M.M. et al. Resveratrol increases nitric oxide production by endothelial cell. **Gynecological Endocrinology**, Carnforth, v. 24, n. 1, p. 216, 2008. Supplement.

SCHUTZ, M.; FRIEDL, P. Isolation and cultivation of endothelial cells derived from human placenta. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 71, n. 4, p. 395-401, December 1996.

SELLMAN, S. Osteoporosis: the bones of contention. **Nexus New Time Magazine**, v. 5, n. 6, p. 1-8. 1998.

SHIMOKADO, K.; YOKOTA, T.; UMEZAWA, K.; SASAGURLI, T.; OGATA, J. Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, Dallas, v. 14, n. 6, p. 973-981, June 1994.

SIMONCINI, T. et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit phosphatidylinositol-3OH kinase. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 538-541, September 2000.

SIMONCINI, T. et al. Activation of nitric oxide synthesis in human endothelial cells by red clover extracts. **Menopause**, New York, v. 12, n. 1, p. 69-77, jan./feb. 2005a.

SIMONCINI, T. et al. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. **Circulation Research**, Dallas, v. 87, n. 1, p. 19-25, July 2000.

SIMONCINI, T.; GENAZZANI, A.R. Tibolone inhibits leukocyte adhesion molecule expression in human endothelial cells. **Molecular and Celular Endocrinology**, Limerick, v. 162, n.1-2, p. 87-94, April 2000.

SIMONCINI, T. et al. A.R. Differential estrogen signaling in endothelial cells upon pulsed or continuous administration. **Maturitas**, Limerick, v. 50, n. 4, p. 247-258, April 2005b.

SIMONCINI, T. et al. Effects of phytoestrogens derived from red clover on atherogenic adhesion molecules in human endothelial cells. **Menopause**, New York, v. 15, n.3, p.542-550, 2008.

STAEHELIN, L.A.; HULL, B.E. Functional significance of variations in the geometrical organization of tight junctions network. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 68, n. 3, p. 688-704, March 1976.

STORK, S. et al. The effect of 17 β -estradiol on endothelial and inflammatory markers in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 165, n. 2, p. 301-307, December 2002.

TANG, M.X. et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. **Lancet**, London, v. 348, n. 9025, p. 429-432, August 1996.

TEDDER, T.F. et al. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 10, p. 866-873, July 1995.

UNGER, R.E.; KRUMP-KONVALINKOVA, V.; PETERS, K.; KIRKPATRICK, C.J. In vitro expression of endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. **Microvascular Research**, New York, v. 64, n. 3, p. 384-397, November 2002.

VAN DE STOLPE, A.; VAN DER SAAG, P.T. Intercellular adhesion molecule-1. **Journal of Molecular Medicine**, Heidelberg, v. 74, n. 1, p. 13-33, January 1996.

VERBON, A. et al. IC14, an anti-CD14 antibody, inhibits endotoxin-mediated symptoms and inflammatory responses in humans, **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 5, p. 3599-3605, March 2001.

VERHOEVEN, M.O. et al. Effect of a combination of isoflavones and *Actaea racemosa* Linnaeus on climacteric symptoms in healthy symptomatic perimenopausal women: a 12-week randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Menopause**, New York, v. 12, n. 4, p. 412-420, jul./aug. 2005.

XU, X. et al. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n.9, p. 2307-2317, September 1995.

WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 8, p. 1674-1677, August 1994.

WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 8, p. 1666-1673, August 1994.

WANG, Z. et al. Inhibition of nuclear factor kB activity by genistein is mediated via Notch-1 signaling pathway in pancreatic cancer cells. **International Journal of Cancer**, New York, v. 118, n. 8, p. 1930-1936, April 2006.

WASHBURN, S. et al. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. **Menopause**, New York, v. 6, n. 1, p. 7-13, 1999.

WEISS, N.S.; URE, C.L.; BALLARD, J.H. Decreased risk of fractures of the hip and lower forearm with postmenopausal use of estrogen. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 303, n. 21, p. 1195-1198, November 1980.

WIEL, E. et al. The endothelium in intensive care. **Critical Care Clinics**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 403-416, July 2005.

WOLK, K.; KUNZ, S.; CROMPTON, N.E.; VOLK, H.D.; SABAT, R. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance, **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 20, p. 18030-18036, May 2003.

WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of oestrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 288, n. 3, p. 321-333, July 2002.

WUTTKE, W. et al. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 83, n. 1-5, p. 133-147, December 2002.

YAFFE, K. et. al. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. **JAMA**, Chicago, v. 279, n. 9, p. 688-695, March 1998.