UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados
sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis**

Carlos Eduardo Ferareze Mendonça

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o
sistema complemento e moléculas de adesão solúveis

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia.

Orientado: Carlos Eduardo Ferareze
Mendonça

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleni Mara
Marzocchi Machado

Ribeirão Preto – SP

2017

**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.**

Mendonça, Carlos Eduardo Ferareze

Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o sistema
complemento e moléculas de adesão solúveis. Ribeirão Preto, 2017.
105p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientadora: Marzocchi-Machado, Cleni Mara

1. Sistema Complemento. 2. Moléculas de Adesão. 3. Contraceptivos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carlos Eduardo Ferareze Mendonça

Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleni Mara Marzocchi Machado.

Aprovada em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Apoio financeiro:

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq)**

Processos: 13146/2015-3 (CNPq - bolsa) e

484189/2013-1 (CNPq Universal 14/2013 - auxílio pesquisa)

Dedicatória

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida: meu pai, minha mãe e meu irmão, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Agradecimientos

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da sabedoria e discernimento e toda força ao enfrentar um desafio novo, sem Ele nada disso seria possível;

À minha Mãe, Rosemary Ferareze Mendonça, pela formação do meu caráter, pelo apoio e pela dedicação em todos os anos da minha vida e pelo amor incondicional, responsável pela minha visão apaixonada do mundo;

Ao meu Pai, Antônio Carlos Mendonça, meu exemplo, meu herói, o homem mais importante da minha vida, que me mostrou como agir e me comportar diante das adversidades da vida e mesmo na sua simplicidade me educou e me criou para ser gente de bem;

Ao meu irmão, Bruno Ferareze Mendonça, a pessoa que me fez entender o verdadeiro significado de amigo/irmão, parceiro para todas as horas e sempre disposto a ajudar;

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, pela paciência, dedicação, conhecimento e por ter me aberto portas para realização de um sonho;

Às voluntárias, que se disponibilizaram a participar da pesquisa, doando acima de tudo seu tempo e sua atenção para que tudo fosse concretizado;

Aos meus amigos de laboratório, Aline Sanches Pereira, Bruna Saham Archangelo, Gabriel Antônio Nogueira, Gisele Lelis da Silva, Nathália Cristina Canicoba, Juliana Escher Toller Kawahisa e Leandro Sobrinho Ávila por todo o suporte, paciência e ajuda principalmente nos primeiros meses no laboratório, minha segunda família a qual vou levar para sempre comigo;

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

(FCFRP)-USP, a farmacêutica-bioquímica Jennifer Michiko Chauca Yokoya, o químico Luiz Fernando Fortunato Tucci, a técnica de laboratório Tânia Mara Casare Ogasawara, e à farmacêutica-bioquímica Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, pela colaboração com este trabalho, pelo apoio e pela ajuda durante essa caminhada;

Ao Dr. Silvio Antônio Franceschini, médico ginecologista do Serviço Integrado de Saúde da USP (SISUSP), pela ajuda imensurável na captação de voluntárias na comunidade USP e no Centro de Saúde Escola (CSE) Cuiabá da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP;

À Sra. Océlia de Vasconcelos, funcionária do Setor de Pesquisa da Ginecologia do CSE Cuiabá, pela ajuda na captação de voluntárias e coleta de material;

Aos meus amigos do grupo intitulado Irmandade, que me fizeram perceber que família pode ser escolhida, me ajudaram a quebrar muitas barreiras pessoais e com certeza me fizeram uma pessoa melhor, pessoas que possuem um lugar todo especial na minha vida;

Aos professores do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP por auxiliarem meu aprendizado e crescimento acadêmico;

Aos coordenadores e funcionários do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP pela disposição em ajudar sempre que necessário;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana.”

Carl G. Jung

Resumo

MENDONÇA, C.E.F. **Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis.** 2017. 105f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A inflamação envolve vários mecanismos biológicos relacionados entre si e altamente regulados: coagulação, fibrinólise, sistema complemento (SC), antioxidação e regulação hormonal. Fisiologicamente, o SC e a coagulação compartilham componentes regulatórios e várias interações entre o SC e a hemostasia têm sido propostas, mas não elucidadas. O interesse científico sobre as interações do SC com a hemostasia é crescente, devido ao risco de tromboembolismo venoso (TEV) associado ao uso de contraceptivos orais combinados (COC). Nosso grupo tem investigado os efeitos de COC sobre o SC, hemostasia e moléculas de adesão. Os resultados confirmam vantagens do etinilestradiol (EE)/levonorgestrel (LNG), um COC de 2ª geração sobre os de 3ª geração, mantendo-o como referência para comparação com novos COC, os quais buscam componentes mais naturais. Os componentes hormonais nos COC podem influenciar as interações entre o endotélio e o SC, as quais medeiam adesão de neutrófilos ao endotélio, podendo favorecer o TEV. Desde o advento dos COC busca-se constantemente minimizar seus efeitos indesejáveis com redução das doses, diferentes combinações de progestógenos/estrógenos e vias de administração. O 17 β estradiol (E2) é o estrógeno natural e encontra-se combinado com o progestógeno acetato de nomegestrol (NOMAC), mais seletivo para o receptor de progesterona, minimizando efeitos indesejáveis sobre o metabolismo. Considerando-se os benefícios do EE/LNG e a aprovação do E2/NOMAC, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito destes COC sobre: 1) o SC por ativação das Via Clássica (VC) e Via das Lectinas (VL), concentração de C4d e concentração sérica e atividade do inibidor de C1 (C1inh) e 2) os níveis séricos de moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 e vascular (VCAM)-1 e E-selectina. A atividade hemolítica (AH) sérica da VC foi avaliada por ensaio cinético nos grupos de usuárias ou não dos COC e em *pool* de soro humano normal (SHN) exposto aos componentes dos COC. Os demais parâmetros (VL, C4d, C1inh e moléculas de adesão) foram avaliados por ensaios imunoenzimáticos. Os resultados foram: 1) não houve diferenças na AH sérica da VC; 2) exceto para EE+LNG, a AH da VC *in vitro* foi menor quando o *pool* de SHN foi exposto aos componentes individuais das formulações dos COC (EE, LNG, E2 e NOMAC) e à combinação E2+NOMAC comparada ao controle (*pool* SHN sem componentes das formulações dos COC), menor para E2+NOMAC comparada ao EE+LNG e menor para o NOMAC comparado ao LNG; 3) não houve diferenças na ativação da VL; 4) não houve diferenças na concentração sérica do fragmento C4d; 5) a concentração sérica do C1inh foi maior para o grupo EE/LNG, enquanto a atividade do mesmo foi maior para o grupo E2/NOMAC quando comparadas ao grupo controle; 6) a concentração sérica de E-selectina foi maior para o grupo E2/NOMAC comparada ao grupo controle e 7) não houve diferenças para ICAM-1 e VCAM-1. E2/NOMAC teve efeito sobre maior número de parâmetros comparados ao grupo controle, significativos para a maior atividade do C1inh e maior concentração de E-selectina. Este é o primeiro resultado, ao nosso conhecimento, sobre a relação do NOMAC e E-selectina. Observaram-se tendências para redução da AH da VC em consonância com a redução do C4d. Esta observação deve ser destacada uma vez que E2+NOMAC e seus componentes individualizados promoveram redução significativa na AH *in vitro* do SHN. Juntos estes dados sugerem ao E2/NOMAC um efeito sobre a regulação negativa da atividade do SC, enquanto o aumento de E-selectina sugere um efeito pró-inflamatório. Quanto ao EE/LNG, a maioria dos parâmetros manteve-se sem diferenças em relação ao grupo controle. O impacto destas observações depende de aprofundamento na investigação dos efeitos dos COC sobre os sistemas biológicos e de estudos clínicos controlados, os quais juntos podem refletir benefícios em muitos aspectos para a saúde humana, em particular, a contracepção e terapias de reposição hormonal.

Palavras-chave: Sistema complemento; Moléculas de adesão; Contraceptivos.

Abstract

MENDONÇA, C.E.F. **Comparative study of combined oral contraceptives on the complement system and soluble adhesion molecules.** 2017. 105f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Inflammation involves several biologically related and highly regulated biological mechanisms: coagulation, fibrinolysis, complement system (CS), antioxidation and hormonal regulation. Physiologically, CS and coagulation share regulatory components and various interactions between CS and hemostasis have been proposed but not elucidated. The scientific interest in CS interactions with hemostasis is increasing because of the risk of venous thromboembolism (VTE) associated with combined oral contraceptive (COC) use. Our group has investigated the effects of COC on CS, hemostasis and adhesion molecules. Results confirm the advantages of ethinylestradiol (EE)/levonorgestrel (LNG), a 2nd generation COC over the 3rd generation, maintaining it as a reference for comparison with new COC, which seek more natural components. Hormonal components in COC can influence the interactions between the endothelium and the CS, which mediates neutrophil adhesion to the endothelium and may favor VTE. Since the advent of COC, it has been consistently sought to minimize its undesirable effects by reducing dosages, different combinations of progestogens/estrogens and routes of administration. E2 or 17 β estradiol is the natural estrogen and is combined with a new progestin, the nomegestrol acetate (NOMAC), which is more selective for the progesterone receptor, minimizing undesirable effects on metabolism. Considering the benefits of EE/LNG and the approval of E2/NOMAC, the objective of this study was to evaluate the effect of these COC on: 1) CS by measurement of activation of Classical Pathway (CP) and Lectin Pathway (LP), serum concentration of C4d fragment, serum concentration and activity of C1 inhibitor (C1inh) and 2) serum levels of soluble adhesion molecules: intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and E-selectin. The serum hemolytic activity (HA) of CP was assessed by kinetic assay in the COC and non-COC users and in normal human serum (NHS) groups exposed to COC components. Other parameters (LP, C4d, C1inh and soluble adhesion molecules) were evaluated by immunoenzymatic assays. The results were: 1) there was no difference in serum HA of CP; 2) except for EE + LNG, the HA of CP *in vitro* was lower when the *pool* of NHS was exposed to the individual components of the COC formulations (EE, LNG, E2 and NOMAC) and the E2+NOMAC combination compared to the control group (*pool* of NHS without hormonal components), lower for E2+NOMAC compared to EE+LNG and lower for NOMAC compared to LNG; 3) there was no difference in the activation of the LP; 4) there was no difference in the serum concentration of the C4d fragment; 5) the serum concentration of the C1inh was higher for EE/LNG group, whereas its activity was higher for E2/NOMAC group when compared to the control group; 6) the serum concentration of E-selectin was higher for E2/NOMAC group compared to the control group and 7) there was no difference for ICAM-1 and VCAM-1. E2/NOMAC had an effect on a higher number of parameters compared to control group, significant for the higher activity of C1inh and higher concentration of E-selectin. This is the first result, to our knowledge, about the association of NOMAC with E-selectin. Tendencies to reduce the HA of the CP were observed in consonance with the reduction of C4d. This observation should be highlighted since E2+NOMAC and its individualized components promoted a significant reduction in the HA *in vitro* of NHS. Together these data suggest to E2/NOMAC an effect on the down-regulation of CS activity, while the increase of soluble E-selectin suggests a pro-inflammatory effect. Regarding EE/LNG, most of the parameters have no difference compared to control group. The impact of these observations depends on further research into the effects of COC on biological systems and on controlled clinical studies, which together may reflect benefits in many respects to human health, in particular contraception and hormone replacement therapies.

