UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de formulações contraceptivas por parâmetros
hemostáticos, vasoativos e inflamatórios em cultura de
células endoteliais humanas**

Douglas Sousa Amaral

**Ribeirão Preto
2015**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Avaliação de formulações contraceptivas por parâmetros hemostáticos, vasoativos e inflamatórios em cultura de células endoteliais humanas

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: Douglas Sousa Amaral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Regina Torqueti

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 07/07/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

LOMBADA

AMARAL, D.S.	Avaliação de formulações contraceptivas por parâmetros hemostáticos, vasoativos e inflamatórios em cultura de células endoteliais humanas		MESTRADO FCFRPUSP 2015
-------------------------	---	--	---------------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Amaral, Douglas Sousa

Avaliação de formulações contraceptivas por parâmetros hemostáticos, vasoativos e inflamatórios em cultura de células endoteliais humanas. Ribeirão Preto, 2015.

151 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientador: Torqueti, Maria Regina.

1. Contraceptivos orais. 2. Células endoteliais. 3. Coagulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Douglas Sousa Amaral

Avaliação de formulações contraceptivas por parâmetros hemostáticos, vasoativos e inflamatórios em cultura de células endoteliais humanas

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. Maria Regina Torqueti

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à Maria C. Sousa Amaral (mãe), à Zenilton Pacheco Amaral (pai) e à Débora S. Amaral (irmã). “Minha família, meu bem maior”.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela luz e sabedoria, por me guiar por todos os caminhos percorridos e pela benção concedida por poder concluir este trabalho.

À minha mãe Maria do Carmo, pelo carinho, pela sabedoria, pelos conselhos dados, palpites, pelo amor de mãe sem igual e também pelo companheirismo. Por não ser somente a minha mãe, mas também a minha melhor amiga.

Ao meu pai Zenilton Amaral, que desde o começo me incentivou a estudar, batalhar e ter uma profissão. Um exemplo de seriedade e responsabilidade. Um conselheiro amigo e um fiel companheiro.

À minha irmã Débora Amaral, que em todas as horas me apoiou e sempre esteve ao meu lado, me dando uma amizade ímpar e um carinho sem igual.

À minha tia Neuza G. de Souza que sempre me teve não somente como um sobrinho querido, mas como seu filho. Agradeço à senhora tia pelo carinho, confiança e orgulho que sempre depositou em mim e por acreditar e desejar sempre o meu melhor. Nossos problemas ficam muito pequenos quando olhamos para trás e enxergamos os problemas dos outros.

À professora Maria R. Torqueti (minha orientadora). Pela confiança, pelo carinho de mãe e pela orientação. Por me incentivar e sempre acreditar no meu potencial. Por ter aberto as portas de seu laboratório de pesquisa. Pelos ensinamentos e pela experiência. Pelos momentos de descontração. Levarei comigo o aprendizado aonde quer que eu esteja.

Ao Jarryer De Martino, sempre presente; por me aconselhar, pelo carinho, pela confiança e por sempre ouvir meus desabaços e me mostrar os melhores caminhos a serem seguidos.

À Lilian Cataldi Rodrigues (fí). Além de amiga e companheira de almoços e cafés, me ensinou a pesquisar, me passou muito conhecimento e sempre me deu bons conselhos.

À Francine J. Bianchini pelo suporte técnico/científico e paciência. A Bianca Stocco e Caroline Bianchi pela amizade.

Ao Daniel Giuliano Cerri, pela amizade, pelos ensinamentos e pela assessoria científica.

À Camila M. Andrade pelo apoio e consultoria científica prestada em qualquer hora. Pela atenção a mim oferecida, pela paciência em me ensinar a manipular o cordão umbilical e pela nossa parceria ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Pela nossa amizade e pelo incentivo sem igual.

À Fernanda M. Rey por sempre se prontificar em me ajudar na obtenção do cordão umbilical. Pela atenção que sempre me ofereceu, pelo carinho e amizade.

À Tania Casare pelo carinho, amizade e por ceder o seu tempo para me auxiliar na execução técnica deste trabalho.

A mi amigo y hermano Argentino Duilio Hernan D. Martinez por decirme consejos con el castellano y todavia por la amistad incondicional.

A todos os professores da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia que passaram pelo meu caminho. Por todo o conhecimento transmitido e pelas dicas prestadas.

Aos funcionários da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia e em especial ao Henrique Teodoro, Rose e Rosana Florêncio, pelos esclarecimentos de minhas dúvidas com relação às normas do programa e por sempre estarem dispostos a me ajudar naquilo que fosse preciso.

À FAPESP, que através do auxílio financeiro na forma de fomento, tornou possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq e Capes pela concessão da bolsa de Mestrado.

À todos que de alguma forma, contribuíram direta e indiretamente para a execução desta pesquisa e que por motivos de esquecimento, venho através desta, consoante me justificar.

*“Ser grato é ter humildade suficiente para saber reconhecer
o papel do outro em nossa vida, independente da forma e
do meio”.*

(AMARAL, 2015).

Επίγραφε

“Aprender no sentido real da palavra é possível apenas nesse estado de atenção, em que não existe compulsão externa ou interna. O pensar correto pode surgir apenas quando a mente não está escravizada pela tradição e memória. É a atenção que permite que o silêncio chegue à mente, que é a abertura da porta para a criação. Por isso a atenção é da maior importância. O conhecimento é necessário no nível funcional como um meio de cultivar a mente, e não como um fim de si mesmo”.

▪ J . K r i s h n a m u r t i ▪

RESUMO (PORTUGUÊS)

AMARAL, D.S. **Avaliação de contraceptivos orais por parâmetros hemostáticos, vasoativos e inflamatórios em cultura de células endoteliais humanas.** 2015. 151f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Contraceptivos orais combinados (COCs) são largamente utilizados e bem aceitos para se obter a contracepção. Estima-se que mais de 100 milhões de mulheres ao redor do mundo fazem uso deste método contraceptivo. Embora seja alcançada a contracepção, estas usuárias estão predispostas ao desenvolvimento de tromboembolismo venoso (TEV) ou arterial (TEA), e ao desenvolvimento de aterosclerose, em virtude da alteração hemostática causada pela dose de estrógeno e tipo de progesterona utilizada nas formulações. Como forma de obter uma formulação dita “ideal” e na esperança de que os efeitos adversos que podem ocorrer em detrimento da composição da formulação contraceptiva sejam minimizados, a literatura aponta um contraceptivo recentemente lançado, cuja composição contém o Valerato de Estradiol (chamado de estrógeno natural pela indústria farmacêutica) como componente estrogênico e o Dienogest como progesterona sintética, integrando o grupo dos assim classificados novos progestágenos. OBJETIVO: Dentro do contexto que acima apresentamos, o projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar duas formulações contraceptivas, através de um estudo experimental comparativo, onde como grupo controle utilizamos o clássico Levonorgestrel (LVG) e Etinilestradiol (EE), para compará-lo com o novo progestágeno lançado no mercado brasileiro em 2011, composto por Dienogest (DNG) e Valerato de estradiol (17 β Estradiol – metabólito ativo) – ambos medicamentos isolados e em mistura, representados por MIX I (LVG+EE) e MIX II (DNG+17 β), respectivamente. Pelo fato de pouco se saber sobre os efeitos deste novo progestágeno sobre os fatores vasoativos, hemostáticos e inflamatórios, propusemos aqui trabalhar com cultura de células endoteliais extraídas de cordão umbilical humano, estimulá-las com agente inflamatório LPS e/ou TNF α para posteriormente dosar os seguintes fatores: em Célula Endotelial de Veia Umbilical Humana (HUVEC) - moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina (sobrenadante e superfície celular de HUVEC); fatores vasoativos derivados do endotélio (NO, Prostaglandina PGE₂ e Endotelina ET-1 – sobrenadante) e citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 no sobrenadante. Em Célula Endotelial de Artéria Humana (HAEC): Fator Tecidual. Os medicamentos reduziram a expressão de moléculas de adesão no sobrenadante e na superfície celular, regularam a produção de fatores vasoativos derivados do endotélio, reduziram a produção de citocinas pró-inflamatórias e reduziram também a expressão de fator tecidual, de maneira preventiva e terapêutica. A mistura dos contraceptivos representada por MIX I e MIX II apresentou diferenças significativas quando comparadas aos demais grupos de estudo e MIX II apresentou maior efetividade na redução de alguns fatores aqui estudados, conferindo uma proteção endotelial. Desta maneira, podemos concluir que o novo progestágeno lançado no mercado brasileiro apresentou efeitos antitrombóticos e anti-inflamatórios, por reduzir de maneira significativa os níveis de moléculas de adesão, fatores vasoativos, fatores pró-inflamatórios e fator hemostático.

Palavras-chave: 1.Contraceptivos, 2.Endotélio, 3.Coagulação, 4.Inflamação Vascular

ABSTRACT (ENGLISH)

AMARAL, D.S. **Evaluation of oral contraceptives for hemostatic, vasoactive and inflammatory parameters in human endothelial cells culture.** 2015. 151s. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Combined oral contraceptives (COCs) are widely used and well accepted to provide contraception. It's estimated that over 100 million women around the world make use of this contraceptive method. Although contraception is achieved, these users are predisposed to developing venous thromboembolism or arterial and development of atherosclerosis due to the change caused by the hemostatic dose of estrogen and progestin type used in the formulations. In order to get a said formulation "correct" and hoping that the adverse effects that may occur at the expense of the contraceptive formulation composition are minimized, the literature indicates a contraceptive recently launched, whose composition contains Estradiol valerate (called natural estrogen by the pharmaceutical industry) as estrogen component and the Dienogest as synthetic progesterone, integrating the group of so classified new progestins. **OBJECTIVE:** Within the context that we present above, the research project aimed to evaluate two contraceptive formulations, through a comparative experimental study, where as the control group used the classic Levonorgestrel (LVG) and ethinylestradiol (EE), to compare it with the new progestin released in Brazil in 2011, composed of Dienogest (DNG) and estradiol valerate (17 β Estradiol - active metabolite) - both alone and in combination medications, represented by MIX I (LVG plus EE) and MIX II (DNG plus 17 β), respectively. 'Cause little is known about the effects of the progestogen on the new vasoactive factors, hemostatic and inflammatory proposed here work with cultured endothelial cells derived from human umbilical cord stimulate them with LPS inflammatory agent and / or TNF α to further quantitate the following factors: HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) - adhesion molecules VCAM-I, ICAM-I and E-selectin (supernatant and cell surface); endothelium-derived vasoactive factors (NO, PGE₂ and Endothelin ET-1 - culture supernatant) and pro-inflammatory cytokines as IL-1 β and IL-6 in the supernatant. HAEC (Human Arterial Endothelial Cell): Tissue factor on primary cell culture of umbilical cord artery. The drugs reduced the expression of adhesion molecules in the supernatant and the cell surface reduced the production of endothelium-derived vasoactive factors, regulated the production of cytokines proinflammatory and also reduced the expression of tissue factor, preventive and therapeutic way. The mixture of contraceptives represented by MIX I and II showed significant differences when compared to the other study groups and MIX II showed greater effectiveness in reducing some factors studied here, giving an endothelial protection. Thus, we can conclude that the new progestogen released in Brazil showed antithrombotic effects and anti-inflammatory, to reduce significantly the levels of adhesion molecules, vasoactive factors, proinflammatory factors and hemostatic factor.

Keywords: 1.Contraceptives, 2.Endothelium, 3.Coagulation, 4.Vascular inflammation

RESUMEN (ESPAÑOL)

AMARAL, D.S. **Evaluación de anticonceptivos orales por parámetros hemostáticos, vasoactivos e inflamatorios en el cultivo de células endoteliales humanas.** 2015. 151h. Tesis (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Riberão Preto – Universidad de São Paulo, Riberão Preto, 2015.

Los anticonceptivos orales combinados (COCs) son ampliamente utilizados y aprobados para alcanzar la anticoncepción TRUSSEL, 2004. Se estima que más de 100 millones de mujeres alrededor del mundo hacen uso de este método anticonceptivo. Aunque la anticoncepción se logre, las usuarias son propensas a desarrollar tromboembolismo venoso (TEV) o arterial (TEA) y al desarrollo de aterosclerosis en virtud de la alteración hemostática causada por la dosis de estrógeno y el tipo de progesterona utilizada en las formulaciones. Con el fin de obtener una formulación “ideal” y a la espera de que los efectos adversos que puedan ocurrir en detrimento de la composición de la formulación anticonceptiva, la literatura apunta a un anticonceptivo recientemente lanzado, cuya composición contiene Valerato de Estradiol (conocido como estrógeno natural en la industria farmacéutica) como componente estrogénico y Dienogest como progesterona sintética, integrando el grupo de los denominados nuevos progestágenos. OBJETIVO: Dentro del contexto que estamos presentando, el proyecto de investigación tuvo como objetivo, evaluar dos formulaciones anticonceptivas, a través de un estudio experimental comparativo, en el cual como grupo de control utilizaremos el clásico Levonogestrel (LVG) y Etinilestradiol (EE) – grupo de control, y compararlo con el nuevo progestágeno lanzado al mercado brasileño en 2011, compuesto por Dienogest (DNG) y Valerato de Estradiol (17 β Estradiol – metabolito activo) – ambos medicamentos aislados y en mezcla, representados por MIX I (LVG+EE) e MIX II (DNG+17 β), respectivamente. A raíz del poco conocimiento que se tiene sobre los efectos de este nuevo progestágeno sobre los factores vasoactivos, hemostáticos e inflamatorios, propusimos trabajar con el cultivo de células endoteliales extraídas del cordón umbilical humano, estimularlas con el agente inflamatorio LPS y/o TNF α para posteriormente dosificar los siguientes factores - HUVEC: moléculas de adhesión VCAM-I, ICAM-I y E-Selectina (no sobrenadante y en la superficie celular); factores vasoactivos derivados del endotelio (NO, Prostaglandina PGE₂ y Endotelina ET-1 – no sobrenadante) y citosinas pro-inflamatorias IL-1 β y IL-6 no sobrenadante. En HAEC: Factor tecidual en la célula primaria de la arteria. Los medicamentos redujeron la expresión de moléculas de adhesión no sobrenadante y en la superficie celular, regularán la producción de factores vasoactivos derivados del endotelio, redujeron la producción de citosinas pro-inflamatorias, ET-1 y también redujeron la expresión del factor del tejido, de manera preventiva y terapéutica. La mezcla de anticonceptivos representada por MIX I y MIX II presentó diferencias significativas al ser comparadas con los otros grupos de estudio. Resaltamos que MIX II mostró efectividad en la reducción de los factores aquí estudiados, comprobando un carácter protector para el endotelio. Podemos concluir que el nuevo progestágeno lanzado al mercado brasileño exhibió efectos antitrombóticos y antiinflamatorios por reducir de manera significativa los niveles de moléculas de adhesión, factores vasoactivos, factores pro-inflamatorios y factor hemostático.