Keywords: Complement system; Adhesion molecules; Contraceptives

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal (HPG) feminino.....	26
Figura 2: Representação esquemática das vias da coagulação.....	32
Figura 3: Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento.....	35
Figura 4: Delineamento experimental.....	44
Figura 5: Representação da cinética de lise para a determinação da atividade hemolítica do sistema complemento.....	51
Figura 6: Atividade hemolítica sérica da via clássica.....	60
Figura 7: Atividade hemolítica da via clássica do sistema complemento em diferentes tempos de exposição do <i>pool</i> de SHN aos diferentes componentes dos COC estudados.....	62
Figura 8: Atividade hemolítica da via clássica do sistema complemento em diferentes tempos de exposição do <i>pool</i> de SHN aos diferentes componentes dos COC estudados.....	64
Figura 9: Atividade da via das lectinas.....	65
Figura 10: Concentração sérica do fragmento C4d.....	66
Figura 11: Determinação semiquantitativa do inibidor de C1 no soro.....	67
Figura 12: Concentração sérica do inibidor de C1.....	68
Figura 13: Atividade do inibidor de C1.....	69
Figura 14: Determinação da concentração de ICAM-1solúvel.....	70
Figura 15: Determinação da concentração de VCAM-1 solúvel.....	71
Figura 16: Determinação da concentração de E-selectina solúvel.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos.....	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Atividade hemolítica
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
BSA	Albumina do soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
C1inh	Inibidor de C, do inglês <i>C1 inhibitor</i>
CFD	Diluyente para fixação do complemento, do inglês <i>complement fixation diluyente</i>
CH	Contraceptivo hormonal
CHC	Contraceptivo hormonal combinado
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COC	Contraceptivo oral combinado
CSE	Centro de Saúde Escola
DNG	Dienogeste
DRSP	Drospirenona
DO	Densidade ótica
DP	Desvio padrão
E2	17 β -estradiol/Estradiol
E2V	Valerato de estradiol, do inglês <i>estradiol valerate</i>
EA	Complexo eritrócito/anticorpo antieritrócito
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EE	Etinilestradiol
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante

FT	Fator tecidual
FXII	Fator XII
FXIIa	Fator XII ativado
Gel	Gelatina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina, do inglês <i>gonadotrophin-release-hormone</i>
HK	Cininogênio de alto peso molecular, do inglês <i>high-molecular-weight kininogen</i>
HPG	Hipotalâmico-hipofisário-gonadal, do inglês <i>hypotalamic-pituitary-gonadal</i>
HPR	Peroxidase de raiz forte, do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1, do inglês <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-1	Interleucina-1
IMC	Índice de massa corporal
LH	Hormônio luteinizante
LNG	Levonorgestrel
MASP	Serina protease associada à lectina ligadora de manose, do inglês <i>mannose-binding protein-associated serine protease</i>
MBL	Lectina ligadora de manose, do inglês <i>mannose-binding protein</i>
NOMAC	Acetato de nomegestrol, do inglês <i>nomegestrol acetate</i>
OPD	do inglês <i>o-Phenylenediamine dihydrochloride</i>
PAI	Inibidor do ativador do plasminogênio, do inglês <i>plasminogen activator inhibitor</i>
PBS	Salina Tamponada com Fosfato, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>

PK	Pré-caliceína, do inglês <i>prekallikrein</i>
SC	Sistema complemento
SHI	Soro humano inativado
SHN	Soro humano normal
SISUSP	Serviço Integrado de Saúde da USP
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
SPS	do inglês <i>sodium polyanethol sulfonate</i>
T1/2	Tempo necessário para o complemento lisar 50% de uma suspensão padronizada de eritrócitos
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEA	Trietonolamina
TEV	Tromboembolismo venoso
TNF-α	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual, do inglês <i>tissue plasminogen activator</i>
VA	Via alternativa
VC	Via clássica
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1, do inglês <i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>
VL	Via das lectinas

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabela	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
Introdução.....	24
1.1 Contraceptivos hormonais combinados.....	25
1.2 Hemostasia.....	30
1.3 Sistema complemento	34
1.4 Moléculas de adesão.....	38
Objetivos	41
2.1 Geral.....	42
2.2 Específicos	42
Casuística.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.1 Delineamento experimental.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.2 Casuística.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.2.1 Critérios de inclusão.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.2.2 Critérios de exclusão.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
Metodologia.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.1 Amostras de sangue para obtenção de soro.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2 Atividade hemolítica da via clássica do sistema complemento.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2.1 Preparo da suspensão de eritrócitos revestidos com anticorpo ...	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2.2 Preparo das concentrações dos componentes hormonais para tratamento do <i>pool</i> de soro humano normal (ensaio <i>in vitro</i>).....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2.3 Determinação da atividade hemolítica da via clássica por ensaio cinético.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3 Determinação da atividade da via das lectinas por ensaio imunoenzimático	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

4.4 Ativação das vias clássica/lectina através da quantificação do fragmento c4d no soro.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.5 Determinação do inibidor de C1 no soro	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6 Avaliação da atividade funcional do inibidor de C1	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7 Quantificação das moléculas de adesão solúveis	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7.1 Molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1)	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7.2 Molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1)	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7.3 E-selectina	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.8 Análises estatísticas	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
Resultados	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1 Atividade hemolítica sérica da via clássica do sistema complemento	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.2 Atividade hemolítica da via clássica do sistema complemento em diferentes tempos de exposição do <i>pool</i> de SHN aos diferentes componentes dos coc estudados	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.3 Ativação da via das lectinas do sistema complemento	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.4 Concentração sérica do fragmento c4d, produto da ativação das VC/VL	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.5 Concentração sérica do inibidor de C1 ...	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.6 Avaliação da atividade do inibidor de C1	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.7 Concentração sérica das moléculas de adesão: ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.7.1 ICAM-1	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.7.2 VCAM-1	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.7.3 E-selectina	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
Discussão.....	73
Conclusão.....	81
Referências Bibliográficas.....	83
Apêndices.....	53

Anexos	59
--------------	----

Introdução

1.1 Contraceptivos hormonais combinados

Na década de 60, os contraceptivos hormonais combinados (CHC) começaram a ser comercializados em formulações contendo estrógenos e progestógenos sintéticos. Tais formulações apresentavam-se na forma farmacêutica como comprimido e, assim, referidos como contraceptivos orais combinados (COC), o que lhes atribuiu o nome popular de pílulas anticoncepcionais. Para muitas mulheres, essa opção anticoncepcional permitiu conforto e confiança, com controle sobre a gravidez. As mulheres podiam então adiar a gravidez até que tivessem alcançado outros objetivos de vida, como educação avançada, desenvolvimento profissional e, para as mulheres que já tinham filhos, os COC ajudaram de forma eficiente a planejar o momento de ter um próximo filho (Dhont, 2010).

Os CHC controlam o ciclo reprodutivo, atuando diretamente sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG, do inglês *hypothalamic-pituitary-gonadal*), que é responsável pela liberação dos hormônios sexuais (Maggi *et al.*, 2016).

O hipotálamo secreta o principal mediador do processo reprodutivo, o hormônio liberador de gonadotrofia (GnRH, do inglês *gonadotrophin-release-hormone*). Uma vez na circulação, esse hormônio liga-se a receptores específicos em células da glândula pituitária anterior (hipófise anterior) e estimula a produção das gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH e o FSH são liberados pela hipófise anterior na corrente sanguínea e agem diretamente sobre as gônadas, estimulando a produção de gametas e hormônios gonadais (Gore, 2008).

Na mulher, o FSH e o LH se encontram em maior concentração na corrente sanguínea na primeira fase de cada ciclo reprodutivo, sendo que o FSH estimula a

maturação do folículo ovariano, enquanto o LH promove a ovulação na metade do ciclo e a produção de hormônios ovarianos como o estrógeno e progesterona (Gore, 2008). O estrógeno e a progesterona por sua vez, atuam sobre o hipotálamo e a hipófise, realizando um *feedback* positivo ou negativo na liberação do GnRH, LH e do FSH (Hiller-Sturmhöfel e Bartke, 1998) (Figura 1).

Figura 1: Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal (HPG) feminino. O eixo HPG é responsável pela manutenção dos hormônios sexuais. O hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que atua diretamente sobre a glândula pituitária, também chamada de hipófise. A hipófise por sua vez libera o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) que atuam sobre os ovários para a produção de estrógeno e progesterona. Dependendo da fase do ciclo menstrual, esses hormônios têm a capacidade de atuar por *feedback* sobre o hipotálamo e a hipófise de maneira estimulatória ou inibitória. Adaptado a partir de Hiller-Sturmhöfel e Bartke (1998).

Os hormônios presentes nos COC regulam o eixo HPG por *feedback* negativo. O estrógeno suprime a liberação de FSH impedindo o crescimento folicular, enquanto a progesterona suprime o LH. Adicionalmente a progesterona contribui

com o efeito contraceptivo por aumentar a viscosidade do muco vaginal dificultando a locomoção dos espermatozoides pelo trato genital feminino (Dhont, 2010).

Apesar dos benefícios que os COC trouxeram para as mulheres o seu uso foi associado ao aumento do risco de tromboembolismo venoso (TEV), devido às altas concentrações de hormônios nessas pílulas (Gialeraki *et al.*, 2016). Este efeito colateral indesejável dos COC tem sido atribuído a ambos os componentes, o estrógeno e o progestágeno (Rosendaal, 2005; Dhont, 2010).

Os efeitos regulatórios dos estrógenos sobre diferentes respostas biológicas podem ser antagônicos dependendo da dose, tempo de exposição e estímulos pré-existentes conduzido por fatores adicionais (Cid *et al.*, 2002). Quanto aos progestágenos, estes formam um grupo de esteroides com efeitos sistêmicos, que podem resultar em riscos diferentes para o TEV, a depender dos tipos de progestágenos e estrógeno associado (Vieira *et al.*, 2007).

Os CHC podem conter diferentes tipos de progestógenos. Os CHC de primeira geração contêm noretinodrel e linestrol, mas são pouco usados. Os COC de segunda geração, bastante usados, contêm levonorgestrel (LNG), enquanto os COC de terceira geração contêm desogestrel ou gestodeno, os quais foram disponibilizados em 1980 e são muito utilizados. A partir de 1995, vários estudos foram realizados sobre a diferença de riscos de TEV associados ao uso de CHC de segunda e terceira geração (Bloemenkamp *et al.*, 1995; Jick *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 1999; Tchaikovski *et al.*, 2007; Gaussem *et al.*, 2011; Stegeman *et al.*, 2013; Gialeraki *et al.*, 2016).

Os estudos confirmam uma associação entre o uso de CHC da terceira geração e o risco aumentado de TEV. Usuárias de CHC de terceira geração enfrentam um risco duas vezes maior de TEV do que usuárias de CHC de segunda

geração contendo LNG (Kemmeren *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2007; Gialeraki *et al.*, 2016). Segundo van Hylckama Vlieg e colaboradores. (2009) a opção mais segura em relação ao risco de TEV é um CHC contendo LNG combinado com uma dose baixa de estrogênio.

Ao longo do tempo tem se buscado melhorar a segurança, a tolerabilidade e os potenciais benefícios dos CHC. O etinilestradiol (EE) foi desenvolvido para aumentar a biodisponibilidade do estradiol no organismo, uma vez que a cadeia etinil faz com que ele se ligue de maneira inespecífica à albumina, impedindo-o de se transformar em formas menos potentes de estrógeno. Os efeitos do EE nos tecidos é cerca de 10 vezes maior do que aquele do estradiol endógeno, com impacto negativo sobre o metabolismo. A presença do grupo 17α etinil no EE o mantém na circulação em forma altamente ativa com subsequentes passagens hepáticas e, conseqüentemente, aumento da produção de proteínas, tais como angiotensina, lipoproteínas e fatores da coagulação, o que pode resultar em maior risco de TEV e de eventos cardiovasculares. Para melhorar o perfil de segurança e tolerabilidade dos CHC, hormônios semelhantes aos naturais têm sido incluídos em novas formulações de CHC. A utilização terapêutica de estrógenos e progestágenos, que simulam os hormônios endógenos, pode ter um impacto mais favorável sobre a hemostasia, metabolismo lipídico e de carboidratos e, por conseguinte, sobre os riscos de TEV e de problemas cardiovasculares (Burkman *et al.*, 2011).

Atualmente, duas preparações com estrógeno natural existem no mercado. Um deles é um COC monofásico, contendo 17β estradiol micronizado combinado com o progestágeno acetato de nomegestrol (E2/NOMAC). O outro é um COC quadrifásico, contendo o valerato de estradiol combinado com o dienogeste como progestágeno (E2V/DNG) (Alsina, 2010; Bastianelli, 2017). A metabolização do

estrógeno na forma natural (E2) gera metabólitos mais fracos que competem com os mais potentes e controlam a resposta biológica (Kuhl, 1998). A substituição de EE pelo E2 resulta em níveis de estrógeno circulante inferiores aos observados durante o ciclo menstrual normal e os efeitos secundários atribuíveis ao seu uso dependerão da modulação exercida pela progestógeno adicionado (Alsina, 2010).

Os progestógenos nos contraceptivos são derivados da molécula de testosterona (p.ex., levonorgestrel) ou estruturalmente similares à progesterona. Neste último caso, um dos mais novos progestógenos para os COC é o NOMAC, aprovado em 2011 (Yang e Plosker, 2012). O NOMAC apresenta maior especificidade para o receptor de progesterona, característica que o torna mais similar à progesterona natural (Schindler *et al.*, 2003; Burke, 2013).

Desde que as pílulas contraceptivas foram lançadas no mercado, há uma busca constante por formulações que eliminem ou minimizem os efeitos indesejáveis dos seus componentes, em especial aqueles relacionados ao risco de TEV. A ideia de reunir nos CHC moléculas o mais similares possível aos hormônios endógenos é sem dúvida uma grande perspectiva em direção a assegurar a contracepção associada à saúde e ao bem-estar da mulher. Contudo, os benefícios e as implicações clínicas das novas propostas disponíveis ainda não estão estabelecidos e necessitam de dados obtidos a partir de estudos científicos.

Todos estes aspectos sobre o efeito dos CHC podem ter importantes implicações na fisiopatologia de doenças mediadas por distúrbios da coagulação ou doenças inflamatórias crônicas. Sobretudo, os mecanismos envolvidos na regulação destas respostas biológicas sob o efeito dos CHC não são conhecidos e devem ser investigados.

1.2 Hemostasia

A hemostasia é o processo responsável pela manutenção da integridade vascular e da fluidez do sangue no sistema circulatório. O sistema hemostático se contrapõe à perda excessiva de sangue e evita a formação de trombos vasculares graças à ação regulada de uma variedade de mecanismos, tais como as plaquetas, os vasos sanguíneos, as proteínas da coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico. Quando o sangue se expõe a componentes que normalmente não estão no interior dos vasos em decorrência a lesões estruturais (lesão vascular) ou alterações bioquímicas o sistema de coagulação é iniciado (Simak e De Paoli, 2017).

A coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica, sequencial de zimogênios, resultando na formação de trombina que, então converte o fibrinogênio solúvel em coágulo de fibrina (insolúvel). Uma das vias de ativação é atualmente conhecida como coagulação baseada em superfícies de contato e geralmente ocorre em células que expressam o fator tecidual (FT) (via extrínseca). Na fase de iniciação da coagulação sobre uma superfície de contato, a partir de uma lesão, o FT é exposto e entra em contato com o Fator VII fazendo a sua ativação e formando um potente composto formado pelo FT e o Fator VII ativado (FT:VIIa), o qual ativa o Fator IX (FIX) e o Fator X (FX). O FX por sua vez se liga ao FV para ativar as protrombinases e, assim, dar início à formação do coágulo sobre a célula que expressa FT (Ferreira *et al.*, 2010).

A via de contato (via intrínseca) por sua vez é iniciada através do contato do sangue em uma superfície artificial onde muda a conformação do Fator XII (FXII). Este por sua vez tem a função de ativar a pré-caliceína plasmática (PK) e o

cininogênio de alto peso molecular (HK). A PK possui também a capacidade de converter FXII em FXIIa criando uma alça de ativação positiva (Smith *et al.*, 2015).

O FXIIa também tem a capacidade de ativar o Fator XI e este por sua vez ativa o Fator X. A partir da ativação do Fator X, tanto na via do fator tecidual como na ativação por contato, são desencadeadas a formação de trombina, que, em concentração suficiente, irá imediatamente converter o fibrinogênio em um gel de fibrina (Colman, 1984; Geddings e Mackman, 2014; Smith *et al.*, 2015). Dessa forma, o coágulo é formado, o qual consiste de uma rede de filamentos de fibrina que se estende em todas as direções aprisionando células sanguíneas, plaquetas e plasma (Figura 2).

Para que não ocorra a coagulação excessiva, proteínas anticoagulantes controlam a formação da trombina. Uma vez formado o coágulo, o sistema fibrinolítico é ativado promovendo a dissolução da fibrina para restabelecer a fluidez do sangue dentro do vaso. A antitrombina é o inibidor natural da coagulação mais importante e possui atividade anticoagulante inibindo a trombina e outras proteinases da coagulação, como os fatores Xa, IXa, XIa, XIIa e a calicreína (Franco, 2001).

A proteína C possui um cofator, a proteína S, que são importantes controladores da coagulação, constituindo a chamada via da proteína C. A proteína C ativada requer proteína S, fosfolípidos e íons cálcio para exercer seu efeito anticoagulante. Outra função anticoagulante do complexo proteína C/S é estimular a ativação do sistema fibrinolítico pela ativação do ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) e inativação proteolítica de um inibidor do ativador do plasminogênio (PAI) (Joseph *et al.*, 2016). Deficiências na proteína C, S e antitrombina estão associadas à predisposição à trombose (Franco, 2001).