Palabras clave: 1.Anticonceptivos, 2.Endotelio, 3.Coagulación, 4.Inflamación vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo esquemático da cascata de coagulação.....	8
Figura 2: Modelo esquemático da geração de trombina.....	9
Figura 3: Esquema representativo da degradação da fibrina e do controle fibrinolítico.....	10
Figura 4: Modelo esquemático da complexa interação entre monócitos/macrófagos, plaquetas e células progenitoras que estão na base do processo aterotrombótico.....	13
Figura 5: Efeitos diretos do estrogênio sobre vasos sanguíneos.....	18
Figura 6: Etapas e fases que compõem o desenvolvimento da pesquisa.....	28
Figura 7: Histograma de imunofluorescência obtido após análise por citometria de fluxo, apresentando os resultados da imunofenotipagem para o percentual de expressão de CD 31 em HUVEC.....	40
Figura 8: Ensaio de MTT para os componentes farmacológicos.....	42
Figura 9: Dosagens da produção de sVCAM-I em células HUVEC.....	44
Figura 10: Dosagens da produção de sICAM-I em células HUVEC.....	46
Figura 11: Dosagens da produção de sE-Selectina em células HUVEC.....	48
Figura 12: Dosagens da produção de VCAM-I em células HUVECs por EIA modificado.....	50
Figura 13: Dosagens da produção de ICAM-I em células HUVECs por EIA modificado.....	52
Figura 14: Dosagens da produção de E-Selectina em células HUVECs por EIA modificado ...	55
Figura 15: Dosagem da produção de moléculas de adesão solúveis no sobrenadante de HUVEC – modelo terapêutico.....	58
Figura 16: Dosagem da produção de moléculas de adesão solúveis na superfície celular de HUVEC – modelo terapêutico.....	60
Figura 17: Dosagem da produção de moléculas de adesão solúveis no sobrenadante de HUVEC – modelo preventivo.....	62
Figura 18: Dosagem da produção de moléculas de adesão na superfície celular de HUVEC - modelo preventivo.....	64
Figura 19: Produção de IL-1 β no sobrenadante de HUVEC - modelo terapêutico e preventivo.....	66
Figura 20: Produção de IL-6 no sobrenadante de HUVEC - modelo terapêutico e preventivo.....	68

Figura 21: Produção de PGE_2 no sobrenadante de HUVEC - modelo terapêutico e preventivo	70
Figura 22: Produção de NO total no sobrenadante de HUVEC - modelo terapêutico e preventivo	72
Figura 23: Produção de ET-1 no sobrenadante de HUVEC - modelo terapêutico e preventivo	74
Figura 24: Dosagem dos níveis de Fator Tecidual (TF) total no sobrenadante de HAECS - modelo terapêutico e preventivo	77
Figura 25: Síntese de ET e sua regulação.....	93
Figura 26: Ativação da cascata de coagulação por fator tecidual	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão solúveis (sVCAM-I) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	45
Tabela 2 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão solúveis (sICAM-I) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	47
Tabela 3 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão solúveis (sE-Selectina) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	49
Tabela 4 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão ligadas à superfície celular (VCAM-I) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	51
Tabela 5 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão ligadas à superfície celular (ICAM-I) em HUVECs após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	53
Tabela 6 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão ligadas à superfície celular (E-Selectina) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	56
Tabela 7 - Resultados significativos ($p <0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão no sobrenadante (sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina) após estímulo prévio por LPS e posterior adição de fármacos isolados e agrupados. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	59
Tabela 8 - Resultados significativos ($p <0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão na superfície celular (VCAM-I e E-Selectina) e para ICAM-I, após estímulo prévio por LPS e posterior adição de fármacos isolados e agrupados. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	61
Tabela 9 - Resultados significativos ($p <0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão no sobrenadante (sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina) após tratamento prévio com fármacos isolados e agrupados por 24 horas, seguido de estímulo por LPS para produção de moléculas de adesão. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	63

Tabela 10 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão na superfície celular (VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina) após tratamento prévio com fármacos isolados e agrupados por 24 horas, seguido de estímulo por LPS para expressão de moléculas de adesão. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	65
Tabela 11 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de IL 1 β no sobrenadante de HUVEC de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	67
Tabela 12 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de IL 6 no sobrenadante de HUVEC de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	69
Tabela 13 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de PGE ₂ no sobrenadante de HUVEC de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	71
Tabela 14 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de NO sobrenadante de HUVEC de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	73
Tabela 15: Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de ET-1 no sobrenadante de HUVEC de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	75
Tabela 16 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de TF em lisado de cultura de HAEC de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A₂AP	A ₂ Antiplasmina
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância em Grupos)
ANVISA	Agência Nacional de vigilância Sanitária
CD+	Cluster of Differentiation
CE	Célula Endotelial
COC	Contraceptivo Oral Combinado
COX	Cicloxigenase
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCV	Doença Cardiovascular
DMSO	Dimetilsufóxido
DNG	Dienogest
et al.,	“entre outros”
E₂	Estradiol
E₂V	Valerato de Estradiol
E₃	Estriol
EE	Etinilestradiol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Enzima Ligada ao Ensaio Imunoabsorvente)
ET-1	Endotelina
sE-Selectina	E-Selectina solúvel
FDA	Food, Drug and Administration
FITCS	<i>Fluorescein Isotiocianate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)
HAEC	Human Arterial Endothelial Cell (Célula Endotelial de Artéria Humana)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell (Célula Endotelial de Veia Umbilical Humana)
ICAM	Intracellular Cell Adhesion Molecule (Molécula de Adesão Intracelular)
sICAM-I	Soluble Intracellular Cell Adhesion Molecule (Molécula de Adesão Intracelular Solúvel)
IL-1β	Interleucina 1 Beta

IL-6	Interleucina 6
LDLc	Low Density Lipoprotein cholesterol (Lipoproteína de Baixa Densidade – colesterol)
LPS	Lipopolissacarídeo Extracelular
LVG	Levonorgestrel
NaCl	Cloreto de Sódio
ng/mL	Nanograma por mL
NO	Óxido Nítrico
P0	Passagem 0 (zero)
P1	Primeira passagem
PAI-1	Inibidor do Ativador de Plasminogênio - tipo 1
PAI-2	Inibidor do Ativador de Plasminogênio - tipo 2
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Proteína C Reativa
PGE2	Prostaglandina E ₂
pg/mL	Picograma por mL
TAFI	<i>Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i> (Inibidor da fibrinólise Trombina Ativada)
TEV	Tromboembolismo Venoso
TF	<i>Tissue Factor</i> (Fator Tecidual)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
tPA	Ativador de Plasminogênio tecidual
TXA	Tromboxano
uPA	Ativador de Plasminogênio do tipo Uroquinase
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> (Molécula de Adesão Celular Vascular)
sVCAM-I	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> (Molécula de Adesão Celular Vascular Solúvel)
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i> (Fator de Permeabilidade Vascular)
μg	micrograma
μL	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	mais ou menos
$<$	menor
$>$	maior
$\leq$	menor/igual
$\geq$	maior/igual
©	copyright
®	marca Registrada
™	trademark
α	alfa
β	beta
°C	graus Celsius
=	igual

SUMÁRIO

RESUMO (PORTUGUÊS)	i
ABSTRACT (ENGLISH)	ii
RESUMEN (ESPAÑOL)	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
SUMÁRIO	xi
1. ESTADO DA ARTE	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Células Endoteliais e Fatores Vasoativos Derivados do Endotélio	5
2.2. Hemostasia	6
2.2.1. Coagulação	7
2.2.2. Fibrinólise	8
2.3. Disfunção Endotelial e Doença Cardiovascular	10
2.4. Tromboembolismo	13
2.5. Fator Tecidual e Trombose	14
2.6. Moléculas de Adesão e Processo Inflamatório na Aterosclerose	15
2.7. Os Efeitos do Estrógeno no Sistema Cardiovascular	17
3. JUSTIFICATIVA	20
3.1. Questão do Estudo	20
3.2. Hipótese Experimental	20
4. OBJETIVO GERAL	22
4.1. Objetivo Específico	22
5. MATERIAIS E METODOS	25
5.1. Comitê de Ética em Pesquisa com Animais e Seres Humanos	25
5.2. Delineamento do Estudo e Processo de Amostragem	25

5.3. Número Amostral	26
5.4. Coleta e Manipulação do Cordão Umbilical Humano.....	26
5.5. Protocolo de Pesquisa.....	27
5.5.1.Desenho do estudo.....	28
5.6. Concentrações Farmacológicas Utilizadas no Presente Estudo.....	29
5.7. Caracterização de Células Endoteliais (HUVEC) Através de Imunofenotipagem CD 31+ por Citometria de Fluxo	29
5.8. Depleção de Soro Fetal Bovino em Meio de Tratamento.....	30
5.9. Ensaio de Viabilidade Celular MTT para a Determinação das Concentrações Adequadas para os Tratamentos Farmacológicos	31
5.10. Padronização do Tempo de Estímulo por Lipopolissacarídeo Extra Celular (LPS) em Células Endoteliais (HUVEC) para a Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina	32
5.11. Quantificação da Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina no Sobrenadante da Cultura de HUVEC Durante Padronização por LPS.....	32
5.12. Quantificação da Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina Ligadas à Superfície Celular de HUVEC Durante Padronização por LPS.....	33
5.13. Quantificação da Produção de Interleucina 1 β e Interleucina 6 no Sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais (HUVEC) para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos	34
5.14. Quantificação da Produção de Endotelina no Sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais (HUVEC) para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos....	34
5.15. Quantificação da Produção de Prostaglandina no Sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais (HUVEC) Para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos....	35
5.16. Quantificação da Produção de Óxido Nítrico no sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais Para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos	36
5.17. Obtenção de Células HAEC e Dosagem de Fator Tecidual através de estímulo por TNF α em Lisado de Cultura de Células para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos	37
5.18. Análises Estatísticas.....	37
6. RESULTADOS.....	40
6.1. Caracterização de Células Endoteliais Através de Imunofenotipagem CD31+ Por Citometria de Fluxo	40

6.2. Ensaio de Viabilidade Celular MTT para Determinação das Concentrações Adequadas para os Tratamentos Farmacológicos, LPS e Curva de Concentração de DMSO.....	41
6.3. Padronização do Tempo de Estímulo por Lipopolissacarídeo Extra Celular (LPS) em HUVEC para Determinar a Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina no Sobrenadante e na Superfície Celular	43
6.3.1. Padronização do estímulo por LPS em HUVECs para produção de sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina solúveis no sobrenadante através da técnica de ELISA	43
6.3.2. Padronização do estímulo por LPS em HUVECs para produção de VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina ligadas à superfície celular através da técnica de EIA modificado	49
6.4. Avaliação do Efeito Terapêutico e Preventivo Derivado de Contraceptivos Orais Combinados Isolados e Misturados (MIXs) Sobre as Culturas de Células Endoteliais Extraídas de Cordão Umbilical Humano.....	57
6.4.1. Avaliação terapêutica dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC através de ELISA no sobrenadante e EIA na superfície celular sobre a expressão de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina.....	57
6.4.2. Avaliação preventiva dos hormônios isolados e misturados (MIXs) em HUVECs através de ELISA no sobrenadante e EIA na superfície celular sobre a regulação da expressão de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina.....	61
6.4.3. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de IL 1 β	65
6.4.4. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de IL 6.....	67
6.4.5. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	69
6.4.6. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	71
6.4.7. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de endotelina (ET-1).....	73
6.4.8. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e misturados (MIXs) na expressão de fator tecidual em lisado de células HAEC	76
7. DISCUSSÃO.....	80
7.1. LPS Estimula Células Endoteliais.....	80
7.2. Contraceptivos Orais Combinados Diminuíram a Expressão de Moléculas de Adesão sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina / VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina em HUVEC.....	82
7.3. Contraceptivos Orais Combinados Diminuíram a Produção de IL-1 β e IL-6 no Sobrenadante de Cultura de HUVEC.....	86

7.4. Contraceptivos Orais Combinados Regularam a Produção de Fatores Vasoativos Derivados do Endotélio: Aumentaram a Produção de PGE ₂ e Óxido Nítrico (NO) e Diminuíram a Produção de Endotelina (ET-1) em Cultura de HUVEC.....	89
7.5. Contraceptivos Orais Combinados Reduziram a Expressão de Fator Tecidual (TF) em Cultura de HAEC	94
8. CONCLUSÕES	99
9. REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICE I	113
ANEXO I	117
ANEXO II	119
ANEXO III	121

1. Estado da Arte

1. ESTADO DA ARTE

Contraceptivos orais combinados (COCs) são largamente utilizados e bem aceitos para se obter a contracepção. (TRUSSEL, 2004). A literatura aponta que mais de 100 milhões de usuárias ao redor do mundo fazem uso deste método. De acordo com NAPPI (2014),

[...] nos últimos 50 anos, os contraceptivos orais combinados tornaram-se uma forma bem aceita de controle de natalidade. Eles também tem sido objeto de considerável evolução com relação à dose e o tipo de estrogênio, progestinas e o regime utilizado. Todo este desenvolvimento tem sido impulsionado em parte para melhorar a tolerabilidade, atender às exigências das mulheres e proporcionar benefícios adicionais.

Os COCs contém uma combinação de estrógeno e progesterona. Desde a sua introdução na década de 60, várias progestinas foram sendo desenvolvidas a fim de amenizar os efeitos indesejados que os contraceptivos forneciam às suas usuárias (SITRUK, 2013).

Consequentemente, o componente estrogênico na formulação se manteve praticamente inalterado, tendo em vista que a grande maioria dos COCs continham etinilestradiol (EE) ou, mais comumente utilizado no passado, o Mestranol. O componente estrogênico dos COCs que é responsável por suprimir a produção do hormônio folículo estimulante é o estrógeno, o que fornece uma estabilidade endometrial e potencialização da atividade progestina. Em adição aos seus efeitos desejados sobre os órgãos reprodutivos, os estrógenos induzem a síntese de proteínas hepáticas, tais como fatores de coagulação e fibrinólise, angiotensinogênio, globulina de ligação do hormônio sexual (SHBG), globulina de ligação de cortisol e de lipoproteínas (WIEGRATZ et al., 2004).

Desde a sua introdução, os esforços têm sido feitos para melhorar a tolerabilidade dos COCs, para reduzir seus efeitos colaterais e alargar a escolha para as mulheres que utilizam este método como seu método de escolha para a alcançada contracepção. Pode-se destacar por exemplo, preocupações sobre efeitos adversos associados ao estrógeno, como tromboembolismo venoso (TEV),

os quais levaram a indústria farmacêutica a promover reduções progressivas na dose de EE utilizado em COCs, com a redução da concentração de EE nos COCs de 50 mcg para 30 mcg, resultando numa menor incidência de tromboembolismo venoso e arterial (TEA).

Segundo a última cartilha lançada pela *World Health Organization* (WHO) (Organização Mundial da Saúde - OMS) ao longo dos últimos 35 anos, houve significativos avanços tecnológicos no desenvolvimento de novos contraceptivos, incluindo as transições de alta dose para a baixa dose dos COCs¹. O desenvolvimento de contraceptivos hormonais contendo estrógenos naturais (isto é, estradiol [E₂], o qual é estruturalmente idêntico ao endógeno 17β-estradiol) tornou-se uma forma atrativa. E₂ é o mais potente estrógeno natural, sendo que este é o principal estrógeno secretado pelos ovários (SPEROFF e FRITZ, 2005). Dados preliminares de estudos clínicos com COCs baseados em estrógenos naturais (estriol [E₃], E₂, e valerato de estradiol [E₂V]) pareciam promissores em termos de seus efeitos sobre o metabolismo lipídico, os parâmetros da hemostasia (WIEGRATZ et al., 2004).

Atualmente, classificamos os COCs em diferentes gerações. Esta classificação se baseia na dose de estrógeno e no tipo de progesterona utilizado. Os contraceptivos de primeira geração contêm a Norethindrona, uma progesterona sintética, à qual continha de 2 a 5 vezes mais estrógeno e 10 vezes mais progesterona em relação às gerações atuais (PETITTI, 2003). A segunda geração conhecida por “gonanes” são as progesteronas mais potentes em inibir a ovulação, e, portanto, permitem o uso de uma dose menor deste medicamento. Exemplos desta geração de progestágenos incluem o Levonorgestrel e a Noretisterona.

O Levonorgestrel é uma das progesteronas com maior efeito androgênico (HAMMOND, RABE & WAGNER, 2001). As pílulas de terceira geração também são conhecidas por progestágenos Gonanes, como Desogestrel, Gestodeno e Norgestimato, as quais foram desenvolvidas para reduzir os efeitos colaterais. As progesteronas de quarta geração apresentam na sua formulação a Drospirenona como componente progestagênico, e o Dienogest, recentemente lançado, integra o grupo dos assim classificados novos progestágenos (GUIDA et al., 2010).

¹ Informação retirada da cartilha **Medical eligibility criteria for contraceptive use. A WHO family planning cornerstone**, WHO. Department of Reproductive Health, 4ª Ed. 2009. [Última atualização].

A nova formulação contraceptiva² composta pelo Valerato de Estradiol contendo (E_2V 1 mg é equivalente a 0,76 mg de E_2) combinada com a progestina Dienogest (DNG) foi desenvolvida a fim de abordar o problemas de controle de ciclo observado com contraceptivos orais contendo E_2 anteriores. Esta formulação foi aprovada pela União Européia em 2008. O FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a utilização como contraceptivo em Maio de 2010 para os Estados Unidos (FRUZZETI et al., 2012) e no Brasil, a liberação para uso foi permitida em 2011 pela ANVISA e Ministério da Saúde.

Os dados de ensaios clínicos demonstraram que o COC E_2V / DNG efetivamente inibe a ovulação e está associado com um controle do ciclo menstrual aceitável, o que diretamente exerce um impacto mínimo sobre os parâmetros metabólicos (PARKE et al, 2008) e proporciona níveis estáveis de E_2 durante todo o ciclo. Desde a sua inserção no mercado, Valerato de Estradiol em combinação com Dienogest tem sido objeto de investigação para avaliar os potenciais efeitos benéficos oriundos desta nova formulação contraceptiva. De acordo com NAPPI e colaboradores (2014),

[...] estudos randomizados e controlados com placebo demonstraram que E_2V / DNG é um tratamento eficaz para o sangramento menstrual intenso - uma redução na perda de sangue menstrual médio de cerca de 90% ocorre após 6 meses de tratamento. Outros potenciais benefícios contraceptivos associados com E_2V / DNG, como melhoria na dismenorréia, função sexual, e qualidade de vida, são comparáveis com os que estão associados com outros contraceptivos orais combinados.

Entretanto, o que sabemos é que somente estudos pré-clínicos validaram a segurança e a eficácia desta pílula utilizada por suas usuárias. Não há dados na literatura demonstrando o papel deste novo contraceptivo sobre modelos de inflamação vascular e tampouco sobre o sistema da coagulação e na produção de fatores vasoativos derivados do endotélio.

² De acordo com as informações da Bayer® Health Care (2011), este novo progestágeno lançado no mercado brasileiro em 2011, é composto por uma progesterona sintética denominada Dienogest® que, até então era utilizada nos Estados Unidos como fármaco para o tratamento da endometriose. Resolveu-se então unir uma progesterona sintética deste tipo juntamente com um estrógeno dito “natural” pela indústria farmacêutica, com a promessa de minimizar os eventuais eventos indesejáveis oriundos de COCs pelas usuárias que optarem fazer uso desta mais nova formulação.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células Endoteliais e Fatores Vasoativos Derivados do Endotélio

O endotélio vascular é uma monocamada de células pavimentosas e alongadas, que recobre a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. As células endoteliais (CE) formam a luz dos vasos e estão assentadas na zona subendotelial, formada pela matriz extracelular, que se estende até a lâmina elástica interna. Esta lâmina separa a camada íntima (camada endotelial e camada subendotelial) da média (camada muscular lisa). O endotélio vascular é um órgão complexo com inúmeras propriedades autócrinas, parácrinas e endócrinas. Antigamente reconhecido como meramente uma barreira física entre a parede do vaso e o sistema sanguíneo, atualmente é reconhecido por participar da homeostase vascular, influenciando no tônus vascular, crescimento celular, fibrinólise e inflamação (COOKE, 2000).

O endotélio realiza sua função por ação de diversas moléculas em resposta a uma variedade de estímulos físicos e químicos. O óxido nítrico (NO) é essencial; produzido pelo endotélio pela via L-arginina por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (eNOS ou NOS), ativadas por estímulos como hipóxia, acetilcolina, bradicinina, serotonina e aumento do fluxo sanguíneo (shear stress). O NO causa vasodilatação, inibe a liberação de fatores vasoconstritores, proliferação de células musculares lisas, adesão leucocitária e agregação plaquetária (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999).

O NO e a endotelina 1(ET-1) são, na realidade, os fatores vasoativos derivados do endotélio mais relevantes tratando-se de doenças cardiovasculares (DCV). O NO promove vasodilatação, inibe a agregação plaquetária, inibe a produção de ET-1, modula o número e afinidade dos receptores ET, suprime proliferação de células musculares e age como fator antitrombogênico. Por outro lado, a ET-1 causa potente vasoconstrição, aumenta a adesão de monócitos, ativa macrófagos e promove a proliferação e migração de células musculares dos vasos (SCHNEIDER et al.,2007).

As prostaglandinas (PGs) são sintetizadas a partir de um precursor primário, o ácido araquidônico. Este ácido é liberado dos fosfolípidos das membranas celulares pela ação da fosfolipase A2, através de processo controlado por hormônios e outros estímulos. Há duas vias principais para síntese da PGs a partir do ácido araquidônico: a via da lipoxigenase e a via da cicloxigenase (van der Veen, 2015).

Desde a descoberta das PGs, a elucidação do seu papel na hemostasia e nas doenças cardiovasculares vem se tornando cada vez mais importante. Sob condições normais quando estimulado pela cicloxigenase (COX₂) as células endoteliais formam prostaglandina E₂ (PGE₂)³ e posteriormente Prostaglandina I₂ (PGI₂), que é um vasodilatador e possui efeito antitrombogênico por inibir adesão e agregação plaquetária. Porém em situação de disfunção endotelial, o estímulo da COX2 resulta na formação de maior concentração de tromboxano (TXA₂) e menor concentração de PGI₂. O TXA₂ tem se mostrado indutor da condição de disfunção endotelial (DAÍ et al., 2004).

2.2. Hemostasia

O adequado funcionamento do sistema circulatório depende de uma série de mecanismos que regulam a manutenção do sangue no estado fluido dentro do compartimento vascular, permitindo a perfusão adequada a todos os territórios do organismo.

Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos sanguíneos, o fator de von Willebrand, os fatores da coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico. Na vigência de qualquer lesão vascular, esses componentes são ativados, visando à manutenção da integridade do endotélio e evitando a perda excessiva de sangue (KIM et al., 2011).

³ Prostaglandina E₂ é um produto primário do metabolismo do ácido araquidônico em várias células. Como diversos eicosanoides, ele não existe pré-formado em qualquer reservatório celular. Quando células são ativadas ou o araquidonato livre exógeno é fornecido, PGE₂ é sintetizada “*di novu*” e lançada para o espaço extracelular. Informação obtida do *Data Sheet Cayman*[®] – PGE₂ ELISA kit – 2015.

2.2.1. Coagulação

A coagulação do sangue e sua dissolução (trombólise) são processos integrados para manter a homeostase altamente regulada. O mecanismo de coagulação do sangue e equilíbrio entre eles depende exclusivamente de uma interação complexa entre série de elementos - os fatores de coagulação (principalmente enzimas proteolíticas), plaquetas e endotélio (LEFKOWITZ, 2006).

Conforme descrito por Macfarlane e Davie & Ratnoff (1964),

[...] no modelo clássico, a coagulação é definida como uma cascata proteolítica que pode ser ativada por duas vias enzimáticas distintas e denominadas didaticamente via extrínseca e via intrínseca. A via extrínseca da coagulação é iniciada pelo fator tecidual (TF - *tissue factor*), uma proteína transmembrana exposta na parede do vaso lesado, que se liga ao fator VIIa da coagulação. O complexo formado pelo fator VIIa e TF ativa o fator X (Figura1).

Em contrapartida, a via intrínseca (que possui todos os fatores necessários para formação do coágulo no plasma sanguíneo) é ativada quando o sangue faz contato com uma superfície negativamente ionizada (aniônica) como colágeno, vidro, metal, dextran sulfato e ácido gálico (KLUFT, 1978). No intuito de impedir a coagulação excessiva, as proteínas anticoagulantes controlam a formação da trombina. Os anticoagulantes naturais que também colaboram com a regulação da cascata de coagulação (Figura 2), como o complexo proteína C/ S e a antitrombina, agem diretamente na ação e na geração da trombina (DI NISIO; MIDDELDORP & BULLER, 2005).

Os fatores de coagulação são glicoproteínas com peso molecular superior a 40.000 daltons, sendo a maior parte deles produzida pelo fígado. Estes fatores podem ser classificados em vários grupos, de acordo com as suas funções: (a) os fatores XII, XI, pré-caliceína, X, IX, VII e protrombina são zimogênios de serinoproteases convertidos em enzimas ativas durante a coagulação; (b) os fatores VIII, V e cininogênio de alto peso molecular devem ser ativados e modificados para atuarem como cofatores; (c) os fatores II, VII, IX e X são chamados de vitamina K-

dependentes, uma vez que necessitam da presença desta vitamina para apresentarem função completa, decorrente da presença de resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (LORENZZI, 2006).

Figura 1: Modelo esquemático da cascata de coagulação composta por três vias distintas: via intrínseca, via extrínseca e via comum. **Fonte:** Payel Bhattacharjee & Debasish Bhattacharyya. **Intech Open Science, 2014.**

2.2.2. Fibrinólise

A fibrinólise é o mecanismo final que se contrapõe ao processo de coagulação. A dissolução ou solubilização do coágulo de fibrina no momento adequado é fundamental no processo de cicatrização da lesão. Sabe-se que a

fibrinólise é iniciada pelos ativadores do plasminogênio na enzima ativa, com ação fibrinolítica. Os ativadores do plasminogênio presentes na maioria dos tecidos normais e neoplásicos são os dois: o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) e o ativador tipo uroquinase do plasminogênio (u-PA) (SAYANI & ABRAMS, 2015).

O t-PA é produzido pelas células endoteliais, sendo liberado após estímulo celular por trombina. Após sua liberação, ele se liga à fibrina, na qual também está ligado ao plasminogênio. Assim, a fibrina atua como importante co-fator que permite a ativação eficiente do plasminogênio em plasmina (DE CATERINA et al., 2007).

Figura 2: Modelo esquemático da geração de trombina após a ativação da cascata de coagulação. **Fonte:** DI NISIO et al. , **N Engl J Med** 2005.

A plasmina cliva a fibrina e/ou o fibrinogênio, gerando produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio, que inibem a ação da trombina e polimerização da fibrina. O u-PA é produzido por vários tipos celulares, incluindo o endotélio com atuação nos tecidos, onde tem importante função de degradação da matriz extracelular, permitindo a migração celular.

O sistema fibrinolítico está sujeito a múltiplos fatores regulatórios. A A-2 antiplasmina é o inibidor direto da plasmina, além de interferir com a adsorção do

plasminogênio à fibrina e de se ligar às cadeias A de fibrina durante a formação do coágulo. A1 macroglobulina é um inibidor de muitos componentes do sistema fibrinolítico e PAI-I(inibidor do plasminogênio tipo 1) é o principal inibidor de t-PA e u-PA (LORENZZI, 2006).

Figura 3: Esquema representativo da degradação da fibrina e da regulação do controle fibrinolítico. **Fonte:** Deborah Penteado Martins Dias, et al. **Can Vet J.** 2013 January;54(1):65-71.

2.3. Disfunção Endotelial e Doença Cardiovascular

Revelou-se recentemente que a disfunção endotelial é um passo inicial no desenvolvimento da aterosclerose, estando caracterizada principalmente por uma redução na biodisponibilidade do óxido nítrico.

Fatores de risco tais como dislipidemia, hipertensão arterial, hiperglicemia e diabetes estão associados à disfunção endotelial. A oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Figura 4) e a resistência à insulina desempenham um importante papel na patogênese da disfunção endotelial e doença cardiovascular.

O aumento da expressão de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias leva a vasodilatação anormal dependente do endotélio, que pode ser investigada por meio de testes de reatividade pulmonar, tais como a dilatação

mediada pelo fluxo na artéria braquial. Recentemente, as novas evidências mostram que o sistema imune desempenha um papel importante na patogênese da aterosclerose e disfunção endotelial (SITIA et al., 2010).

Segundo Ferrario & Strawn (2006, p.98) “[...] Nesse processo disfuncional, a inflamação desempenha papel fundamental [...]”.

De acordo com DE MACEDO et al, 2015:

[...] biomarcadores inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral α (TNF), interleucina 1 (IL1) e proteína C-reativa (PCR) têm sido associados com o processo aterosclerótico. Todos estes fatores induzem a expressão de moléculas de adesão celular tais como molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-I) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-I) que, em por sua vez, medeiam a adesão de leucócitos ao endotélio vascular.

GIANTURCO et al., (2015), afirmou que as Doenças Cardiovasculares (DCV) estão se tornando cada vez mais frequentes e estão associadas a uma alta incidência de eventos, incapacidade e morte. Nos Estados Unidos, como por exemplo, as DCV são responsáveis por 39,1% de todas as mortes. No Brasil, as estatísticas não são muito diferentes. Os dados do Ministério da Saúde apontam que as DCV são responsáveis por 29,4% de todas as mortes registradas no país durante 1 ano⁴, o que equivale a aproximadamente 308 mil indivíduos acometidos. Por conseguinte, diversos fatores estão envolvidos neste processo, tais como o histórico familiar, sedentarismo, obesidade, tabagismo, colesterol alto e alcoolismo.

Existe uma relação entre a carga de DCV e doenças autoimunes sistêmicas. No entanto, outros mecanismos subjacentes de alto risco cardiovascular de pacientes portadores de DCV ainda não foram totalmente esclarecidos.

Segundo CLOONAN et al., (2015); citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-1 e IL-6 estão envolvidas na patogênese da disfunção endotelial. Além do mais, estas

⁴ Dados obtidos de acordo com o **Ministério da Saúde, Hospital do Coração e Sociedade Brasileira de Cardiologia**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>> Publicado em 09/2011 e atualizado em 07/2014.

citocinas são responsáveis por modificar a superfície do endotélio para um estado pró-trombótico (FERRARIO & STRAWN, 2006).

Valendo-se de várias hipóteses, Granger (2004, p 286) constata que

[...], no entanto, a inflamação vascular e a disfunção endotelial são elementos chaves no processo da doença cardiovascular. Diversas condições são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da doença, dentre elas a hipercolesterolemia e a hipertensão arterial. O sistema vascular, ou melhor dizendo mais especificamente o endotélio vascular, incita uma resposta inflamatória que conduz ao desenvolvimento de células aderentes e a disfunção endotelial, o que leva a contribuição de um dano vascular e o aumento do risco de doença cardiovascular.

TOSTES (2003) observou que em mulheres, o processo do dano vascular pode ser retardado pela presença do estrógeno, o que lhes conferem um efeito cardioprotetor.

O estrógeno presente em contraceptivos hormonais promove efeitos benéficos no sistema vascular como uma intensa vasodilatação induzida pela síntese e ativação de NO (MENDELSON, 2000), modulação do tônus vascular mediado pela produção de prostaglandina I₂, expressão de NO e endotelina do tipo 1 (ET-1) com efeitos vasodilatadores (HERMENEGILDO et al., 2005), inibição da atividade do sistema nervoso simpático e redução da expressão de moléculas de adesão no endotélio, envolvidas com a relação endotélio/leucócitos. Acredita-se que estas ações promovidas pelos estrógenos no endotélio vascular podem contribuir para uma diminuição dos riscos de trombose arterial e venosa e regular as funções das células endoteliais (De CATERINA et al., 1995).

Figura 4: Modelo esquemático da complexa interação entre monócitos/macrófagos, plaquetas e células progenitoras que estão na base do processo aterotrombótico.
Fonte: Badimon et al. , *Thrombosis and Haemostasis Supplement 1/2011*.

2.4. Tromboembolismo

Tromboembolismo venoso é um termo utilizado tanto para caracterizar trombose em veias profundas como para embolismo pulmonar. Geralmente se desenvolve nas veias da perna e o coágulo inicialmente formado é composto por células vermelhas e fibrinas (MACKMAN & TAUBMAN, 2009).

Conforme ROSENDAAL (2005, p.1) “[...] a formação do coágulo obstrutivo que define a trombose venosa é produto final de um balanço inadequado entre os fatores pró- coagulante, anticoagulante e fibrinolítico [...]”.

Trombose venosa é uma doença grave que afeta um em cada 1000 indivíduos anualmente. Os fatores circunstanciais que aumentam o risco de trombose incluem

a idade, imobilização, cirurgia, gravidez, contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e condições inflamatórias (WOLSKI, 2014).

Um estudo realizado por MIDDELDORP e colaboradores (2000), demonstrou que os níveis de protrombina, fator VII e fator V estavam significativamente mais elevados em usuárias de contraceptivos de terceira geração em relação as que faziam uso de contraceptivo de segunda geração, o que está moderadamente associado à trombose (BANK et al., 2005).

Mudanças no sistema de fibrinólise sugerem que a atividade fibrinolítica do inibidor da fibrinólise ativado por trombina (TAFI) está aumentada em mulheres que fazem uso de contraceptivos orais. A elevação nos níveis de TAFI está associada ao risco de desenvolvimento de trombose (VAN TILBURG, ROSENDAAL & BERTINA, 2000).