O sistema hemostático é regulado por uma inter-relação de proteínas pró-coagulante, anticoagulante e do sistema fibrinolítico encontrados no plasma. Um desbalanço nessas proteínas pode causar um estado pró-trombótico. Há uma evolução da compreensão dos mecanismos da hemostasia e trombose venosa e o papel da inflamação e imunidade (Koupenova *et al.*, 2017).

Figura 2. Representação esquemática da interação das vias de ativação da coagulação, regulação da via do fator tecidual pelo TFPI (Inibidor da via do Fator tecidual do inglês *tissue factor pathway inhibitor*), regulação pelas proteínas C e S, regulação do Fator XII pelo inibidor de C1 e da via final comum. Adaptado a partir de Guyton e Hall (2015).

Os COC podem influenciar no desbalanço dessas proteínas causando aumento da expressão de proteínas da coagulação, como por exemplo, o Fator XII e com isso o desenvolvimento do tromboembolismo venoso (TEV). O TEV é considerado a terceira causa mais comum de doenças cardiovasculares e pode ser desencadeado

através de três fatores: alteração no fluxo sanguíneo, geralmente por falta ou estase de fluxo; dano vascular endotelial podendo ser causado por cirurgias ou traumas; e alteração nos constituintes do sangue como um estado de hipercoagulabilidade hereditário ou adquirido como câncer ou o uso de COC (Ferreira, 2000; Haley e Bock, 2017)

Há um crescente interesse no entendimento das interações entre inflamação e hipercoagulabilidade, bem como entre inflamação e disfunção endotelial. Durante a inflamação há o aumento na produção de fatores pró-coagulantes e uma regulação negativa de fatores anticoagulantes, bem como inibição da atividade fibrinolítica (Poredos, 2017), aumentando assim a susceptibilidade do desenvolvimento do tromboembolismo.

A inflamação pode causar um desbalanço na hemostasia através de diferentes vias, dentre elas a via do fator tecidual. O fator tecidual, que é uma glicoproteína de membrana responsável por iniciar a via extrínseca da coagulação, ela está presente em monócitos, células endoteliais e células musculares lisas arteriais. Citocinas inflamatórias como por exemplo Interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) possuem a capacidade de diminuir a expressão de fatores anticoagulantes, fazendo aumentar o estado de hipercoagulabilidade favorecendo então o risco aumentado do desenvolvimento do tromboembolismo venoso (Tamaki e Khasnis, 2015).

Na inflamação sistêmica, há ativação simultânea da coagulação, fibrinólise e do sistema complemento. Estes sistemas interagem entre si em particular pela similaridade das propriedades das suas serinas proteases. Como resultado, seus componentes estabelecem uma rede complexa de eventos ao longo destas

cascatas, que resulta numa intrincada rede de comunicação entre elas relevante para a homeostase (Ekdahl *et al.*, 2016).

1.3 Sistema Complemento

O sistema complemento é um dos principais sistemas fisiológicos relacionados com a hemostasia e a inflamação. Considerando o notório efeito dos CHC sobre a hemostasia, pouco é investigado sobre o efeito desses no SC. O SC consiste em mais de 30 proteínas presentes na forma solúvel no sangue ou como proteínas associadas às membranas celulares. A ativação do complemento leva a uma reação enzimática de cascata resultando na formação de potentes anafilatoxinas C3a e C5a, as quais promovem uma série de respostas fisiológicas que variam de quimiotaxia a apoptose. Inicialmente, o papel principal atribuído ao SC era montar uma resposta rápida e robusta contra patógenos invasores. Atualmente, sabe-se que o SC também desempenha papel importante na imunidade adaptativa, envolvendo células T e B na eliminação de patógenos e na manutenção da memória imunológica (Merle *et al.*, 2015). Adicionalmente, o SC também está envolvido nos mecanismos de regeneração de tecidos, crescimento tumoral e na fisiopatologia de várias doenças (Sarma e Ward, 2011).

Há três vias descritas para a ativação do complemento: a via clássica (VC), a via alternativa (VA) e a via das lectinas (VL) (Figura 3). Estas vias envolvem componentes iniciais diferentes, mas a partir da sua ativação todas convergem para um ponto comum, a formação da C3 convertase, um complexo enzimático, capaz de clivar o C3, o componente central do SC. As moléculas geradas ao longo da cascata de ativação do SC são responsáveis por mediar as atividades biológicas deste

sistema e, assim, contribuir para a imunidade contra patógenos, inflamação, produção de anticorpos, regeneração de tecidos e regulação da homeostase (Sarma e Ward, 2011).

Figura 3: Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento e suas funções efetoras. C1inh, Inibidor de C1; MBL, Lectina ligadora de manose; MASP, serina protease associada à MBL. Adaptado de Ghebrehiwet (2016).

Apesar da importância biológica do SC, a ativação exacerbada deste sistema pode resultar em efeitos deletérios para o organismo. Normalmente tais efeitos não ocorrem porque o SC é altamente regulado por proteínas presentes nas membranas celulares e por componentes fluidos. Dentre estas proteínas, o inibidor de C1 (C1inh,

do inglês *C1inhibitor*) é o regulador do SC mais estudado. O C1inh é um inibidor de serina protease que controla a ativação da via clássica e da via das lectinas. Na VC, o C1inh liga-se ao complexo C1, promove a dissociação dos componentes C1r e C1s, impedindo a ativação destes. O C1inh também inativa as serinas proteases associadas à lectina ligadora de manose (MASP-1 e MASP-2, do inglês *mannose-binding protein-associated serine protease*), inibindo a ativação da VL. Como resultado da atividade do C1inh não há formação das C3 convertases das VC e VL, regulando a cascata de ativação do SC. A rede de comunicações entre o SC e a hemostasia é fomentada em grande parte pela atividade do C1inh que também inibe os fatores XII e IX da coagulação (Etmthaller *et al.*, 2011).

O SC e a hemostasia têm implicações clínicas importantes no contexto da lesão tecidual e da inflamação. Embora esses sistemas tenham sido descritos como cascatas separadas, ambos pertencem a uma complexa rede inflamatória e exibem algumas características similares e comuns em relação às funções de seus ativadores e inibidores. Em particular, o C1inh e as proteínas C e S (Amara *et al.*, 2010).

Várias interações entre o SC e a hemostasia têm sido propostas, embora ainda não completamente elucidadas (Amara *et al.*, 2008). Atenção especial é dada ao angioedema tipo III observado na terapia de reposição hormonal com estrogênio (Binkley e Davies III, 2000; 2004; Bork *et al.*, 2003; 2006; Joseph, 2015). O estrogênio pode precipitar ataques de angioedema, enquanto o progestagênio pode ser protetor (Kaplan e Joseph, 2010).

O Fator XII ativado (FXIIa) da coagulação pode ativar o componente C1r do complemento e iniciar a ativação da VC. O C1inh controla negativamente as 3 vias de ativação do SC e também a via intrínseca da coagulação (a calicreína e o FXIIa)

(Davis III *et al.*, 2008). Desta forma, na ausência da ação regulatória do C1inh, pode ocorrer uma geração maciça de bradicinina, que é um forte indutor de vasodilatação e de permeabilidade vascular, levando às reações de edema observadas no angioedema (Nussberger *et al.*, 2002; Agostoni *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2015). Assim, o Fator XII tem sido um forte candidato para o angioedema tipo III por duas razões: a) a atividade proteolítica do Fator XII está envolvida na geração de cininas, a qual aumenta a permeabilidade vascular e estimula a formação de edema e b) a expressão do Fator XII e os seus níveis plasmáticos são regulados pelo estrogênio (Farsetti *et al.*, 1995).

Vale ressaltar que vários autores têm observado aumento do fator XII da coagulação e diminuição da proteína S em mulheres que usam COC (Rosing *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2001) ou estão sob terapia de reposição hormonal com estrogênio (Gordon *et al.*, 1988). Um estudo preliminar observou aumento da atividade hemolítica da via clássica do complemento sérico em mulheres usando COC, sugerindo uma ausência de regulação desta via (Beretella *et al.*, 2005).

Nosso grupo descreveu um papel modulador do COC com LNG sobre o sistema complemento (Bertozi *et al.*, 2011). Usuárias de COC contendo LNG apresentaram níveis séricos do C1inh significativamente elevados quando comparados ao grupo de não usuárias. Este aumento do C1inh sérico relacionou-se com a diminuição da atividade hemolítica das vias clássica VC/VL do SC, que pode estar mais lenta por aumento da inibição do C1 nestas vias. Além disso, esse grupo apresentou diminuição do fragmento C4d (produto da ativação das VC/VL). Uma vez que o C1inh regula C1 e C4 (Kaplan e Joseph, 2010), a diminuição dos níveis de C4d pode ser devido ao maior nível deste inibidor neste grupo. Para a análise da via

alternativa (VA) não se observou diferenças. Os resultados para a VA estão de acordo com a literatura que associam as principais interações moleculares do SC e da coagulação com a regulação mediada pelo C1inh, envolvendo principalmente a VC do SC (Binkley, 2010). Ainda que a literatura tenha apontado para interações moleculares entre o SC e a hemostasia, demonstrando a participação das serinas proteases, comuns a ambas as vias, na clivagem de C3 e C5, o FXIIa foi a mais eficiente de todas (Amara *et al.*, 2010). Considerando-se que o FXII é regulado pelo C1inh, a interação com a VC parece ser mais óbvia.

1.4 Moléculas de Adesão

A molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, molécula de adesão vascular (VCAM)-1 e E-selectina são marcadores de ativação endotelial e de inflamação. As moléculas de adesão são proteínas responsáveis pela captura, fixação e transferência de leucócitos do endotélio para o sítio de inflamação (Wright *et al.*, 2014).