Inicialmente acreditava-se que o estrógeno era o único responsável pelo desenvolvimento de trombose em usuárias de contraceptivos orais combinados⁵ (ODLIND et al., 2002) .

Progesteronas capazes de diminuir a estrogenicidade da formulação são mais eficientes em contrabalancear os efeitos trombóticos do estrógeno.

2.5. Fator Tecidual e Trombose

O papel do Fator Tecidual (TF) na promoção do tromboembolismo é bem aceito pois inibição de TF por anticorpo anti TF ou aplicação de TFPI (na clínica) reduz a formação do trombo em diferentes modelos de trombose. DAY e colaboradores (2005) descreveram o papel do TF na parede vascular tendo como modelo a artéria carótida de camundongos onde observou-se redução na expressão do TF que foi modificado geneticamente nas células dos vasos ou nocaute de TF em células da musculatura lisa vascular (VSMC "*vascular smooth muscle cells*"). Nestes casos o tempo de oclusão trombótica foi grandemente prolongado.

⁵ A partir da década de 90, com o aumento na incidência de trombose induzida por contraceptivos contendo a mesma dose de estrógeno e diferentes progestágenos, foi possível observar que o efeito hipercoagulante do contraceptivo não era estritamente dependente da dose de estrógeno, mas também da chamada "estrogenicidade total da formulação".

O TF na hemostasia é também refletido pela observação que camundongos sem TF morrem por complicações hemorrágicas ainda em vida embrionária (BUTENAS, 2012).

Sabe-se que o TF, conhecido como uma proteína transmembranar (TF) é o gatilho fisiológico de coagulação na hemostasia normal. Sabe-se que TF se liga e ativa o fator VII alostericamente. O TF-factor VIIa cliva complexos IX e X, conduzindo a geração de trombina. A expressão indutível de TF em uma variedade de condições patológicas, incluindo a sépsis gram-negativa e síndromes coronárias agudas, está associada com trombose acompanhada de risco de vida (CHAN et al., 2015).

Eventos trombóticos comumente resultam de uma resposta patológica à lesão vascular, tal como aterosclerose e a ruptura da placa, a principal causa de trombose arterial. Em contraste, a expressão patológica de TF na parede do vaso ou no sangue pode ser o gatilho inicial para o desenvolvimento de trombose (CHU, 2011).

Estes eventos são mais devastadores quando eles ocorrem na coronária e artérias carótida, as quais são propensas à doença aterosclerótica. Vários fatores de risco podem aumentar a incidência de trombose arterial, tais como tabagismo, hipertensão, hiperlipidemia, e *Diabetes mellitus*. TF está presente em concentrações elevadas em placas ateroscleróticas em ambas as regiões celulares e acelulares (YAMASHITA et al., 2009). Além disso, os níveis de circulação de TF são elevados em pacientes com doença cardiovascular, sugerindo que esta fonte de TF pode também contribuir para trombose (MACKMAN & TAUBMAN, 2009). Isto conduziu ao conceito de que a segmentação TF pode reduzir trombose arterial.

2.6. Moléculas de Adesão e Processo Inflamatório na Aterosclerose

O tecido vascularizado controla a complexa resposta do processo inflamatório à injúria celular. Uma sequência progressiva de ligações pareadas entre moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais e ligantes de leucócitos provoca a transmigração do leucócito para o endotélio, como via de sinalização e ativação deste processo. Esses passos são descritos didaticamente como adesão, rolamento leucocitário, ativação leucocitária e aderência firme ao endotélio (LIU et al., 2004).

Durante a inflamação, uma grande variedade de interações célula-célula são importantes, incluindo leucócitos-leucócitos, leucócito-endotélio, células de músculo liso vascular e leucócitos e leucócitos- matriz extracelular. As proteínas que medeiam estas interações, moléculas de adesão, pertencem a quatro famílias principais: as selectinas, ligantes de selectina, as integrinas), os membros da família das imunoglobulinas (BADIMON et al., 2011).

Selectinas são glicoproteínas transmembrana com domínios extracelulares que variam em comprimento e domínios citoplasmáticos intracelulares sem homologia, que induzem o “*rolling*” de leucócitos. (HUO, LEY, 2001).

Conforme descrito por KILIC et al., 2015:

[...] VCAM-I e ICAM-I são duas moléculas de adesão importantes, membros da superfamília de imunoglobulina , e o seu papel potencial como biomarcadores de diagnóstico, gravidade e prognóstico de doenças cardiovasculares tem sido investigada em um grande número de estudos clínicos.

As integrinas, como no caso ICAM (*intercellular adhesion molecule*) é expressa constitutivamente em baixos níveis, assim como VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) é expressa por células endoteliais ativadas e por células dendríticas foliculares. A inibição da interação destas moléculas e de seus respectivos ligantes reduz a adesão dos leucócitos, a migração leucocitária e o processo inflamatório (COLLINS et al., 2000).

O recrutamento de leucócitos e expressão de citocinas pró-inflamatórias caracterizam o processo de aterogênese e o não funcionamento correto dos mediadores inflamatórios silencia a formação da placa de ateroma em modelos animais. Além disso, as vias inflamatórias promovem trombose, uma complicação tardia e temida na aterosclerose, a qual é responsável por infartos do miocárdio e pela maioria dos acidentes vasculares cerebrais (LIBBY, 2002).

A inflamação desempenha um papel fundamental em todas as etapas de aterogênese, a partir das células espumosas para a formação de placas a ruptura e, finalmente, para a trombose (SHISHEHBOR & BHATT, 2004). Segundo NAKASHIMA & VANHOUTTE (1993) “ [...] as moléculas de adesão são mediadores chave na patogênese da aterosclerose, participando em vários passos de recrutamento de leucócitos [...]”.

2.7. Os Efeitos do Estrógeno no Sistema Cardiovascular

A incidência de Doença Cardiovascular (DCV) difere significativamente entre homens e mulheres, o que é atribuído a diversos fatores de risco e hormônios. Sabe-se que a incidência de doenças ateroscleróticas é baixa em mulheres na pré-menopausa, aumenta significativamente em mulheres na pós-menopausa, e é reduzida a níveis menores na pós-menopausa por terapia de reposição hormonal (MENDELSON, 2002). No entanto, com base neste mecanismo, a hipótese levantada foi de que não apenas o estrogênio endógeno, mas também hormônios sexuais exógenos têm um efeito cardioprotetor em mulheres na pós-menopausa (GRODSTEIN⁶, 1996 apud DE ANDRADE, 2012, p. 15).

Dados na literatura sugerem que as ações diretas de estrogênio sobre os vasos sanguíneos⁷ contribuem substancialmente para os efeitos protetores do estrógeno sobre o sistema cardiovascular (MENDELSON 2000). A vasculatura, assim como os tecidos reprodutivos, ossos, fígado e cérebro, hoje é reconhecida como um importante alvo de ação do estrogênio.

O estrógeno é capaz de aumentar a vasodilatação e inibir a resposta dos vasos sanguíneos à lesão e ao desenvolvimento da aterosclerose (Figura 5). A vasodilatação induzida por estrogênio ocorre entre 5 a 20 minutos após a administração deste hormônio e não é dependente de alterações na expressão de genes; esta ação do estrogênio é por vezes referida como "não genômica." A inibição induzida por estrogênio à resposta vascular à lesão e o efeito preventivo do estrogênio contra a aterosclerose ocorrem ao longo de um período de horas ou dias após o tratamento com estrogênio e são dependentes sobre mudanças na

⁶ GRODSTEIN F, STAMPFER MJ, MANSON JE, et al . Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. **N Engl J Med** 1996;335:453 – 61.

⁷ SHIBATA (1997) descreveu que na vasculatura, o estrógeno tem promovido rápidos efeitos sobre o tônus vasomotor e em longo prazo efeitos sobre as respostas do vaso a danos e ao desenvolvimento de aterosclerose, segundo o esquema representado na figura 5. Nas últimas décadas, tremendos esforços têm sido feitos para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais hormônios esteroides exercem influência sobre a expressão de determinados genes.

expressão gênica nos tecidos vasculares, sendo que essas ações são por vezes referidas como “genômica” (BARTON, 2015).

Figura 5: Efeitos diretos do estrogênio sobre vasos sanguíneos. Células endoteliais vasculares e dos músculos lisos expressam os dois receptores de estrogênio conhecidos. Estrogênio tem dois efeitos vasodilatadores rápidos e ações de longo prazo que inibem a resposta à lesão vascular e previne a aterosclerose. Estes efeitos são mediados pela ação direta sobre as células endoteliais vasculares (vermelho) e células de músculo liso (roxo). **Fonte:** Michael E. Mendelsohn and Richard H Kansas *in The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System*. Review Articles. The New England Journal of Medicine, 1999.

Sabe-se também que os principais alvos que sofrem a ação dos estrógenos são os lipídeos - através da alteração da concentração séricas destas moléculas, a coagulação – através de mecanismos regulatórios na hemostasia e sobre os sistemas fibrinolíticos, os sistemas antioxidantes e a produção de outras moléculas vasoativas derivadas do endotélio tais como o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas. Todas estas vias, segundo cientistas, podem influenciar no desenvolvimento de doenças vasculares (MENDELSON, 1994; LAMAS et al., 2015).

3. Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Devido a uma grande quantidade de efeitos colaterais relacionados com a coagulação e metabolismo lipídico apresentado pelas usuárias de contraceptivos orais combinados desde a década de 60, a indústria farmacêutica vem modificando de maneira frequente estas formulações contraceptivas, a fim de minimizar os efeitos indesejados oriundos da estrogenicidade total da formulação.

Exemplo disso é um recente lançamento no mercado brasileiro de uma nova formulação contraceptiva oral combinada, contendo na sua composição, o estrógeno natural (Valerato de Estradiol) e uma progesterona sintética (Dienogest®) que até o ano de 2011, era bem aceito nos Estados Unidos para o tratamento da Endometriose. Na literatura, poucos estudos com foco na interação entre este novo contraceptivo e o endotélio foram realizados.

3.1. Questão do Estudo

“Será que este novo COC apresenta menores efeitos colaterais sobre o endotélio, exercendo um importante papel na inflamação vascular, possibilitando diminuir os riscos de eventuais efeitos trombóticos?”

3.2. Hipótese Experimental

Pelo fato deste novo contraceptivo oral ter sido lançado no mercado e levando em consideração a combinação trifásica de uma progesterona sintética com um componente estrogênico dito natural, o qual, portanto, segundo o fabricante mimetiza as mesmas condições fisiológicas hormonais do ciclo menstrual feminino, espera-se que esta formulação desempenhe um papel protetor no endotélio sobre os modelos de culturas celulares que iremos abordar neste presente estudo.

4. Objetivo Geral e Específico

4. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é investigar duas formulações contraceptivas e avaliar in vitro os seus efeitos na produção de fatores vasoativos, inflamatórios e hemostáticos, em um modelo de cultura de células endoteliais humanas.

4.1. Objetivo Específico

Comparar o fármaco valerato de estradiol em combinação com dienogest (E₂ V / DNG) com o etinilestradiol em combinação com levonorgestrel (EE / LVG), em cultura de células endoteliais humanas para verificar (...)

(...) in vitro:

- a ação de diferentes estrógenos e progesteronas sobre o endotélio através de um modelo de inflamação vascular antes e após estimulá-las com LPS, na produção de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina tanto no sobrenadante e na superfície celular de HUVECs em cultura;
- realizar a padronização da extração e do cultivo de células endoteliais extraídas de cordão umbilical humano, bem como a sua identificação e caracterização por imunofenotipagem CD 31 + e utilizar esta marcação por CD 31+ como controle de qualidade durante os experimentos;
- realizar a padronização do tempo de estímulo ideal por LPS em HUVEC para quantificar a produção de moléculas de adesão nos sobrenadantes e expressas na superfície celular;
- a produção de IL - 1 β / IL- 6 por diferentes estrógenos e progestágenos em HUVEC antes e após estímulo por LPS.

- o possível efeito preventivo e terapêutico dos diferentes estrógenos e progestágenos sobre a produção de fatores vasoativos NO, PGE2 e ET-1 em HUVEC mediante modelo de inflamação vascular por antes e após estímulo por LPS;
- a produção de fator tecidual por diferentes estrógenos e progestágenos em cultura de células endoteliais arteriais (HAEC), antes e após estímulo por TNF α .

5. Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E METODOS

5.1. Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

O presente trabalho teve a sua aprovação por dois comitês de ética distintos, a saber:

- I. Comitê de Ética em Pesquisa do HC – FMRP - CRSM Mater – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – Universidade de São Paulo – USP, como coparticipante e local de obtenção do material biológico (*vide anexo I*);
- II. Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP, onde foi executada a pesquisa (*vide anexo II*).

5.2. Delineamento do Estudo e Processo de Amostragem

As pacientes gestantes que estavam aguardando para dar a luz na maternidade foram convidadas a participar da presente pesquisa. As informações necessárias acerca do projeto foram esclarecidas para as participantes. Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) segundo resolução nº 466/2012 – CNS (apêndice I) foi assinado pelas gestantes. No caso de aceitação em participar da pesquisa, as mesmas assinaram o TCLE aplicado pelo aluno/pesquisador. Neste documento está descrito que tanto a mãe quanto seu filho (a) possui suas identidades totalmente preservadas, de que a mesma e o bebê não sofrerão riscos de nenhuma natureza e que se por ventura, desejar retirar-se da pesquisa como voluntária, o mesmo poderá ser prosseguido sem nenhum dano moral, material e tampouco financeiro tanto para ela – a mãe, quanto para o seu (sua) filho (a) (*Resolução nº 466/2012 - CNS*).

Ao término do parto, mediante a autorização da equipe cirúrgica do centro obstétrico, sobre condições estéreis foi coletado um pedaço de 20 cm do cordão umbilical, o qual foi transportado em caixa térmica refrigerada até o Laboratório de

Citologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para o seu processamento.

Ressaltamos que tal procedimento nas dependências da maternidade não afetou a rotina que já fora estabelecida e que o material foi obtido somente após autorização:

1º Da gestante antes do parto, com seu consentimento bem esclarecido, datado e assinado;

2º Dos responsáveis técnicos do setor, incluindo corpo clínico e a equipe de enfermagem.

5.3. Número Amostral

Cerca de 30 entrevistas (30 gestantes, portanto 30 cordões umbilicais) foram realizadas durante o período do Mestrado, permitindo obter um número de cordões necessários para a execução dos procedimentos experimentais.

5.4. Coleta e Manipulação do Cordão Umbilical Humano

A manipulação do cordão umbilical seguiu a clássica técnica descrita pela primeira vez por JAFFE em 1973. O protocolo descrito por este pesquisador serve como referência para extração e cultivo de células endoteliais obtidas de cordão umbilical humano. Os cordões umbilicais com aproximadamente 20 cm de comprimento, foram coletados após partos normais ou cesarianos de pacientes híginas. Cuidados para a não perfuração da parede do cordão foram tomados. Dispôs-se o material em solução isotônica estéril de NaCl 0,9% p/v, aditivada de 1% de antibiótico e antimicótico, em pH 7,4 para transporte, até o momento da manipulação. No laboratório de Citologia Clínica da FCFRP-USP, os mesmos foram manipulados com colagenase tipo II (Gibco®), para que haja o descolamento das

células endoteliais que compõem a luz do vaso. Após este procedimento, os materiais foram centrifugados e as células colocadas em garrafas para cultura de células (75 cm³) – 10 mL, até o momento do tratamento com os fármacos. O restante do material (amostra de cordão umbilical) foi encaminhado como lixo hospitalar, segundo RDC ANVISA nº 306/04 (à qual trata sobre o gerenciamento de resíduos de serviço de saúde), Resolução CONAMA nº 358/05 (que trata sobre resíduos sólidos oriundos dos serviços de saúde) e nas Boas Práticas de Manipulação em Laboratórios de Pesquisa (Manual de Biossegurança⁸).

5.5. Protocolo de Pesquisa

Nesta seção são descritas as atividades ligadas diretamente ao desenvolvimento da pesquisa (figura 5), contribuindo para o avanço no processo de fundamentação teórica⁹, implementação do método, obtenção de resultados e análises.

⁸MANUAL DE SEGURANÇA BIOLÓGICA EM LABORATÓRIO. In _____ **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS**, Genebra, 3ª Ed. 2004, Disponível em:

<<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf>>. Acesso em: 13 Jan. 2014.

⁹ A fundamentação teórica foi o principal instrumento necessário para o desenvolvimento desta pesquisa. O que doravante nos permitiu obter suporte teórico necessário para nos embasarmos nas análises e em reflexões sobre os dados e informações obtidos.

teórica

prática

Figura 6: Etapas e fases que compõem o desenvolvimento da pesquisa. **Fonte:** Elaborado pelo autor. Ribeirão Preto, 03/2015.

5.5.1. Desenho do estudo

O presente trabalho fora executado sobre um estudo exploratório e comparativo; quantitativo e qualitativo experimental.

5.6. Concentrações Farmacológicas Utilizadas no Presente Estudo

As concentrações farmacológicas utilizadas neste estudo correspondem ao que o fabricante aponta como Concentrações no Estado de Equilíbrio. Estado de equilíbrio equivale quando a taxa de eliminação de um determinado fármaco equivale à taxa de administração do mesmo. Para ambas as drogas, foram obtidas segundo monografia da indústria farmacêutica as seguintes concentrações:

▪ISOLADAMENTE▪

Etinilestradiol – 95 pg/mL e 114 pg/mL (UNIÃO QUÍMICA, 2014);

Levonorgestrel – 12 ng/mL e 16 ng/mL (UNIÃO QUÍMICA, 2014);

17 β Estradiol (metabólito ativo) – 51 pg/mL e 66 pg/mL (BAYER, 2011);

Dienogest – 11,8 ng/mL; 33,7 ng/mL e 82,9 ng/mL (BAYER, 2011);

▪EM MISTURA (mimetizando as pílulas contraceptivas)▪

MIX I – Etinilestradiol e Levonorgestrel;

MIX II - 17 β Estradiol e Dienogest.

Ambas as concentrações foram pesadas, dissolvidas e diluídas até a concentração final de trabalho em DMSO, partindo da solução estoque. Uma curva para diferentes concentrações de DMSO presentes nos fármacos foi realizada, a fim de garantir que as concentrações trabalhadas e o percentual de DMSO sobre as culturas não interferissem na viabilidade celular.

5.7. Caracterização de Células Endoteliais (HUVEC) Através de Imunofenotipagem CD 31+ por Citometria de Fluxo

CD31, um membro da superfamília das imunoglobulinas, é uma glicoproteína de transmembrana de 130 kDa, também designado como PECAM-1 (molécula de adesão celular endotelial plaquetária), está presente na superfície das plaquetas, monócitos, macrófagos e neutrófilos, e é um componente fundamental da junção

intercelular endotelial. Ela desempenha um papel importante na cascata de adesão entre as células endoteliais (CE) e as células inflamatórias durante a inflamação, além de facilitar a migração de leucócitos e a angiogênese de CE. Recentemente, foi reconhecido o seu papel angiogênico (LIU, 2015).

É conhecido que as células endoteliais primárias exibem uma alta expressão desta molécula e por esta razão, a pesquisa de CD 31 é considerada como um marcador efetivo para a caracterização, somado à análise microscópica da morfologia celular tipo “cobblestone”.

As células HUVEC em primeira passagem (P_0), foram tripsinizadas e contadas em uma concentração de 1×10^6 células/mL dispostas em triplicata em tubos eppendorf®. Centrifugou-se as células a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de PBS 1x para lavar o excesso de meio de cultura. Repetiu-se a etapa da centrifugação. Em seguida, desprezou-se novamente o sobrenadante e adicionou-se 300 μ L de PBS/Paraformaldeído 1x a 1%, juntamente com 20 μ L de anticorpo PE mouse anti-human CD 31 (BD™ Pharmigenn, USA). Incubou-se por 20 minutos no escuro, sob-refrigeração. Em seguida, o material incubado foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi ressuspendido com 1 mL de PBS/Paraformaldeído 1x 1% e centrifugado novamente. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 300 μ L de PBS 1x por tubo. O conteúdo foi disposto em placa de 96 poços, nas seguintes condições: um poço para o controle negativo (branco sem adição de CD 31) e três poços para a marcação positiva para CD 31 (células incubadas com CD 31). A leitura da imunofenotipagem foi realizada em citometria de fluxo (Guava – Mod. EasyCyte 8 HT – Merck -Millipore®, Software: InCyte 2.7 – Merck - Millipore®). Segundo dados da literatura, considera-se a marcação efetiva quando pelo menos 75% das células endoteliais expressam a molécula CD 31+.

5.8. Depleção de Soro Fetal Bovino em Meio de Tratamento

O meio de cultura (EGM-Lonza®), utilizado para todos os tratamentos de HUVECs e HAECs foi depletado de soro fetal bovino para que o estrógeno presente no soro não pudesse interferir nos resultados, uma vez que a literatura aponta que

estrógeno no soro fetal não é inerte. A depleção consistiu simplesmente na não adição do soro fetal no meio de cultura durante 24 horas antecedentes aos experimentos. Os controles de viabilidade (CV) em todos os experimentos validaram estes procedimentos operacionais.

5.9. Ensaio de Viabilidade Celular MTT para a Determinação das Concentrações Adequadas para os Tratamentos Farmacológicos

Em células vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) levando a redução desta molécula, formando assim o cristal Azul de Formazan. O sal de Azul de Formazan será então solubilizado com dodecil sulfato de sódio em meio ácido. A leitura foi realizada através de espectrofotometria, no comprimento de onda de 570 nm. Deste modo, após a incubação por 24 horas das células endoteliais com as diferentes concentrações medicamentosas e de Lipopolissacarídeo extracelular (LPS), serão adicionadas 20 µL da solução de MTT na concentração de 5 mg/mL. A placa foi então incubada por mais 4 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Tendo passado este período, serão acrescentados 100 µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio / HCL 0,01 N, para dissolver os sais de formazan. As placas de cultivo celular foram mantidas “overnight” em estufa de cultura celular, quando então, no dia seguinte, realizou-se a leitura através de espectrofotometria (MOSMANN, 1983). A leitura do ensaio de MTT foi realizada através do leitor de placas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.10. Padronização do Tempo de Estímulo por Lipopolissacarídeo Extra Celular (LPS) em Células Endoteliais (HUVEC) para a Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina

Um total de 2.10^4 células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) foram tripsinizadas e colocadas em placa de cultura de 96 poços e permaneceram por 72h em 150 μ L de meio de tratamento EGM Lonza®. O LPS, provido de cepa de *E. coli* (*Escherichia coli*) cepa (O111:B) - Sigma Aldrich®, nas seguintes concentrações: (2000 μ g/mL, 1000 μ g/mL, 500 μ g/mL, 250 μ g/mL e 125 μ g/mL) foram adicionadas em cada poço por triplicata na placa de cultura. A quantificação das Moléculas de Adesão foram realizadas nos intervalos de 6h, 12h, 18h e 24h, após o tratamento com estímulo pelo LPS através da técnica de ELISA para as moléculas no sobrenadante (sVCAM-I, sICAM-I, sE-Selectina, IL-1 β e IL-6) e na superfície celular (VCAM-I, ICAM-I, E-Selectina)¹⁰. A leitura deste ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.11. Quantificação da Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina no Sobrenadante da Cultura de HUVEC Durante Padronização por LPS

A quantificação das moléculas de adesão solúveis no sobrenadante das culturas de células após estímulo por LPS foi determinada pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), através do uso dos kits DuoSet ELISA® Development System: Human E-Selectin/CD62E (Catalog number: DY724), Human ICAM-1/CD54 (Catalog number: DY720 e Human VCAM-1/CD106 (Catalog number:

¹⁰ De acordo com o fabricante (R&D Systems®), os kits para a dosagem de VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina foram validados seguindo especificações técnicas para validação de metodologia analítica e desta forma, se encontram em conformidade para determinar as concentrações no sobrenadante de cultura de células, o que não vem a requerer pelo usuário realizar uma nova validação de metodologia analítica.

DY809), ambos da empresa R&D SYSTEMS® - Minneapolis, MN – USA. Após a incubação com as concentrações do LPS, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 5 minutos a uma velocidade de 3600 r.p.m. O meio em suspensão foi pipetado e disposto em tubo eppendorf® até o momento de análise e as células aderidas na placa de cultura foram necessárias para pesquisa de moléculas de adesão na superfície (item 5.4.2). Para cada uma das concentrações trabalhadas do LPS, foram realizadas ensaios em triplicata em três experimentos independentes. A leitura deste ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.12. Quantificação da Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina Ligadas à Superfície Celular de HUVEC Durante Padronização por LPS

Como descrito anteriormente, as células foram tripsinizadas, plaqueadas e tratadas com o LPS. O protocolo para pesquisa de expressão de moléculas de adesão na superfície celular seguiu a padronização realizada por DE CATERINA et al., (1995); JONSSON; PALMBLAD, (2001), também chamado de EIA modificado, devido a sua alta sensibilidade e a possibilidade de detectar as moléculas de adesão diretamente na superfície das células, sem a necessidade de realizar uma prévia permeabilidade, utilizando para isso anticorpos biotinilados Anti-VCAM-I, Anti-ICAM-I e Anti-E-Selectina (R&D SYSTEMS®). A leitura deste ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.13. Quantificação da Produção de Interleucina 1 β e Interleucina 6 no Sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais (HUVEC) para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos

Células endoteliais (HUVEC) foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 poços em um total de $2 \cdot 10^4$ células/poço e permaneceram em incubação por 24 horas ou até atingirem 70% de confluência.

Após o tempo de incubação inicial, as células receberam um tratamento com meio depletado de estrógeno por 24 horas. Após este período, às HUVECs foram adicionados o LPS como agente inflamatório e os fármacos em diferentes concentrações isolados e em mistura como descrito no item 5.6, para avaliar a capacidade terapêutica dos hormônios. Um tratamento alterando a sequência dos estímulos foi realizado, a fim de verificar a capacidade preventiva derivada dos contraceptivos, em que inicialmente os fármacos foram dispostos sobre as culturas de células endoteliais seguida de estímulo por LPS por durante 24 horas. Após o tempo de contato células/fármacos, o sobrenadante será retirado, centrifugado e aliquoteado em eppendorf. A quantificação das Interleucinas no sobrenadante seguiu as especificações técnicas do fabricante BD OptEIA™ Set Human IL-1 β e BD OptEIA™ Set Human IL-6 – ELISA kit. A leitura deste ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAMax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.14. Quantificação da Produção de Endotelina no Sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais (HUVEC) para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos

HUVEC foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 poços em um total de $2 \cdot 10^4$ células/poço e permaneceram em incubação por 24 horas ou até atingirem 70% de confluência.

Após o tempo de incubação inicial, as células receberam um tratamento com meio depletado de estrógeno por 24 horas. Após este período, às HUVEC foram adicionados o LPS como agente inflamatório e os fármacos em diferentes

concentrações isoladas e em mistura como descrito no item 5.6, para avaliar a capacidade terapêutica dos hormônios. Um tratamento alterando a sequência dos estímulos foi realizado, a fim de verificar a capacidade preventiva derivada dos contraceptivos, em que inicialmente os fármacos foram dispostos sobre as culturas de células endoteliais seguida de estímulo por LPS por durante 24 horas. Após o tempo de contato células/fármacos, o sobrenadante será retirado, centrifugado e aliquoteado em eppendorf®. A quantificação da Endotelina seguiu as especificações técnicas do fabricante do kit (Endotelin EIA kit – Monoclonal – Cayman Chemical Company - ACE™ - United States – 07/27/2011©). A leitura deste ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.15. Quantificação da Produção de Prostaglandina no Sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais (HUVEC) Para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos

As HUVECs foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 poços em um total de $2 \cdot 10^4$ células/poço e permaneceram em incubação por 24 horas ou até atingirem 70% de confluência.

Após o tempo de incubação inicial, as mesmas receberam um tratamento com meio depletado de estrógeno por 24 horas. Após este período, às HUVECs foram adicionados o LPS como agente inflamatório e os fármacos em diferentes concentrações isolados e em mistura como descrito no item 5.6, para avaliar a capacidade terapêutica dos hormônios. Um tratamento alterando a sequência dos estímulos foi realizado, a fim de verificar a capacidade preventiva derivada dos contraceptivos, em que inicialmente os fármacos foram dispostos sobre as culturas de células endoteliais seguida de estímulo por LPS por durante 24 horas. Após o tempo de contato células/fármacos, o sobrenadante será retirado, centrifugado e aliquoteado em eppendorf®. A quantificação da Prostaglandina seguiu as especificações técnicas do fabricante do kit (Prostaglandin E2 EIA kit – Monoclonal – Cayman Chemical Company - ACE™ - United States – 07/27/2011©). A leitura deste

ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.16. Quantificação da Produção de Óxido Nítrico no sobrenadante de Cultura de Células Endoteliais Para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos

Semelhante aos modelos experimentais acima descritos, as células endoteliais (HUVEC) foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 poços em um total de $2 \cdot 10^4$ células/poço e permaneceram em incubação por 24 horas ou até atingirem 70% de confluência.

Decorrido o tempo de incubação inicial, as células receberam o meio de tratamento depletado de estrógeno por 24 horas. Após este período, às HUVEC foram adicionados o LPS como agente inflamatório e os fármacos em diferentes concentrações isolados e em mistura como descrito no item 5.6, para avaliar a capacidade terapêutica dos hormônios. Um tratamento alterando a sequência dos estímulos foi realizado, a fim de verificar a capacidade preventiva derivada dos contraceptivos, em que inicialmente os fármacos foram dispostos sobre as culturas de células endoteliais seguida de estímulo por LPS por durante 24 horas. Após o tempo de contato células/fármacos, o sobrenadante foi retirado, centrifugado e aliquoteado em eppendorf®. A quantificação da produção de óxido nítrico seguiu as especificações técnicas do fabricante R&D Systems (Parameter™ Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite ELISA – R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN – USA). A leitura deste ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.17. Obtenção de Células HAEC e Dosagem de Fator Tecidual através de estímulo por TNF α em Lisado de Cultura de Células para Verificação do Efeito Terapêutico e Preventivo dos Fármacos

As células endoteliais arteriais humanas (HAEC) foram adquiridas através da empresa Life Technologies e cultivadas segundo procedimento técnico descrito pelo fabricante. Não foi realizada marcação por CD 31+ nas células em cultura, haja vista que o certificado de análise e garantia da qualidade (anexo III), obtido através do fornecedor validou este ensaio.

Como descrito por STEFFEL (2005), as células endoteliais de aorta humana (HAEC) foram cultivadas de acordo com as instruções do fabricante até confluência, em frascos de cultivo de 75 cm³ para que posteriormente, fossem estimuladas com TNF- α (Sigma Aldrich®) a 10 ng/mL durante 5 horas.

Desta maneira, transcorridos o período de estímulo, espera-se um aumento na expressão de Fator tecidual. As substâncias medicamentosas isoladas e em mistura utilizadas neste estudo foram adicionadas 30 minutos antes e depois do estímulo pelo TNF- α e a quantificação da produção no sobrenadante foi realizada através do kit ELISA Abnova® Tissue Factor ELISA kit – (Abnova Corporation® Inc, Walnut, CA – USA). A leitura deste ensaio foi realizada através do leitor de placas SPECTRAMax PLUS (Molecular Devices) ROM v3.13 – SoftMax Pro 5.4 – USA.

5.18. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism® (6.0 version).

Para as comparações realizadas entre os tratamentos juntamente com o grupo controle de cada experimento foi utilizado o teste t “*student*” para amostras não pareadas, assumindo um nível de significância de $p < 0,05$. Resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Comparações entre as diversas condições de um mesmo tratamento foram realizadas através da análise de variância ANOVA, onde o nível de significância foi

$p < 0.05$, com intervalo de confiança de 95%. Aos resultados obtidos, aplicaram-se os seguintes “*post-test*”: Tukey e Bonferroni, os quais compararam todas os pares de colunas existentes.