No início da adesão ao endotélio, onde ocorre a captura dos leucócitos, há interações de glicoproteínas expressas nos leucócitos (L-selectinas), no endotélio lesionado (E-selectinas e P-selectinas) e também nas plaquetas (P-selectinas), capazes de interagir com ligantes glicosilados. Logo após, os leucócitos rolam sobre o endotélio, numa etapa mediada também por L-selectinas e P-selectinas e seus ligantes glicosilados. Então, os leucócitos rolam sobre o endotélio, por interações com as $\beta 1$ e $\beta 2$ integrinas e seus respectivos ligantes, onde há um aumento da adesão e achatamento dos neutrófilos no endotélio (Rose *et al.*, 2007; Borregaard, 2010).

Quando as integrinas dos neutrófilos interagem com seus respectivos ligantes no endotélio, VCAM-1 e ICAM-1 ativam as células endoteliais, o que facilita a migração dos neutrófilos (Borregaard, 2010).

O estrógeno presente nos COC exerce efeitos benéficos sobre o endotélio, reduzindo a expressão das moléculas de adesão responsáveis pelas interações do endotélio com os leucócitos (De Caterina *et al.*, 1995; Naftolin, 2016). Enquanto que o progestógeno promove o aumento dos níveis de moléculas de adesão (Miyagawa *et al.*, 1997). O nosso grupo também investigou os níveis de moléculas de adesão no soro de usuárias de COC (Stocco *et al.*, 2012) e observou-se redução dos níveis de moléculas de adesão no soro de usuárias de COC contendo LNG, o que sugere um efeito protetor deste COC em relação a drospirenona (DRSP).

Ainda sobre as associações dos estrógenos e progestógenos nos COC, estudos epidemiológicos mostram que o efeito do primeiro é modulado pelo tipo de progestógeno associado (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2009). Em particular, ao estrógeno tem sido apontado um papel protetor do endotélio contra tromboembolismo (De Caterina *et al.*, 1995), enquanto o progestógeno exerce um efeito contrário por aumentar a expressão de moléculas de adesão (Miyagawa *et al.*, 1997). Embora certo número de progestógenos tenha sido introduzido na prática clínica desde o advento dos COC, o estrógeno utilizado, o etinilestradiol (EE), manteve-se predominante.

Sendo o SC um importante mediador inflamatório e considerando que a inflamação e a coagulação compartilham de mecanismos regulatórios, o equilíbrio e a interação entre estes sistemas têm levado ao crescente interesse na investigação e monitoramento da atividade do complemento em diversas condições clínicas

(Mollnes *et al.*, 2007, Etmthaller *et al.*, 2011; Oikonomopoulou *et al.*, 2012; Ekdahl *et al.*, 2016; Ghebrehiwet, 2016)

Objetivos

2.1 Geral

Estudar o efeito dos COC, EE/LNG e E2/NOMAC, sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis.

2.2 Específicos

- a) avaliar a atividade hemolítica sérica da VC do sistema complemento;
- b) avaliar o efeito dos componentes individuais dos COC sobre a atividade hemolítica do sistema complemento;
- c) avaliar a ativação da VL do sistema complemento;
- d) determinar a concentração sérica do fragmento C4d, produto da ativação das VC/VL;
- e) determinar a concentração sérica e a atividade do C1inh;
- f) determinar a concentração sérica das moléculas de adesão: ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina;

Conclusões

EE/LNG e E2/NOMAC têm efeitos sobre a atividade do sistema complemento.

O efeito dos COC, EE/LNG e E2/NOMAC, sobre a atividade do sistema complemento é distinto entre eles, cada qual influencia parâmetros distintos.

E2/NOMAC aumenta a expressão da molécula de adesão E-selectina.

E2/NOMAC tem mais efeitos sobre o conjunto de parâmetros estudados, atividade do sistema complemento e moléculas de adesão, quando comparado ao EE/LNG.

Referências Bibliográficas

Agostoni A, Aygören-Pürsün E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L *et al.*, Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2004 Sep;114:S.51-131. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356535>.

Alsina JC. After 50 years of ethinylestradiol, another oestrogen in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2010 Feb;15:1-3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20136565>.

Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F *et al.*, Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 2008;632:71-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19025115>.

Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B *et al.*, Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol* 2010 Nov;185:5628-36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870944>.

Basaraba CN, Westhoff CL, Pike MC, Nandakumar R, Cremers S. Estimating systemic exposure to levonorgestrel from an oral contraceptive. *Contraception* 2016 Dec;7824(16):30545-5 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28041990>.

Bastianelli C, Farris M, Rosato E, Brosens I, Benagiano G. Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives: 1. Effects on metabolism. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2017 Mar;10(3):315-26 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27977304>.

Beretella JCR, Casarini KC, Martelli OM, Azzolini AECS, Lucisano-Valim YM, Marzocchi-Machado CM. Hemolytic activity of the serum complement in women using oral contraceptives. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005 ; 41 295.

Bertozi RI. Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento. 2011. 62f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Bertozi RI, Landi-Librandi AP, Stocco B, Azzolini AECS, Franceschini SA, Pereira-Crott LS *et al.*, Modulation of classical complement pathway associated with increase of the procoagulant factors by hormonal contraceptive using. *Molecular Immunology* 2011 Jul;48(14):1690. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589011005050>.

Bilgir O, Kebapcilar L, Taner C, Bilgir F, Kebapcilar A, Bozkaya G. The effect of ethinylestradiol (EE)/cyproterone acetate (CA) and EE/CA plus metformin treatment on adhesion molecules in cases with polycystic ovary syndrome. *Internal Med* 2009 Jul;48:1193–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602786>.

Binkley KE, Davis III AE. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2000 Sep;106:546-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984376>.

Binkley KE, Davis III AE. Estrogen-dependent and estrogen-associated inherited angioedema (previously HAE III). *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004;114: S62-S64.

Binkley KE. Factor XII mutations, estrogen-dependent inherited angioedema, and related conditions. *Allergy Asthma and Clin Immunol*. 2010 Jul;6(1):16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667119>.

Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Büller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995 Dec;346(8990):1593-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7500751>.

Bork K, Fischer B, Dewald G. Recurrent episodes of skin angioedema and severe attacks of abdominal pain induced by oral contraceptives or hormone replacement therapy. *Am J Med* 2003 Mar;114(4):294-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681457>.

Bork K. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor activity including hereditary angioedema with coagulation factor XII gene mutations. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006 Nov;26(4):709-24. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085286>.

Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunol* 2007 Aug;28(8):340-5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627888>.

Burke A. Nomegestrol acetate-17b-estradiol for oral contraception. *Patient Prefer Adherence* 2013 Jun;7:607–19. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836965>.

Burkman R, Bell C, Serfaty D. The evolution of combined oral contraception: improving the risk-to-benefit ratio. *Contraception* 2011 Jul;84(1):19-34. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664507>.

Christin-Maitre S, Laroche E, Bricaire L. A new contraceptive pill containing 17b-estradiol and nomegestrol acetate. *Womens Health (Lond)* 2013 Jan;9(1),13–23. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241152>.

Cichon S, Martin L, Hennies HC, Müller F, Van Driessche K, Karpushova A, *et al.*, Increased activity of coagulation factor XII causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 2006 Dec;79(6):1098-104. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186468>.

Cid MC, Schnaper HW, Kleinman HK. Estrogens and the vascular endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 2002 Jun;966:143-57. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114268>.

Colman RW. Surface-mediated defense reactions: the plasma contact activation system. *J Clin Invest* 1984 May; 73(5):1249-53. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6371055>.

Cowley HC, Heney D, Gearing AJ, Hemingway I, Webster NR. Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit Care Med* 1994 Apr; 22(4):651–7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511496>.

Davis III AE, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb. Haemost* 2010 Nov;104(5):886–93. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806108>.

Davis III AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 2008 Oct;45(16):4057–63. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674818>.

de Bastos M, Stegeman BH, Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A, Helmerhorst FM, Stijnen T, *et al.*, Combined oral contraceptives: venous thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014 Mar;(3):CD010813 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24590565>.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone Jr MA, *et al.*, Nitric oxide decrease cytokine induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995 Jul;96(1):60–8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542286>.

Delâge JM, Lehner-Netsch G, Brisson J. The classical and alternate pathways of complement in oral contraceptive users. *Contraception* 1987 Dec;36(6):627-32. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3446439>.

Dhont M. History of oral contraception. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2010 Dec;15(S2):S12-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21091163>.

Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Safe anticoagulation when heart and lungs are "on vacation". *Ann Transl Med* 2015 May;3(Suppl 1):S11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26046056>.

Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 2011 Mar-Apr;17(3-4):317-29. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046060>.

Ekdahl KN, Teramura Y, Hamad OA, Asif S, Duehrkop C, Fromell K *et al.*, Dangerous liaisons: complement, coagulation, and kallikrein/kinin cross-talk act as a linchpin in the events leading to thromboinflammation. *Immunol Rev* 2016 Nov;274(1):245-69. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27782319>.

Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res* 2004;114(5-6):321-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507261>.

Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, *et al.*, Molecular basis of estrogen regulation of the Hageman factor WII gene expression. *Endocrinology* 1995 Nov;136(11):5076-83. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7588244>.

Ferrari S, Piacenti I, Napolitano A, Cagnacci A. Pharmacological, metabolic and clinical aspects of new oral contraceptive associations containing natural estrogens. *Minerva Ginecol.* 2014 Feb;66(1):91-102. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569408>.

Ferreira AC, Montes MB, Franceschini SA, Toloi MR. Efeitos do contraceptivo oral contendo 20 µg de etinilestradiol e 150 µg de desogestrel sobre os sistemas de coagulação e fibrinólise. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2000;22(2):77-87. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842000000200004>.