6.Resultados

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização de Células Endoteliais Através de Imunofenotipagem CD31+ Por Citometria de Fluxo

Os resultados obtidos revelaram que todas as células endoteliais (HUVEC) utilizadas durante os experimentos após marcação com anticorpo anti CD 31+, expressaram um percentual de marcação de 98%. Os histogramas (figura 7) representam a junção de todas as análises. O teste foi realizado em triplicata durante todos os isolamentos e passagens de HUVEC.

Figura 7: Histograma de imunofluorescência obtido após análise por citometria de fluxo, apresentando os resultados da imunofenotipagem para o percentual de expressão de CD 31 em HUVEC (*Human Umbilical Endothelial Cell*) em P₀, onde **A** à esquerda (Branco de células): células não marcadas com anticorpo Anti-CD 31; **B₁**: marcação CD31+ tubo 1, **B₂**: marcação CD 31+ tubo 2, **B₃**: marcação CD31+ tubo 3. Análises realizadas em triplicata para todos os experimentos.

6.2. Ensaio de Viabilidade Celular MTT para Determinação das Concentrações Adequadas para os Tratamentos Farmacológicos, LPS e Curva de Concentração de DMSO

O ensaio de viabilidade foi realizado para verificar um possível efeito citotóxico, oriundo dos tratamentos medicamentosos às células HUVEC em questão. O MTT revelou que a viabilidade da cultura se manteve maior que 96%, o que nos permitiu prosseguir com os ensaios propostos. Uma curva representando as concentrações equivalentes [μ L] de DMSO (quantidades expressas na legenda da figura 8 B) utilizado para diluir os medicamentos foi construída, a fim de verificar se o solvente orgânico poderia causar algum dano celular. Verificamos dentro deste contexto que a viabilidade das células foi mantida acima de 95 % para todos os tratamentos. A figura 8 apresenta os resultados obtidos.

Figura 8: Resultados obtidos após tempo de exposição de células endoteliais aos diferentes tratamentos farmacológicos durante 24 horas. Ensaio de MTT para os componentes farmacológicos (A) e curva do DMSO (B). CV: Controle de vida; CM: Controle de morte; EE: Etinilestradiol; LVG: Levonorgestrel; E2: 17 β Estradiol; DNG: Dienogest; MIX I: Etinilestradiol 95 pg/mL + Levonorgestrel 16 ng/mL; MIX II: 17 β Estradiol 51 pg/mL + Dienogest 11,8 ng/mL. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas dos gráficos ressaltam os valores significativos $p < 0.05$, em comparação ao controle de vida. Resultados realizados por três vezes em triplicata.

6.3. Padronização do Tempo de Estímulo por Lipopolissacarídeo Extra Celular (LPS) em HUVEC para Determinar a Expressão de Moléculas de Adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina no Sobrenadante e na Superfície Celular

A padronização da expressão de moléculas de adesão foi realizada nos intervalos de 6h, 12h, 18h e 24h. As figuras nos próximos itens apresentam estes resultados.

6.3.1. Padronização do estímulo por LPS em HUVECs para produção de sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina solúveis no sobrenadante através da técnica de ELISA

A figura 9 demonstra os resultados obtidos para a dosagem de sVCAM-I no sobrenadante de cultura de HUVEC após intervalos de exposição ao LPS (6h, 12h, 18h e 24 horas). Observa-se que embora o pico de produção da molécula de adesão se deu em transcorridas 18 horas, na concentração de 2000 ng/mL, de maneira geral a concentração de sVCAM-I se elevou ao longo dos intervalos de exposição.

Nossos resultados revelaram que em 18 horas a maior produção de VCAM-I se deu na concentração de 2000 ng/mL de LPS, ao passo que em 24 horas, este valor se deu a concentração de 500 ng/mL (tabela 1).

Figura 9: Dosagens da produção de sVCAM-I em células HUVEC por ELISA no sobrenadante de cultura quando expostas por LPS em concentrações crescentes nos tempos de **6, 12, 18 e 24** horas de exposição, apresentando um Controle de Vida (CV) onde não houve adição do agente estimulatório. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas dos gráficos ressaltam os valores significativos $p < 0.05$, em comparação ao controle de vida. Resultados realizados por três vezes em triplicata.

A tabela 1 apresenta os valores médios da produção de VCAM-I no sobrenadante (sVCAM-I) de cultura de células endoteliais umbilicais humanas.

Tabela 1 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão solúveis (sVCAM-I) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.

sVCAM-I (soluble Vascular Cell Adhesion Molecule type I)				
[ng/mL LPS]	6h	12h	18h	24h
	[ng/mL sVCAM-I]	[ng/mL sVCAM-I]	[ng/mL sVCAM-I]	[ng/mL sVCAM-I]
CV (sem LPS)	23,96 ± 4,095	42,36 ± 1,130	42,29 ± 1,138	42,41 ± 1,148
2000	158,8 ± 3,765	249,3 ± 19,16	816,0 ± 20,58	742,8 ± 14,33
1000	121,3 ± 0,7524	259,7 ± 23,04	743,9 ± 47,61	722,9 ± 44,75
500	121,8 ± 17,50	165,3 ± 8,074	484,0 ± 8,511	814,5 ± 82,77
250	116,2 ± 17,61	145,5 ± 13,84	449,9 ± 52,89	793,2 ± 34,12
125	59,92 ± 15,89	126,2 ± 14,97	195,4 ± 5,268	680,5 ± 74,12
62,5	68,47 ± 0,2609	116,2 ± 17,42	154,4 ± 52,69	653,2 ± 32,46

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

As concentrações de ICAM-I no sobrenadante das culturas após estímulo por LPS nos intervalos de 6h, 12h, 18h e 24 horas podem ser observadas na figura 10. Foi demonstrado um aumento significativo desde o intervalo de menor tempo de estímulo até às 24 horas de exposição, sendo que dentre todos os intervalos, o de 24 horas foi significativo quando comparado ao demais tempos de estímulos por LPS.

Figura 10: Dosagens da produção de sICAM-I em células HUVEC por ELISA no sobrenadante de cultura quando expostas por LPS em concentrações crescentes nos tempos de **6, 12, 18 e 24** horas de exposição, apresentando um Controle de Vida (CV) onde não houve adição do agente estimulatório. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas dos gráficos ressaltam os valores significativos $p < 0.05$, em comparação ao controle de vida. Resultados realizados por três vezes em triplicata.

A tabela 2 apresenta os valores médios obtidos para as dosagens de sICAM-I em HUVECs após diferentes tempos de estímulo por LPS.

Tabela 2 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão solúveis (sICAM-I) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.

sICAM-I (soluble Intracellular Adhesion Molecule type I)				
[ng/mL LPS]	6h	12h	18h	24h
	[ng/mL sICAM-I]	[ng/mL sICAM-I]	[ng/mL sICAM-I]	[ng/mL sICAM-I]
CV (sem LPS)	49,64 ± 9,745	49,15 ± 9,073	49,13 ± 9,073	49,40 ± 9,102
2000	116,4 ± 8,412	256,5 ± 16,26	333,2 ± 10,11	586,8 ± 9,440
1000	107,3 ± 6,821	251,3 ± 0,4476	283,9 ± 5,448	500,3 ± 60,56
500	106,6 ± 17,83	234,5 ± 13,44	315,1 ± 29,91	546,1 ± 47,18
250	84,99 ± 7,586	242,0 ± 26,41	267,8 ± 58,19	512,9 ± 36,00
125	86,93 ± 14,48	230,9 ± 16,83	249,1 ± 39,88	374,4 ± 58,41
62,5	68,97 ± 1,983	190,8 ± 20,88	232,9 ± 49,33	312,7 ± 59,71

* Valores de p <0.0001 para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

Para a dosagem de sE-Selectina, as concentrações obtidas nos sobrenadantes de culturas após os tempos de 6h, 12h, 18h e 24 horas podem ser observadas na figura 11. Ao comparar o tempo de estímulo por LPS nestes intervalos, observou-se que a produção de sE-Selectina iniciou-se a partir de 6 horas de estímulo, quando se manteve crescente até 24 horas de exposição, onde apresentou resultados máximos. O pico de produção de sE-Selectina se deu no intervalo de 24 horas. Ao comparar todas as concentrações trabalhadas e a produção da molécula de adesão, observou-se que a concentração de 2000 ng/mL (1 µg/ml) durante 24 horas promoveu maior estímulo dentre as demais concentrações e tempo de estímulo. No entanto, vale a pena ressaltar que as demais concentrações quando comparadas ao controle de vida (onde não houve adição de LPS - por exemplo 1000 ng/mL; 500 ng/mL após 24 horas de incubação

com LPS), também apresentaram-se significativas durante os intervalos de exposição.

Figura 11: Dosagens da produção de sE-Selectina em células HUVEC por ELISA no sobrenadante de cultura quando expostas por LPS em concentrações crescentes nos tempos de **6, 12, 18 e 24** horas de exposição, apresentando um Controle de Vida (CV) onde não houve adição do agente estimulatório. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas dos gráficos ressaltam os valores significativos $p < 0.05$, em comparação ao controle de vida. Resultados realizados por três vezes em triplicata.

A tabela 3 apresenta os resultados médios das concentrações de sE-Selectina em HUVECs após diferentes tempos de injúria celular causada por LPS.

Tabela 3 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão solúveis (sE-Selectina) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.

sE-Selectina (E-Selectina Solúvel)				
[ng/mL LPS]	6h	12h	18h	24h
	[ng/mL sICAM-I]	[ng/mL sICAM-I]	[ng/mL sICAM-I]	[ng/mL sICAM-I]
CV (sem LPS)	51,87 ± 15,35	121,7 ± 21,30	121,7 ± 21,30	121,7 ± 21,30
2000	174,4 ± 21,05	824,9 ± 15,19	816,9 ± 26,54	913,4 ± 37,20
1000	172,7 ± 2,436	757,5 ± 23,24	807,5 ± 9,391	875,7 ± 20,78
500	143,1 ± 16,61	745,4 ± 15,64	757,5 ± 23,24	853,9 ± 10,05
250	138,5 ± 40,73	565,1 ± 11,33	745,4 ± 15,64	789,4 ± 33,13
125	137,8 ± 52,63	443,6 ± 0,4080	565,1 ± 11,33	594,8 ± 24,95
62,5	129,9 ± 8,294	258,3 ± 70,08	443,6 ± 0,4080	421,9 ± 4,449

* Valores de $p <0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.3.2. Padronização do estímulo por LPS em HUVECs para produção de VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina ligadas à superfície celular através da técnica de EIA modificado

Abaixo se encontram os gráficos (figuras) e as tabelas revelando os resultados obtidos para as dosagens das moléculas de adesão ligadas à superfície celular pela técnica de EIA modificada (De Caterina, 1995). Este ensaio possibilitou dosar a quantidade de moléculas expressas na superfície celular sem a necessidade de permear previamente as células. O sobrenadante de cada cultura resultou nos valores obtidos para as moléculas de adesão solúveis.

A figura 12 apresenta os resultados da expressão de molécula de adesão VCAM-I ligada à superfície celular após diferentes tempos de exposição.

Figura 12: Dosagens da produção de VCAM-I em células HUVEC por EIA modificado ligada à superfície celular de cultura quando expostas por LPS em concentrações crescentes nos tempos de **6, 12, 18 e 24** horas de exposição, apresentando um controle de vida (CV) onde não houve adição do agente estimulatório. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas dos gráficos ressaltam os valores significativos $p < 0.05$, em comparação ao controle de vida. Resultados realizados por três vezes em triplicata.

Os resultados apresentados na superfície celular para a dosagem de VCAM-I se demonstraram significativos quando comparado ao grupo controle (CV – controle

de vida). Observa-se segundo a figura 12, que o pico máximo da expressão de VCAM-I na superfície foi obtido no intervalo de 24 horas de estímulo na concentração de 500 ng/mL, seguido da concentração de 1000 ng/mL. Estas concentrações foram as mais significativas quando comparada as demais concentrações e dentre todas, foram as mais representativas ao serem comparadas com a produção de sVCAM-I (figura 9) no sobrenadante celular. A tabela abaixo mostra os valores da dosagem de VCAM-I por EIA modificado em todos os intervalos trabalhados.

Tabela 4 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão ligadas à superfície celular (VCAM-I) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.

VCAM-I (Vascular Cell Adhesion Molecule type I)				
[ng/mL LPS]	6h	12h	18h	24h
	[ng/mL VCAM-I]	[ng/mL VCAM-I]	[ng/mL VCAM-I]	[ng/mL VCAM-I]
CV (sem LPS)	2525 ± 14,63	5682 ± 105,9	9043 ± 111,5	6450 ± 769,1
2000	4690 ± 92,65	19173 ± 571,0	28771 ± 1126	26131 ± 3166
1000	4349 ± 70,67	21831 ± 3037	29173 ± 4681	30347 ± 2151
500	5260 ± 0,0	16987 ± 113,1	23809 ± 340,6	31041 ± 2508
250	5158 ± 33,01	19302 ± 218,7	23837 ± 412,4	19573 ± 2140
125	3612 ± 34,72	19235 ± 34,65	26028 ± 8393	23412 ± 1482
62,5	2797 ± 83,73	20629 ± 66,88	19273 ± 31,01	25067 ± 4247

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

As concentrações de ICAM-I na superfície celular após os intervalos de 6h, 12h, 18h e 24 horas podem ser observados na figura 13.

De acordo com os resultados obtidos, o pico da expressão desta molécula na superfície se deu em 24 horas de exposição ao LPS, revelando um aumento dependente de concentração. As demais concentrações apresentaram aumento

Figura 13: Dosagens da produção de ICAM-I em células HUVEC por EIA modificada ligada à superfície celular de cultura quando expostas por LPS em concentrações crescentes nos tempos de **6, 12, 18 e 24** horas de exposição, apresentando um Controle de Vida (CV) onde não houve adição do agente estimulatório. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas dos gráficos ressaltam os valores significativos $p < 0.05$, em comparação ao controle de vida. Resultados realizados por três vezes em triplicata.

significativo quando comparadas ao CV, porém somente as concentrações de 500 ng/mL, 1000 ng/mL e 2000 ng/mL; respectivamente, dentre todas as outras foram as mais representativas.

A tabela 5 apresenta os resultados expressos com média e desvio padrão para a dosagem de ICAM-I através de EIA modificado em todos os intervalos trabalhados.

Tabela 5 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão ligadas à superfície celular (ICAM-I) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.

ICAM-I (Intracellular Adhesion Molecule type I)				
[ng/mL LPS]	6h	12h	18h	24h
	[ng/mL ICAM-I]	[ng/mL ICAM-I]	[ng/mL ICAM-I]	[ng/mL ICAM-I]
CV (sem LPS)	3468 ± 98,34	3763 ± 318,2	5737 ± 17,18	4667 ± 549,8
2000	7723 ± 884,8	8500 ± 541,2	10979 ± 524,0	13360 ± 214,8
1000	8215 ± 635,7	7177 ± 250,9	11106 ± 137,4	13232 ± 807,5
500	7401 ± 790,3	6526 ± 652,9	11131 ± 790,3	14113 ± 1143
250	8227 ± 395,2	5747 ± 1045	11355 ± 816,1	12575 ± 427,4
125	7613 ± 1417	5487 ± 16,20	9354 ± 816,1	12965 ± 446,7
62,5	7613 ± 1263	4608 ± 16,20	7510 ± 3161	10868 ± 832,0

* Valores de p <0.0001 para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

Observa-se na tabela que o gradativo aumento da expressão de ICAM-I na superfície celular ocorreu frente a exposição por diferentes concentrações de LPS. Embora o intervalo de 24 horas na concentração de 500 ng/mL de LPS foi o que mais estimulou as células endoteliais a expressarem esta molécula, quando comparamos com a produção no sobrenadante, 500 e 2000 ng/mL foram as que mais estimularam a produção de ICAM-I, quando comparada a todas as outras concentrações.

A expressão de E-Selectina na superfície celular está demonstrada na figura 14. Em nossos resultados, observamos novamente que a expressão de moléculas de adesão foi dependente do estímulo por LPS. A maior concentração de

E-Selectina foi expressa em 24 horas a 2000 ng/mL. A partir desta concentração, os níveis de E-Selectina expressos na superfície celular começaram a decrescer. Ambos foram significativos quando comparado ao grupo controle (CV).

Na superfície celular, as concentrações mais adequadas para estimular HUVEC a produzirem e expressarem E-Selectina foram 2000 ng/mL, 1000 ng/mL e 500 ng/mL durante 24 horas de exposição (figura 14), quando podemos notar a capacidade da célula endotelial em expressar estas moléculas na superfície após uma injúria causada por um agente inflamatório.

Figura 14: Dosagens da produção de E-Selectina em células HUVEC por EIA modificado ligada à superfície celular de cultura quando expostas por LPS em concentrações crescentes nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas de exposição, apresentando um Controle de Vida (CV) onde não houve adição do agente estimulatório. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas dos gráficos ressaltam os valores significativos $p < 0,05$, em comparação ao controle de vida. Resultados realizados por três vezes em triplicata.

A tabela 6 apresenta os valores obtidos após realização do EIA modificado para a quantificação da expressão de E-Selectina ligada à superfície celular durante todos os intervalos trabalhados.

Tabela 6 - Resultados significativos (p value <0.0001) e percentual de aumento na produção de moléculas de adesão ligadas à superfície celular (E-Selectina) em HUVEC após exposição por LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

E-Selectina				
[ng/mL LPS]	6h	12h	18h	24h
	[ng/mL E-Selectina]	[ng/mL E-Selectina]	[ng/mL E-Selectina]	[ng/mL E-Selectina]
CV (sem LPS)	6167 ± 383,8	18625 ± 456,9	17772 ± 310,7	19581 ± 1700
2000	18302 ± 73,10	26999 ± 1078	26869 ± 1444	34545 ± 493,4
1000	18379 ± 365,5	27412 ± 237,6	24505 ± 255,9	31702 ± 54,83
500	18974 ± 1535	25939 ± 201,0	25078 ± 1286	33434 ± 822,4
250	18689 ± 2157	25539 ± 549,6	23497 ± 329,0	31418 ± 91,38
125	15743 ± 1352	21713 ± 4423	22993 ± 383,8	28110 ± 712,7
62,5	10478 ± 500,9	18224 ± 3070	22406 ± 591,8	26895 ± 2504

* Valores de p <0.0001 para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

Levando em consideração que houve uma diferença estatística na produção das moléculas de adesão, através do estímulo por LPS nas concentrações de 500, 1000 e 2000 ng/mL tanto no sobrenadante, quanto na superfície celular durante os picos no intervalo entre 18 e 24 horas, optamos por esta razão em padronizar para todos os experimentos o estímulo na concentração intermediária de 1000 ng/mL (1µg/mL) por 24 horas, o qual representa o máximo intervalo de exposição utilizado por nós.

6.4. Avaliação do Efeito Terapêutico e Preventivo Derivado de Contraceptivos Orais Combinados Isolados e Misturados (MIXs) Sobre as Culturas de Células Endoteliais Extraídas de Cordão Umbilical Humano

Após padronizar uma curva de dose/resposta por LPS sobre as HUVEC, seguimos em um modelo experimental utilizando diferentes concentrações farmacológicas, onde os hormônios foram dispostos isoladamente e agrupados (representados este último por MIXs). As doses farmacológicas escolhidas após a realização do ensaio de viabilidade celular MTT (figura 8) encontraram-se dispostas nas culturas nas seguintes concentrações: Levonorgestrel (LVG) [16 ng/mL]; Etinilestradiol (EE) [95 pg/mL]; Dienogest (DNG) [11,8 ng/mL]; 17 β Estradiol (17 β) [51 pg/mL]; MIX I [LVG+EE (16+95)] e MIX II [DNG+17 β (11,8+51)], considerando para todas as concentrações um volume final na placa de cultura celular de 150 μ L para cada poço de tratamento.

6.4.1. Avaliação terapêutica dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC através de ELISA no sobrenadante e EIA na superfície celular sobre a expressão de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina

As células no modelo terapêutico foram previamente tratadas isoladamente com 1000 ng/mL (= 1 μ g/mL) de LPS por poço durante 24 horas. Após este intervalo, foram adicionados aos poços os fármacos isolados e em mistura, os quais permaneceram por mais 24 horas em contato com as células. Este modelo experimental nos permitiu visualizar a possível capacidade que COCs tem em reduzir a expressão de moléculas de adesão frente a um estímulo inflamatório decorrente de um agente injuriante como o LPS. São apontados na literatura outros agentes que também provocam a expressão de moléculas de adesão em HUVEC, como IL-6 e TNF α , porém, para este presente estudo, optamos em utilizar o

tradicional modelo inflamatório obtido por LPS de bactéria *E.coli*. Tratamento de células endoteliais com LPS é considerado na literatura como “*gold standard*”.

A literatura aponta (SIMONCINI; GENAZZANI, 2000) o tratamento de HUVEC com prévia exposição por drogas e posterior adição de LPS para avaliar a capacidade preventiva derivada de compostos com ação farmacológica. No entanto, nosso grupo de estudo optou por avaliar não somente a capacidade preventiva, mas também a capacidade terapêutica derivada de COCs, uma vez que as duas situações são passíveis de ocorrerem.

Em HUVEC, os resultados obtidos durante as dosagens das moléculas de adesão (Figura 15), demonstraram redução significativa na produção destas moléculas pelos quatro fármacos isolados e pelos dois MIXs, sendo que dentre estes, MIX II apresentou melhor desempenho quando comparado ao MIX I.

Expressão de Moléculas de Adesão no Sobrenadante

Figura 15: Dosagem da produção de moléculas de adesão solúveis no sobrenadante de HUVEC através do método de ELISA, após tratamento prévio com LPS [1ug/mL] por 24 horas, seguido de tratamento com os fármacos em questão, apresentando um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim o tratamento com o meio de cultura. Resultados estão expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS.

Desta forma, podemos observar na figura 15 que o MIX II exerceu maior redução na produção de moléculas ICAM-I e E-Selectina, revelando que Dienogest + 17 β Estradiol foram mais significativos nesta condição quando comparado ao MIX I, o qual fora composto por Levonorgestrel + Etinilestradiol. Porém, neste mesmo experimento, foi observado que Etinilestradiol isoladamente reduziu de maneira mais expressiva os níveis de VCAM-I.

A tabela 7 apresenta os resultados significativos da dosagem das moléculas de adesão após estímulo prévio por LPS.

Os resultados apresentados por esta tabela estão expressos com média e desvio padrão.

Tabela 7 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão no sobrenadante (sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina) após estímulo prévio por LPS e posterior adição de fármacos isolados e agrupados. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

TRATAMENTO TERAPÊUTICO			
Tempo (24horas)	sVCAM-I sobrenadante	sICAM-I sobrenadante	sE-Sel sobrenadante
C. Vida [ng/mL]	652,3 $\pm$ 149,4	82,99 $\pm$ 6,785	117,2 $\pm$ 3,276
LPS [ng/mL]	1713 $\pm$ 61,42	500,3 $\pm$ 60,56	875,7 $\pm$ 20,78
Tratamentos	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
LPS + LVG	798,5 $\pm$ 52,32	165,7 $\pm$ 11,24	178,2 $\pm$ 1,88
LPS + EE	647,9 $\pm$ 106,1	175,5 $\pm$ 7,75	144,2 $\pm$ 7,96
LPS + DNG	722,0 $\pm$ 218,7	225,8 $\pm$ 21,49	169,7 $\pm$ 14,49
LPS + 17β	1200 $\pm$ 175,0	148,7 $\pm$ 3,72	167,8 $\pm$ 3,24
LPS +MIX I	943,3 $\pm$ 117,8	215,1 $\pm$ 7,22	151,0 $\pm$ 14,48
LPS + MIX II	767,7 $\pm$ 44,89	138,6 $\pm$ 17,04	140,4 $\pm$ 9,93

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

De acordo com os resultados obtidos após as dosagens das moléculas de adesão expressas na superfície celular (figura 16), pode-se observar que Etinilestradiol promoveu significativa redução de VCAM-I. Para os níveis de ICAM-I

quando comparado ao grupo controle LPS, MIX II foi mais efetivo na redução desta molécula.

Entretanto, ao observar os valores de ICAM-I, notamos que nenhum fármaco isolado durante o tratamento com 24 horas de exposição foi capaz de diminuir a expressão desta molécula na superfície celular e tampouco os resultados para esta molécula foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle LPS.

Figura 16: Dosagem da produção de moléculas de adesão na superfície celular de HUVEC através do método de EIA modificado (De CATERINA, 1995) após tratamento prévio com LPS [$1\mu\text{g/mL}$] por 24 horas, seguido de tratamento com os fármacos em questão, apresentando um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim o tratamento com o meio de cultura. Resultados estão expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS para VCAM-I e E-Selectina.

Contudo, de acordo com os resultados obtidos (tabela 8), Levonorgestrel foi o tratamento que promoveu maior redução de E-Selectina quando comparado aos demais grupos tratados.

Tabela 8 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão na superfície celular (VCAM-I e E-Selectina) e para ICAM-I, após estímulo prévio por LPS e posterior adição de fármacos isolados e agrupados. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

TRATAMENTO TERAPÊUTICO			
Tempo (24horas)	VCAM-I sup. celular	ICAM-I sup. celular ^a	E-Sel sup. celular
C. Vida [ng/mL]	12239 ± 1391	1018 ± 1066	11056 ± 373,2
LPS [ng/mL]	30347 ± 2151	13232 ± 807,5	28959 ± 1910
Tratamentos	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
LPS + LVG	12950 ± 59,97	12522 ± 109,1	13274 ± 91,33
LPS + EE	12562 ± 103,9	12903 ± 55,88	13433 ± 47,47
LPS + DNG	12711 ± 127,2	12642 ± 93,89	13470 ± 16,64
LPS + 17 β	12943 ± 93,04	12740 ± 182,7	13444 ± 28,81
LPS +MIX I	13099 ± 183,6	12678 ± 129,0	13448 ± 6,28
LPS + MIX II	12907 ± 80,27	12497 ± 32,67	13430 ± 45,34

^a Dados apresentados não foram estatisticamente significativos. Valores de $p > 0,0001$ para o grupo avaliado.

* Valores de $p < 0,0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.4.2. Avaliação preventiva dos hormônios isolados e misturados (MIXs) em HUVEC através de ELISA no sobrenadante e EIA na superfície celular sobre a regulação da expressão de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina

As células no modelo preventivo foram inicialmente tratadas isoladamente e em mistura (MIXs) com as diferentes concentrações farmacológicas por 24 horas. Após este intervalo, foi adicionado aos poços dos fármacos isolados e agrupados, o LPS [1µg/mL], o qual permaneceu em contato com as células por mais 24 horas. Neste modelo experimental, queremos visualizar a possível capacidade que os COCs têm em prevenir a produção de moléculas de adesão conferindo ao endotélio vascular um efeito protetor ao se deparar com um agente injuriante do tipo LPS.

Os resultados obtidos para cada fármaco isolado assim como o MIX I e MIX II foram comparados com a coluna controle composta por LPS. A figura 17 apresenta os resultados obtidos após o modelo de tratamento preventivo.

Figura 17: Dosagem da produção de moléculas de adesão solúveis no sobrenadante de HUVEC através do método de ELISA, após tratamento prévio com fármacos por 24 horas, seguido de estímulo por LPS [1 μg/mL], apresentando um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim somente o tratamento com o meio de cultura. Resultados estão expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo somente LPS.

Células endoteliais tratadas por MIX II apresentaram menor produção de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina (29,4 %; 34,0% e 6,53%; respectivamente, quando comparados ao controle LPS). Comparando os dois modelos propostos, MIX II foi mais efetivo em reduzir a produção de VCAM-I e E-Selectina no modelo preventivo quando comparado ao modelo terapêutico. A diferença pode ser observada ao comparar os valores de VCAM-I e E-Selectina neste modelo (tabela 9) com os valores destas mesmas moléculas no modelo terapêutico (tabela 7). Ressaltamos que para os níveis de ICAM-I, os medicamentos

isolados e em mistura no modelo terapêutico demonstram promover maior redução na produção desta molécula ao ser comparado com o modelo preventivo.

Tabela 9 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão no sobrenadante (sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina) após tratamento prévio com fármacos isolados e agrupados por 24 horas, seguido de estímulo por LPS para produção de moléculas de adesão. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

TRATAMENTO PREVENTIVO			
Tempo (24horas)	sVCAM-I sobrenadante	sICAM-I sobrenadante	sE-Sel sobrenadante
C. Vida [ng/mL]	51,80 ± 8,772	58,27 ± 5,551	117,2 ± 3,276
LPS [ng/mL]	533,4 ± 46,24	501,6 ± 59,81	870,3 ± 21,90
Tratamentos	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
LVG + LPS	310,4±75,28	271,9±1,73	137,0±11,95
EE + LPS	280,9±35,96	274,0±32,97	135,9±4,53
DNG + LPS	226,2±34,94	306,6±28,60	158,9±11,64
17 β + LPS	280,5±43,33	194,4±22,84	86,49 ±6,47
MIX I + LPS	232,4±23,69	248,4±27,29	87,21 ±9,36
MIX II + LPS	156,9±40,03	170,5±60,18	57,19±10,07

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

Entretanto, a figura 17 nos mostra que tanto os estrógenos como as progesteronas, ambos isolados, obteve uma capacidade em reduzir a expressão de moléculas de adesão.

O presente modelo experimental demonstrou que a maior redução na expressão de moléculas solúveis no sobrenadante se deu para E-Selectina durante as 24 horas de tratamento

Expressão de Moléculas de Adesão na Superfície Celular

Figura 18: Dosagem da produção de moléculas de adesão na superfície celular de HUVEC através do método de EIA modificado (de CATERINA, 1995) após tratamento prévio fármacos por 24 horas, seguido de estímulo com LPS [1μg/mL], apresentando um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim o tratamento com o meio de cultura. Resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS.

Com relação à quantificação das moléculas ligadas à superfície celular, observou-se que os níveis mais expressivos na redução foram para VCAM-I, seguido de E-Selectina e ICAM-I. Nossos resultados revelaram que uma maior redução na expressão de E-Selectina na superfície celular foi obtida após tratamento com 17β Estradiol. MIX II se demonstrou mais efetivo na redução dos níveis de VCAM-I e ICAM-I. O modelo preventivo na superfície celular demonstrou maior redução das três moléculas avaliadas quando comparado ao modelo terapêutico.

A tabela 10 apresenta os resultados obtidos para as dosagens das moléculas de adesão na superfície celular após tratamento prévio com os fármacos e posterior adição de LPS. Resultados estão expressos com média e desvio padrão.

Tabela 10 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de moléculas de adesão na superfície celular (VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina) após tratamento prévio com fármacos isolados e agrupados por 24 horas, seguido de estímulo por LPS para expressão de moléculas de adesão. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

TRATAMENTO PREVENTIVO			
Tempo (24horas)	VCAM-I sup. celular	ICAM-I sup. celular	E-Sel sup. celular
C. Vida ^[ng/mL]	12239 ± 1391	1018 ± 1066	11056 ± 373,2
LPS ^[ng/mL]	30347 ± 2151	25816 ± 4470	28959 ± 1910
Tratamentos	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
LVG + LPS	9095±1777	11195 ± 227,1	10809± 141,6
EE + LPS	9480± 1846	12200 ± 1055	10956± 53,90
DNG + LPS	10094±1787	12579 ± 62,87	10936± 121,4
17 β + LPS	9270±1880	12349 ± 482,7	10762± 228,5
MIX I + LPS	8540±147,9	11456 ± 124,5	12979± 90,67
MIX II + LPS	8184±322,3	10856 ± 284,3	12330± 440,2

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.4.3. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de IL 1 β

Em nossos resultados obtidos durante as dosagens de IL 1 β no sobrenadante de HUVEC após dois modelos experimentais distintos, observamos que os fármacos isolados e em mistura –MIX I e MIX II, exerceram uma redução significativa nos níveis desta citocina quando comparado ao grupo controle, composto por LPS somente. A figura 19 apresenta estes resultados.

Figura 19: Produção de interleucinas no sobrenadante de HUVEC através do método de ELISA após diferentes formas de tratamentos. À esquerda – gráfico demonstrando a dosagem de IL1-β em HUVECs quando expostas previamente ao LPS [1µg/mL] e posteriormente tratadas com as concentrações farmacológicas citadas. O controle positivo foi obtido através da adição de LPS e o controle de vida (CV) representa células sem adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. À direita – gráfico demonstrando a dosagem de IL1-β em HUVEC quando expostas previamente às diferentes concentrações de fármacos por 24 horas, seguido de posterior estímulo com LPS [1µg/mL], apresentando um controle positivo (LPS) e um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. Resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS.