Ferreira AC, Montes MB, Franceschini SA, Toloi MR. Effects of two oral contraceptives, containing 30 or 20 µg of ethinyl estradiol in combination with gestodene, on blood coagulation and fibrinolysis in Brazilian women. *Int J Fertil Womens Med.* 2001 Sep-Oct;46(5):265-70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720199>.

Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, Carvalho MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(5):416-421. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000500016.

Ferriani VP, Barbosa JE, de Carvalho IF. Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children. *Acta Paediatr.* 1999 Oct;88(10):1062-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10565449>.

Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*, 34: 229-237, jul./dez. 2001. Disponível em: http://revista.fmrp.usp.br/2001/vol34n3e4/fisiologia_coagulacao.pdf.

Gaussem P, Alhenc-Gelas M, Thomas JL, Bachelot-Loza C, Remones V, Ali FD, *et al.*, Haemostatic effect of a new combined oral contraceptive, nomegestrol acetate/17β-estradiol, compared with those of levonorgestrel/ethinyl estradiol. *Thromb Haemost.* 2011 Mar;105(3):560-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21225090>.

Geddings JE, Mackman N. Recently Identified Factors that Regulate Hemostasis and Thrombosis. *Thromb Haemost.* 2014 April ; 111(4): 570–74. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4080798/>.

Gerrits MG, Schnabel PG, Post TM, Peeters PA. Pharmacokinetic profile of nomegestrol acetate and 17β-estradiol after multiple and single dosing in healthy women. *Contraception* 2013 Feb;87(2):193-200. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898360>.

Ghebrehiwet B. The complement system: an evolution in progress. *F1000Res* 2016 Dec 12;5:2840. eCollection 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27990282>.

Gialeraki A, Valsami S, Pittaras T, Panayiotakopoulos G, Politou M. Oral Contraceptives and HRT Risk of Thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2016 Jan;1076029616683802. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28049361>.

Golnarnik G, Mashayekhi F, Saedi HS. The E-selectin S149R polymorphisms in breast cancer in a northern Iran population. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016 Jan;62(1):34-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26828984>.

Gore AC. Neuroendocrine systems. In: Squire L, Berg D, Bloom F, du Lac S, Ghosh A, Spitzer N, editors. *Fundamental neuroscience*. 3rd ed. Canadá: Academic Press; 2008. p. 918-23

Gordon EM, Williams SR, Frenck B, Mazur CA, Speroff L. Dose dependent effects of postmenopausal oestrogen and progestin on antithrombin III and factor XII. *J Lab Clin Med* 1988 Jan;111(1):52-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3335825>.

Haley JC, Bock C. Direct Oral Anticoagulants for Venous Thromboembolism: A Pharmacological Review. *AACN Adv Crit Care* 2017 Spring;28(1):5-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28254848>.

Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13a.ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.

Harboe M, Garred P, Borgen MS, Stahl GL, Roos A, Mollnes TE. Design of a complement mannose-binding lectin pathway-specific activation system applicable at low serum dilutions. *Clin Exp Immunol* 2006 Jun;144(3):512-20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16734621>.

Hebbar M, Révillion F, Louchez MM, Vilain MO, Fournier C, Bonnetterre J, *et al.*, The relationship between concentrations of circulating soluble E-selectin and clinical, pathological, and biological features in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998 Feb;4(2):373-80. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516925>.

Hiller-Sturmhöfel S, Bartke A. The Endocrine System: An Overview. *Alcohol Health Res World* 1998;22(3):153-64. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15706790>.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6th edition New York: Garland Science; 2007. p.59-82

Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myers MW, Vasilakis C. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* 1995 Dec;346(8990):1589-93. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7500750>.

Joseph K, Tholanikunnel BG, Wolf B, Bork K, Kaplan AP. Deficiency of plasminogen activator inhibitor 2 in plasma of patients with hereditary angioedema with normal C1 inhibitor levels. *J Allergy Clin Immunol* 2016 Jun;137(6):1822-29. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26395818>.

Kang SA, Blache CA, Bajana S, Hasan N, Kamal M, Morita Y, *et al.*, The effect of soluble E-selectin on tumor progression and metastasis. *BMC Cancer*. 2016 May;16:331. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27220365>.

Kaplan A, Joseph K. The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010 Mar;104(3):193-204. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20377108>.

Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *BMJ* 2001 Jul;323(7305):131-4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463678>.

Kontogianni P, Zambirinis CP, Theodoropoulos G, Gazouli M, Michalopoulos NV, Flessas J, *et al.*, The impact of the stromal cell-derived factor-1–30 A and E-selectin S128R polymorphisms on breast cancer. *Mol Biol Rep* 2013 Jan;40(1):43-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23129313>.

Koupenova, M; Kehrel, BE; Corkrey, HA; Freedman, JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J* (2017) 38 (11): 785-791. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28039338>.

Kuhl H. Adverse effects of estrogen treatment: natural versus synthetic estrogens. In: Lippert T, Mueck A, eds. *Sex Steroids and the Cardiovascular System*. New York: Parthenon Publishing; 1998:201-210.

Kuhn W, al-Yacoub G, Fuhrmeister A. Pharmacokinetics of levonorgestrel in 12 women who received a single oral dose of 0.15 mg levonorgestrel and, after a washout phase, the same dose during one treatment cycle. *Contraception* 1992 Nov;46(5):443-54. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1458891>.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678-89. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717539>.

Maggi R, Cariboni AM, Marelli MM, Moretti RM, Andre V, Marzagalli M, *et al.*, GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Hum Reprod Update* (2016) 22 (3): 358-381. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26715597>.

Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* 2015 Jun;6:262. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26082779>.

Miyagawa K, Rosch J, Stanezyk F, Hermsmeyer K. Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* 1997 Mar;3(3):324-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9055861>.

Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007 Sep; 44(16):3838-49. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17768101>.

Naftolin F, Mehr H, Fadiel A. Sex Steroids Block the Initiation of Atherosclerosis. *Reprod Sci* 2016 Dec;23(12):1620-1625. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27821559>.

Nussberger J, Cugno M, Cicardi M. Bradykinin-mediated angioedema. *N Engl J Med* 2002 Aug 22;347(8):621-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12192030>.

Oikonomopoulou K, Ricklin D, Ward PA, Lambris JD. Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012 Jan;34(1):151-65. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811895>.

Özdemir HH, Hasan H. Varol S, Akıl E, Acar A, Demir CF. Evaluation of cerebral venous thrombosis secondary to oral contraceptive use in adolescents. *Neurol Sci* 2015 Jan;36(1):149-53. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092566>.

Palarasah Y, Skjoedt M, Vitved L, Andersen TE, Skjoedt K, Koch C. Sodium Polyanethole Sulfonate as an Inhibitor of Activation of Complement Function in Blood Culture Systems. *J Clin Microbiol* 2010 Mar;48(3):908-14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042630>.

Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Steffensen R, Jensenius JC. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J Immunol Methods* 2001 Nov;257(1-2):107-16.. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687244>.

Poredos P. Interrelationship between venous and arterial thrombosis. *Int Angiol*. 2017 Mar. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28263045>.

Prasad RN, Koh SC, Viegas OA, Ratnam SS. Effects on haemostasis after two-year use of low dose combined oral contraceptive with gestodene or levonorgestrel. *Clin Appl Thromb Hemost* 1999 Jan;5(1):60-70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725985>.

Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005:1-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16304352>.

Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, Christella M, Thomassen LG, Nicolaes GA. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study. *Lancet* 1999 Dec;354(9195):2036-40. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10636369>.

Roos A, Bouwman LH, Munoz J, Zuiverloon T, Faber-Krol MC, Fallaux-van den Houten FC, *et al.*, Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003 Jan;39(11):655-68. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493641>.

Rose DM, Alon R, Ginsberg MH. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* 2007 Aug;218:126-34. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624949>.

Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):227-35. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838815>.

Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, *et al.*, Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 2003 Dec;46 Suppl 1:S7-S16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670641>.

Shirure VS, Liu T, Delgadillo LF, Cuckler CM, Tees DF, Benencia F, *et al.*, CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015 Jan;308(1):C68-78. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339657>.

Simak J, De Paoli S. The effects of nanomaterials on blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28078811>.

Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015;50(4):326-36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018600>.

Stegeman BH, de Bastos M, Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A, Helmerhorst FM, Stijnen T, *et al.*, Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 2013 Sep;347:f5298. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030561>.

Stocco B, Fumagalli HF, Franceschini SA, Martinez EZ, Marzocchi-Machado CM, de Sá MF, *et al.*, Comparative study of the effects of combined oral contraceptives in hemostatic variables: an observational preliminary study. *Medicine (Baltimore)* 2015 Jan;94(4):e385. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25634167>.

Stocco B, Fumagalli HF, Franceschini SA, Martinez EZ, Marzocchi-Machado CM, Toloi MR. Drospirenone and levonorgestrel in combination with either 30 or 20 mcg ethinylestradiol reduce

soluble adhesion molecules in Brazilian women; cross-sectional study. *Contraception* 2012 Nov;86(5):506-10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554799>.

Tamaki H, Khasnis A. Venous thromboembolism in systemic autoimmune diseases: A narrative review with emphasis on primary systemic vasculitides. *Vasc Med* 2015 Aug;20(4):369-76. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750012>.

Tchaikovski SN, van Vliet HA, Thomassen MC, Bertina RM, Rosendaal FR, Sandset PM, *et al.*, Effect of oral contraceptives on thrombosis generation measures via calibrated automated thrombography. *Thromb Haemost* 2007 Dec;98(6):1350-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18064335>.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) *Hum Reprod* 2004 Jan;19(1):41-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688154>.

Thorbjarnardottir T, Olafsdottir EJ, Valdimarsdottir UA, Olafsson O, Tryggvadottir L. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A cohort study of 16 928 women 48 years and older. *Acta Oncol* 2014 Jun;53(6):752-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460068>.

van den Heuvel MW, van Bragt AJ, Alnabawy AK, Kaptein MC. Comparison of ethinylestradiol pharmacokinetics in three hormonal contraceptive formulations: the vaginal ring, the transdermal patch and an oral contraceptive. *Contraception* 2005 Sep;72(3):168-74. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102549>.

van Hylckama Vlieg A, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP, Doggen CJ, Rosendaal FR. The venous thrombotic risk of oral contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. *BMJ* 2009 Aug;339:b2921. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19679614>.

Vieira CS, Oliveira LCO, Sá MFS. Hormônios femininos e hemostasia. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* [online]. 2007;29(10):538-47. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032007001000008

Westhoff C, Kaunitz AM, Korver T, Sommer W, Bahamondes L, Darney P, *et al.*, Efficacy, Safety, and Tolerability of a Monophasic Oral Contraceptive Containing Nomegestrol Acetate and 17 β -Estradiol: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol* 2012 May;119(5):989-99. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525910>.

Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Oct;10(10):593-601. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914698>.

Witjes H, Creinin MD, Sundström-Poromaa I, Nguyen AM, Korver T. Comparative analysis of the effects of nomegestrol acetate/17 β -estradiol and drospirenone/ethinylestradiol on premenstrual and menstrual symptoms and dysmenorrhea. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2015;20(4):296-307. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712537>.

Yang LPH, Plosker GL. Nomegestrol Acetate/Estradiol In Oral Contraception. *Drugs* 2012 Oct;72(14):1917-28. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950535>.

Apêndices

Lista de soluções

CFD 5X		
Ácido dietilbarbitúrico	0,0155M	0,72g
Barbital sódico	0,0045M	0,23g
NaCl	0,725M	10,64g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,00415M	0,21g
CaCl ₂ Anidro	0,00125M	0,035g
Azida	0,005M	0,081g
H ₂ O estéril qsp		250mL

Acertar o pH para 7,2

Cloreto de Sódio 0,15 M (0,9%)	
NaCl [PM=58,44]	8,76g
Água deionizada qsp	1000mL

Autoclavar

Solução de Gelatina 2,5% em Cloreto de Sódio 0,15 M	
Gelatina	2,5 g
Solução de NaCl 0,15 M qsp.	100 mL

Aquecer o NaCl e juntar a gelatina. Deixar a 37°C.

PBS (Salina tamponada com fosfato) pH 7,4 (10x)	
NaCl	80,0g
KCl	2,0g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2,0g
Azida (opcional)	3,65g
Água deionizada estéril qsp	1000mL

Ajustar pH final para 7,4 a 25°C com HCl

Tampão de Coating (Via Lectinas)	
Na ₂ CO ₃	0,159g
NaHCO ₃	0,294g
Água deionizada qsp	100mL
Ajustar pH final para 9,6 com NaOH (se necessário)	
BSA 1% em PBS	
BSA	0,2g
PBS	20mL
PBS/Tween20 0,05%	
Tween20	0,1mL
PBS	200mL
Manana em tampão de coating	
Solução de Manana	100µL
Tampão de coating	10mL
SPS (Polyanetholesulfonic Acid Sodium)	
SPS	10mg
PBS	1mL
Tea-Ca ²⁺ -Mg ²⁺ (10X)	
CaCl ₂	83,2mg
MgSO ₄	620mg
Água deionizada qsp	500mL
Ajustar pH final para 7,4	

Tris-glicina-EDTA (Tampão estoque)		
Tris	23,6g	47,2g
Glicina	27,1g	54,2g
EDTA-Na	7,1g	14,2g
Azida Sódica	0,4g	0,8g
H2O estéril qsp	500mL	1000mL
Acertar o pH para 8,8		

Dados epidemiológicos das voluntárias do grupo Controle

Grupo Controle	Idade (anos)	IMC (kg)	Tempo sem uso de CHC (meses)	Dia do Ciclo
Controle 1	30	19,79	24	25
Controle 2	18	21,05	Nunca usou	13
Controle 3	35	23,57	96	14
Controle 4	22	25,64	4	37
Controle 5	24	20,55	Nunca usou	4
Controle 6	23	18,69	36	4
Controle 7	24	19,84	Nunca usou	8
Controle 8	33	21,11	5	8
Controle 9	22	21,38	Nunca usou	25
Controle 10	21	21,60	Nunca usou	9
Controle 11	36	21,46	96	30
Controle 12	31	22,04	60	21
Controle 13	29	26,64	96	16
Controle 14	23	22,84	Nunca usou	21
Controle 15	31	26,71	216	17
Controle 16	23	23,66	16	3
Controle 17	31	22,77	36	6
Controle 18	25	24,11	12	31
Controle 19	28	20,69	24	44
Controle 20	34	26,57	4	11
Controle 21	19	17,86	4	8

Dados epidemiológicos das voluntárias do grupo EE/LNG

Grupo EE/LNG	Idade (anos)	IMC (kg)	Tempo em uso de CHC (meses)	Dia do Ciclo
L1	35	22,89	180	2
L2	28	18,96	16	20
L3	22	24,28	10	3
L4	29	20,20	156	1
L5	19	23,88	24	20
L6	29	31,21	96	Não informado
L7	20	24,22	12	17
L8	24	22,19	48	5
L9	24	29,69	24	2
L10	31	38,10	60	4
L11	32	26,30	4	2
L12	25	22,04	132	29

Dados epidemiológicos das voluntárias do grupo E2/NOMAC

Grupo EE/LNG	Idade (anos)	IMC (kg)	Tempo em uso de CHC (meses)	Dia do Ciclo
N1	26	27,43	84	Não menstrua
N2	20	19,07	24	15
N3	41	21,01	228	19
N4	32	21,97	144	Não menstrua
N5	29	25,34	120	Não menstrua
N6	20	19,92	15	9
N7	35	32,16	12	Não menstrua
N8	38	29,06	6	Não menstrua

Anexos

Anexo A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 001/2016
kms

Ribeirão Preto, 7 de janeiro de 2016.

Ao pós-graduando
Carlos Eduardo Ferareze Mendonça
Orientadora: Profª. Drª. Cleni Mara Marzocchi Machado
FCFRP/USP

Prezados Pesquisadores,

Informamos que a emenda do projeto de pesquisa intitulado "ESTUDO COMPARATIVO DE CONTRACEPTIVOS ORAIS COMBINADOS SOBRE O SISTEMA COMPLEMENTO E MOLÉCULAS DE ADESÃO SOLÚVEIS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 295 - CAAE nº 11705012.3.0000.5403, foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 149ª Reunião Ordinária realizada em 17/12/2015.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Elisa Maria de Sousa Russo
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo B

CENTRO DE SAÚDE ESCOLA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 24 Março de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o pesquisador, Carlos Eduardo Ferareze Mendonça apresentou o projeto de Pesquisa intitulado: **"Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis"**, para apreciação recebendo o de acordo da Farmácia e da Ginecologia do CSE-FMRP-USP. A Direção Acadêmica de Ensino e Pesquisa do CSE-FMRP-USP, aguarda as questões éticas a serem apreciadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição proponente para que se autorize e inicie o desenvolvimento do mesmo.

Profa. Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima
Diretora Acadêmica de Ensino e Pesquisa
CSE-FMRP-USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado(orientadora)

Departamento de Análise Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas

Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto/USP

RUA TEREZINA, Nº 690 – SUMAREZINHO – CEP 14055-380 – RIBEIRÃO PRETO – SP FONE: (16) 3315-0000/0001 FAX: (16) 3315-0029
EMAIL: CSECUIABA@FMRP.USP.BR

Anexo C

TCLE– Contraceptivos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Senhora,

- Você está sendo convidada a participar em uma pesquisa que estuda o efeito de pílulas anticoncepcionais em algumas proteínas que defendem o nosso organismo contra micróbios.
- A sua participação é **voluntária**: você é livre para aceitar participar ou não.
- Para saber sobre a pesquisa, leia as explicações abaixo neste papel.
- Você poderá fazer qualquer pergunta para tirar suas dúvidas sobre a pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título da pesquisa: "Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis"

Pesquisadores Responsáveis: Carlos Eduardo Ferareze Mendonça, Prof^a. Dr^a. Cleni Mara Marzocchi Machado, Dr. Silvio Antônio Franceschini.

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Por que essa pesquisa está sendo feita?

No sangue existem proteínas que trabalham para defender o nosso corpo contra as doenças. Alguns exemplos dessas proteínas são as proteínas do sistema complemento e as proteínas conhecidas como moléculas de adesão. Algumas pílulas anticoncepcionais (também conhecidas como contraceptivos orais combinados) podem atrapalhar o trabalho das proteínas, que defendem o nosso corpo contra os micróbios e evitam as doenças.

Nesta pesquisa nós queremos estudar se o uso das pílulas anticoncepcionais também pode atrapalhar o trabalho das proteínas chamadas sistema complemento e moléculas de adesão.

Os resultados desta pesquisa podem ajudar a ciência a entender melhor os efeitos bons e ruins das pílulas anticoncepcionais e assim ajudar a produzir pílulas mais seguras para a saúde da mulher.

Como será feita a pesquisa?

- Você não poderá participar se estiver grávida e se for fumante.
- Você deverá estar há pelo menos três meses tomando a pílula anticoncepcional.
- Você não pode ter tomado anti-inflamatório há menos de sete dias ou qualquer outro medicamento.
- Se você puder e aceitar participar, você precisa:
 - assinar este papel em duas vias (uma para você e outra para os pesquisadores);
 - responder um questionário;
 - doar um pouco do seu sangue;
 - para doar o sangue, você deverá estar em jejum alimentar de 8-12h;
- Você doará dois tubos de sangue (20 mL = 2 colheres de sopa rasas). Nós vamos usar a parte líquida do sangue, o soro, que contém as proteínas que vamos estudar.
- Você fará parte do grupo de mulheres que tomam anticoncepcional.
- A colheita do sangue será realizada:
 - 1) no Laboratório da Profa. Cleni, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Via do Café s/n, Bloco R, sala 7, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP, Campus da USP; OU
 - 2) no Centro de Saúde Escola Cuiabá (se for o local onde você retira o seu contraceptivo);
- O sangue será retirado da veia, do mesmo jeito que se faz para exames de sangue.
- Você doará sangue apenas uma vez para a pesquisa, na terceira semana da sua cartela da pílula (próximo aos 21º - 23º dia).
- Quando a pesquisa terminar, se houver alguma sobra do seu sangue, ela não será guardada, ela será jogada fora.

Quais são os riscos que podem ocorrer?

Os riscos que poderão ocorrer são a formação de hematomas, que são manchas rôxas, e dor pela picada da agulha, o que normalmente não traz problemas para a pessoa. Para diminuir esse risco o sangue será colhido por uma pessoa experiente.

O que acontece se eu não aceitar participar?

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para você. Sua Página 1 de 2,
voluntária.

Você terá liberdade para desistir a qualquer momento durante a pesquisa. Ba Rubrica:
pelos telefones, que aparecem no final deste papel.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Ressaltamos, que a sua participação neste estudo não implicará custos a você, se necessário ofereceremos as passagens de ônibus de ida e volta. Após as colheitas de sangue você receberá um suco ou leite para quebrar o seu jejum alimentar. O único benefício será o de auxiliar-nos a estudar os efeitos bons e ruins das pílulas anticoncepcionais em algumas proteínas que defendem o nosso corpo contra micróbios.

Afirmamos que o seu nome e de todas as participantes serão guardados em segredo. Somente os resultados, sem os nomes, serão divulgados em revistas científicas.

Você poderá conhecer os resultados da pesquisa, caso seja de sua vontade.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones abaixo.

Favor ler e preencher abaixo, se for do seu consentimento

Eu, _____,

RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar voluntariamente desta pesquisa. Fui devidamente informada e esclarecida pelo pesquisador Carlos Eduardo Ferareze Mendonça sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e foi-me garantido o direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para a minha pessoa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__.

Nome e Assinatura da Participante

Carlos Eduardo Ferareze Mendonça
Pesquisador Responsável – CPF 358.492.988-19

Telefones e e-mails para contato dos Pesquisadores Responsáveis e do Comitê de Ética:

- Carlos Eduardo Ferareze Mendonça (cefm16@usp.br): 16-3315-0558 / 17-98135-5261
- Profª Drª Cleni Mara Marzocchi Machado (clenimar@usp.br): 16-3315-0558 / 16-98123-9718
- Dr. Silvio Antônio Franceschini (silvantfranc@yahoo.com.br)
- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP: (cep@fcfrp.usp.br) (16) 3315-4213.

Página 2 de 2.

Rubrica:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Senhora,

- Você está sendo convidada a participar em uma pesquisa que estuda o efeito de pilulas anticoncepcionais em algumas proteínas que defendem o nosso organismo contra micróbios.
- A sua participação é **voluntária**: você é livre para aceitar participar ou não.
- Para saber sobre a pesquisa, leia as explicações abaixo neste papel.
- Você poderá fazer qualquer pergunta para tirar suas dúvidas sobre a pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título da pesquisa: "Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis"

Pesquisadores Responsáveis: Carlos Eduardo Ferreze Mendonça, Profª Drª Cleni Mara Marzocchi Machado, Dr. Silvio Antônio Franceschini.

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Por que essa pesquisa está sendo feita?

No sangue existem proteínas que trabalham para defender o nosso corpo contra as doenças. Alguns exemplos dessas proteínas são as proteínas do sistema complemento e as proteínas conhecidas como moléculas de adesão. Algumas pilulas anticoncepcionais (também conhecidas como contraceptivos orais combinados) podem atrapalhar o trabalho das proteínas, que defendem o nosso corpo contra os micróbios e evitam as doenças.

Nesta pesquisa nós queremos estudar se o uso das pilulas anticoncepcionais também pode atrapalhar o trabalho das proteínas chamadas sistema complemento e moléculas de adesão.

Os resultados desta pesquisa podem ajudar a ciência a entender melhor os efeitos bons e ruins das pilulas anticoncepcionais e assim ajudar a produzir pilulas mais seguras para a saúde da mulher.

Como será feita a pesquisa?

- Você não poderá participar se estiver grávida e se for fumante.
- Você deverá estar há pelo menos três meses sem tomar pilulas anticoncepcionais.
- Você não pode ter tomado anti-inflamatório há menos de sete dias ou qualquer outro medicamento.
- Se você puder e aceitar participar, você precisa:
 - assinar este papel em duas vias (uma para você e outra para os pesquisadores);
 - responder um questionário;
 - doar um pouco do seu sangue;
 - para doar o sangue, você deverá estar em jejum alimentar de 8-12h;
- Você doará dois tubos de sangue (20 mL = 2 colheres de sopa rasas). Nós vamos usar a parte líquida do sangue, o soro, que contém as proteínas que vamos estudar.
- O seu sangue será usado como controle para comparar com o sangue das mulheres que tomam pilulas anticoncepcionais.
- O sangue será retirado da veia, do mesmo jeito que se faz para exames de sangue.
- A colheita do sangue será realizada no Laboratório da Profa. Cleni, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Via do Café s/n, Bloco R, sala 7, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP, Campus da USP;
- Você doará sangue apenas uma vez para a pesquisa, na terceira semana do seu ciclo menstrual (próximo aos 21º - 23º dia depois que desceu a menstruação).
- Quando a pesquisa terminar, se houver alguma sobra do seu sangue, ela não será guardada, ela será jogada fora.

Quais são os riscos que podem ocorrer?

Os riscos que poderão ocorrer são a formação de hematomas, que são manchas rôxas, e dor pela picada da agulha, o que normalmente não traz problemas para a pessoa. Para diminuir esse risco o sangue será colhido por uma pessoa experiente.

O que acontece se eu não aceitar participar?

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para você. Sua participação é voluntária.

Você terá liberdade para desistir a qualquer momento durante a pesquisa. Basta nos avisar pelos telefones, que aparecem no final deste papel.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Ressaltamos, que a sua participação neste estudo não implicará custos a você, se necessário ofereceremos as passagens de ônibus de ida e volta. Após as colheitas de sangue você receberá um suco ou leite para quebrar o seu jejum alimentar. O único benefício será o de auxiliar-nos a estudar os efeitos bons e ruins das pílulas anticoncepcionais em algumas proteínas que defendem o nosso corpo contra micróbios.

Afirmamos que o seu nome e de todos os participantes serão guardados em segredo. Somente os resultados, sem os nomes, serão divulgados em revistas científicas.

Você poderá conhecer os resultados da pesquisa, caso seja de sua vontade.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones abaixo.

Favor ler e preencher abaixo, se for do seu consentimento

Eu, _____,

RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar voluntariamente desta pesquisa. Fui devidamente informada e esclarecida pelo pesquisador Carlos Eduardo Ferareze Mendonça sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e foi-me garantido o direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para a minha pessoa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____.

Nome e Assinatura da Participante

Carlos Eduardo Ferareze Mendonça
Pesquisador Responsável – CPF 358.492.988-19

Telefones e e-mails para contato dos Pesquisadores Responsáveis e do Comitê de Ética:

- Carlos Eduardo Ferareze Mendonça (cefm16@usp.br): 16-3315-0558 / 17-98135-5261
- Prof^ª. Dr^ª. Cleni Mara Marzocchi Machado (clenimar@usp.br): 16-3315-0558 / 16-98123-9718
- Dr. Silvio Antônio Franceschini (silvantfranc@yahoo.com.br)
- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP: (cep@fcfrp.usp.br) (16) 3315-4213.

Anexo D

Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto

Via do Café, S/N - Telefone: (016) 3633-3036
Fax: (016) 3633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Título do projeto: "Estudo comparativo de contraceptivos orais combinados sobre o sistema complemento e moléculas de adesão solúveis"

QUESTIONÁRIO

Nome da Voluntária: _____

Data de nascimento: _____ Nacionalidade: _____

RG: _____ CPF: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

Qual a data de sua última menstruação? _____

Qual é o seu peso? _____

Qual a sua altura? _____

Você se alimenta regularmente, faz todas as refeições diárias? _____

Você come cereais, carne, frutas e legumes todos os dias? _____

Você faz exercícios físicos regularmente, pratica algum esporte? Quantas vezes na semana? _____

Você fuma? () sim () não Há quanto tempo? _____

Você toma anticoncepcionais hormonais? () sim () não

Qual o nome do anticoncepcional? _____

Há quanto tempo você toma anticoncepcional? _____

Há quanto tempo você toma este anticoncepcional? _____

Você toma este anticoncepcional sob orientação médica? () sim () não

Se você não toma anticoncepcional, já tomou anteriormente? () sim () não

Se tomou anteriormente, há quanto tempo está sem tomar anticoncepcional? _____

Você toma outros medicamentos? () sim () não

Quais são os outros medicamentos que você toma? _____

Você tomou algum medicamento nos últimos 15 dias? () sim () não

Você se lembra o nome do medicamento? _____

Você se lembra porque tomou este medicamento? _____

Você conhece alguém na sua família que já teve doenças causadas pela formação de coágulos nos vasos sanguíneos (entupimento dos vasos ou um problema chamado de trombose)? () sim () não Qual o grau de parentesco? _____