O presente estudo revelou que, dentre os MIXs avaliados, MIX II composto por Dienogest + 17 β Estradiol desempenhou uma redução mais significativa do que MIX I, embora estatisticamente a diferença entre os dois seja pequena (cerca de 0.0085 pg/mL entre os MIXs para o modelo terapêutico e 0.019 pg/mL entre os MIXs para o modelo preventivo) e dentre os medicamentos isolados, Levonorgestrel nos dois modelos avaliados, apresentou melhor capacidade em reduzir a produção desta interleucina nos dois modelos propostos.

Ao comparar os dois modelos – Preventivo e Terapêutico, observamos uma maior redução na produção de interleucina no modelo Preventivo, onde a adição de LPS ocorreu após o tratamento prévio por 24 horas com os fármacos isolados e em mistura.

A tabela 11 apresenta os resultados dos dois modelos terapêuticos, expressos com média e desvio padrão.

Tabela 11 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de IL 1 β no sobrenadante de HUVECs de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

Tempo (24horas)	IL 1 β Terapêutico	Tempo (24horas)	IL 1 β Preventivo
C. Vida [pg/mL]	0,1390 $\pm$ 0,02404	C. Vida [pg/mL]	0,1390 $\pm$ 0,02404
LPS [pg/mL]	0,6435 $\pm$ 0,1082	LPS [pg/mL]	0,7435 $\pm$ 0,1082
Tratamentos	(pg/mL)	Tratamentos	(pg/mL)
LPS + LVG	0,1485 $\pm$ 0,007778	LVG + LPS	0,1445 $\pm$ 0,01485
LPS + EE	0,2915 $\pm$ 0,08132	EE + LPS	0,2980 $\pm$ 0,005657
LPS + DNG	0,3775 $\pm$ 0,03041	DNG + LPS	0,3530 $\pm$ 0,03818
LPS + 17 β	0,1755 $\pm$ 0,01061	17 β + LPS	0,1675 $\pm$ 0,01061
LPS + MIX I	0,1715 $\pm$ 0,02758	MIX I + LPS	0,1740 $\pm$ 0,009899
LPS + MIX II	0,1630 $\pm$ 0,03394	MIX II + LPS	0,1550 $\pm$ 0,01414

* Valores de $p < 0,0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.4.4. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de IL 6

De maneira semelhante o modelo experimental terapêutico e preventivo para as dosagens de IL 6 no sobrenadante de HUVECs após tratamentos com fármacos e LPS demonstraram uma redução significativa na produção desta citocina (figura 20).

Para IL 6 terapêutico no sobrenadante (à esquerda), os dados demonstraram que a maior redução foi obtida mediante adição do MIX II após tratamento prévio com LPS. No entanto, fármacos isolados também revelaram diminuir a produção de IL 6 pelas células endoteliais.

Figura 20: Produção de interleucinas no sobrenadante de HUVEC através do método de ELISA após diferentes formas de tratamentos. À esquerda – gráfico demonstrando a dosagem de IL6 em HUVECs quando expostas previamente ao LPS [1µg/mL] e posteriormente tratadas com as concentrações farmacológicas citadas. O controle positivo foi obtido através da adição de LPS e o controle de vida (CV) representa células sem adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. À direita – gráfico demonstrando a dosagem de IL 6 em HUVEC quando expostas previamente às diferentes concentrações de fármacos por 24 horas, seguido de posterior estímulo com LPS [1µg/mL], apresentando um controle positivo (LPS) e um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. Resultados estão expressos com média $\pm$ desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS.

A maior redução dos níveis de IL-6 foi observada no modelo preventivo, o qual foi composto por tratamento farmacológico prévio e posterior adição de LPS, revelando que a maior redução foi obtida pelo MIX II, seguido de MIX I e dentre os medicamentos isolados, 17β promoveu maior redução nos dois modelos avaliados. Vale a pena ressaltar que ao comparar os dois modelos de estudo, o Preventivo foi mais efetivo do que o Terapêutico.

A tabela 12 apresenta os valores em pg/mL para estas dosagens com média e desvio padrão.

Tabela 12 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de IL 6 no sobrenadante de HUVECs de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “post-test” Tukey e Bonferroni.

Tempo (24 horas)	IL - 6 Terapêutico	Tempo (24 horas)	IL - 6 Preventivo
C. Vida [pg/mL]	139,7 ± 24,40	C. Vida [pg/mL]	168,3 ± 13,01
LPS [pg/mL]	686,9 ± 22,54	LPS [pg/mL]	619,9 ± 72,26
Tratamentos	(pg/mL)	Tratamentos	(pg/mL)
LPS + LVG	332,5 ± 69,44	LVG + LPS	262,8 ± 2,288
LPS + EE	354,3 ± 23,30	EE + LPS	266,6 ± 32,55
LPS + DNG	326,8 ± 26,26	DNG + LPS	292,3 ± 22,99
LPS + 17 β	295,3 ± 23,42	17 β + LPS	259,8 ± 41,44
LPS + MIX I	267,6 ± 2,246	MIX I + LPS	246,3 ± 10,43
LPS + MIX II	257,9 ± 8,112	MIX II + LPS	232,8 ± 18,19

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.4.5. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Em HUVEC, a dosagem de PGE₂ seguiu o mesmo modelo terapêutico e preventivo, os quais constam nesta pesquisa. A adição de LPS antes do tratamento farmacológico representou o modelo terapêutico, seguido de posterior adição dos fármacos isolados e em mistura. O tratamento preventivo representado pela adição inicial das concentrações farmacológicas em questão segue com posterior estímulo inflamatório através de LPS sobre as culturas de células endoteliais. A figura 21 apresenta os resultados dos dois tipos de tratamentos estudados.

Figura 21: Produção de PGE₂ no sobrenadante de HUVEC através do método de ELISA após diferentes formas de tratamentos. À esquerda – gráfico demonstrando a dosagem de PGE₂ em HUVECs quando expostas previamente ao LPS [1µg/mL] e posteriormente tratadas com as concentrações farmacológicas citadas. O controle positivo foi obtido através da adição de LPS e o controle de vida (CV) representa células sem adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. À direita – gráfico demonstrando a dosagem de PGE₂ em HUVEC quando expostas previamente às diferentes concentrações de fármacos por 24 horas, seguido de posterior estímulo com LPS [1µg/mL], apresentando um controle positivo (LPS) e um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. Resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS.

Observando os nossos resultados, verificamos que o modelo preventivo (Figura 21) demonstrou exercer maior influência no aumento da produção de prostaglandina quando comparado ao modelo terapêutico. Fármacos isolados e em mistura aumentaram de modo significativo à produção de PGE₂ tanto ao adicionar o LPS antes, quanto adicioná-lo após o tratamento farmacológico. No entanto, um melhor desempenho para MIX II foi observado, seguido de MIX I, revelando que o tratamento estroprogestínico possibilitou obter um aumento significativo nos níveis do eicosanoide. Ao comparar os tratamentos isolados, no modelo terapêutico a maior produção foi para o tratamento com 17β e para o modelo preventivo, fora atribuído o maior aumento após tratamento com Etinilestradiol.

A Tabela 13 apresenta os valores médios com o desvio padrão para PGE₂ em pg/mL.

Tabela 13 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de PGE_2 no sobrenadante de HUVECs de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

Tempo (24 horas)	PGE_2 Terapêutico	Tempo (24 horas)	PGE_2 Preventivo
C. Vida [pg/mL]	286,0 $\pm$ 60,58	C. Vida [pg/mL]	337,9 $\pm$ 18,30
LPS [pg/mL]	1148 $\pm$ 75,64	LPS [pg/mL]	1148 $\pm$ 75,64
Tratamentos	(pg/mL)	Tratamentos	(pg/mL)
LPS + LVG	238,0 $\pm$ 29,98	LVG + LPS	627,9 $\pm$ 21,30
LPS + EE	310,1 $\pm$ 83,37	EE + LPS	753,7 $\pm$ 41,22
LPS + DNG	298,3 $\pm$ 15,80	DNG + LPS	695,3 $\pm$ 7,760
LPS + 17 β	317,3 $\pm$ 35,69	17 β + LPS	728,9 $\pm$ 22,69
LPS + MIX I	342,0 $\pm$ 23,17	MIX I + LPS	739,5 $\pm$ 81,25
LPS + MIX II	367,9 $\pm$ 35,36	MIX II + LPS	864,1 $\pm$ 19,30

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.4.6. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de Óxido Nítrico (NO)

A pesquisa de NO produzida pelas células endoteliais foi realizada através do ensaio de ELISA, cujo princípio do método para determinação deste fator vasoativo foi baseado na conversão de Nitrato para Nitrito através de Nitrato Redutase. A reação é seguida por detecção colorimétrica do nitrito como um produto de corante azóico com a Reação de Griess. A Reação de Griess baseia-se na diazotização de dois passos em que acidificada NO_2^- produz um agente de nitrosação, que reage com o ácido sulfanílico para produzir o íon diazonio. Este íon o é em seguida acoplado a N- (1-naphthyl) etilenodiamina para formar o azo-derivado cromóforo que absorve a luz no comprimento de onda de 540-570 nm.

Os resultados obtidos para a dosagem de NO em HUVEC revelaram que os fármacos isolados e em mistura desempenharam papel significativo no aumento de

NO pelas células endoteliais tanto de maneira preventiva quanto terapêutica e dentre estes dois modelos, o preventivo foi mais relevante no que diz respeito à quantidade de NO liberado pelas células endoteliais em cultura. A figura 22 apresenta os resultados obtidos para os dois modelos experimentais propostos.

Figura 22: Produção de NO total no sobrenadante de HUVEC através do método de ensaio de redução Nitrato/Nitrito por ELISA após diferentes formas de tratamentos. À esquerda – gráfico demonstrando a dosagem de NO em HUVEC quando expostas previamente ao LPS [1µg/mL] e posteriormente tratadas com as concentrações farmacológicas citadas. O controle positivo foi obtido através da adição de LPS e o controle de vida (CV) representa células sem adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. À direita – gráfico demonstrando a dosagem de NO em HUVEC quando expostas previamente às diferentes concentrações de fármacos por 24 horas, seguido de posterior estímulo com LPS [1µg/mL], apresentando um controle positivo (LPS) e um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. Resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS.

Segundo os resultados obtidos, podemos notar que dentre os tratamentos, MIX II foi que mais induziu a produção de NO pelas células HUVEC quando comparado a todos os demais tratamentos. No entanto, a maior produção de NO por MIX II foi obtida no modelo preventivo, seguido do MIX I, onde podemos observar uma produção induzida de NO em menor quantidade. Dentre os

medicamentos isolados, 17 β promoveu maior aumento de NO nos dois modelos estudados.

A tabela 14 apresenta os resultados das diferentes concentrações de NO obtidas durante o ensaio de ELISA após os respectivos tratamentos.

Tabela 14 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de NO sobrenadante de HUVECs de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

Tempo (24horas)	NO Terapêutico	Tempo (24horas)	NO Preventivo
C. Vida [$\mu\text{mol/L}$]	13,35 $\pm$ 1,344	C. Vida [$\mu\text{mol/L}$]	13,35 $\pm$ 1,344
LPS [$\mu\text{mol/L}$]	15,40 $\pm$ 3,677	LPS [$\mu\text{mol/L}$]	15,30 $\pm$ 4,808
Tratamentos	($\mu\text{mol/L}$)	Tratamentos	($\mu\text{mol/L}$)
LPS + LVG	14,30 $\pm$ 2,687	LVG + LPS	15,95 $\pm$ 0,3536
LPS + EE	15,45 $\pm$ 2,899	EE + LPS	21,95 $\pm$ 0,7778
LPS + DNG	13,60 $\pm$ 0,7071	DNG + LPS	14,85 $\pm$ 0,7778
LPS + 17 β	22,05 $\pm$ 2,051	17 β + LPS	26,85 $\pm$ 2,899
LPS + MIX I	23,70 $\pm$ 2,263	MIX I + LPS	27,50 $\pm$ 1,131
LPS + MIX II	28,35 $\pm$ 1,202	MIX II + LPS	36,45 $\pm$ 4,172

* Valores de $p < 0,0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.4.7. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e em mistura (MIXs) em HUVEC na regulação da produção de endotelina (ET-1)

A dosagem de ET-1 após transcorridas 24 horas, seguiu o mesmo modelo terapêutico e preventivo que vem sido proposto neste trabalho. LPS foi adicionado antes do tratamento farmacológico e após, representando o modelo Terapêutico e Preventivo, respectivamente. A figura 23 apresenta os resultados dos dois tipos de tratamentos estudados.

O modelo preventivo observado na figura 23 demonstrou exercer maior influência na diminuição da produção de ET-1 quando comparado ao modelo terapêutico. Fármacos isolados diminuíram de modo significativo a produção de ET-1 tanto ao adicionar o LPS antes, quanto adicioná-lo após o tratamento farmacológico. Destaca-se um melhor desempenho para MIX II, seguido de MIX I, revelando que o tratamento estroprogestivo possibilitou obter uma diminuição significativa nos níveis deste fator vasoativo quando comparado a todos os tratamentos com as drogas isoladas para os dois modelos estudados.

Figura 23: Produção de ET-1 no sobrenadante de HUVEC através do método de ELISA após diferentes formas e tratamentos. À esquerda – gráfico demonstrando a dosagem de ET-1 em HUVECs quando expostas previamente ao LPS [1µg/mL] e posteriormente tratadas com as concentrações farmacológicas citadas. O controle positivo foi obtido através da adição de LPS e o controle de vida (CV) representa células sem adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. À direita – gráfico demonstrando a dosagem de ET-1 em HUVEC quando expostas previamente às diferentes concentrações de fármacos por 24 horas, seguido de posterior estímulo com LPS [1µg/mL], apresentando um controle positivo (LPS) e um controle de vida (CV) onde não houve adição de LPS e sim apenas o meio de tratamento. Resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo LPS.

Ressaltamos que ao comparar os dois modelos de estudo, o Preventivo foi mais efetivo do que o Terapêutico e dentre os MIXs avaliados, MIX II foi mais expressivo em diminuir a produção de ET-1 mediante estímulo inflamatório ou não quando comparado ao MIX I nestas mesmas condições de tratamento. Dentre os tratamentos isolados, Etinilestradiol promoveu maior redução entre os grupos avaliados. A tabela 15 apresenta os valores médios com o desvio padrão para PGE₂ em pg/mL.

Tabela 15: Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de ET-1 no sobrenadante de HUVECs de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

Tempo (24horas)	Endotelina ET-1	Tempo (24horas)	Endotelina ET-1
	Terapêutico		Preventivo
C. Vida [pg/mL]	45,00 ± 4,243	C. Vida [pg/mL]	59,50 ± 0,7071
LPS [pg/mL]	431,5 ± 4,243	LPS [pg/mL]	268,0 ± 16,97
Tratamentos	(pg/mL)	Tratamentos	(pg/mL)
LPS + LVG	276,0 ± 2,828	LVG + LPS	181,0 ± 8,485
LPS + EE	236,0 ± 5,657	EE + LPS	161,0 ± 7,071
LPS + DNG	266,5 ± 9,192	DNG + LPS	181,5 ± 2,121
LPS + 17 β	266,5 ± 9,192	17 β + LPS	190,0 ± 8,485
LPS +MIX I	193,5 ± 4,950	MIXI + LPS	154,0 ± 5,657
LPS +MIX II	173,0 ± 4,243	MIXII + LPS	127,0 ± 7,071

* Valores de $p < 0,0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

6.4.8. Avaliação terapêutica e preventiva dos hormônios isolados e misturados (MIXs) na expressão de fator tecidual em lisado de células HAEC

A expressão do fator tecidual foi quantificada após lise das células HAEC em cultura por 15 mM octyl- β -D-glucopiranosideo (reagente de lise) por 15 minutos. Após a quantificação, observamos no modelo inflamatório proposto, uma diminuição relativa dos níveis de fator tecidual expresso pelas células endoteliais, quando expostas previamente ou posteriormente com os medicamentos deste estudo. Porém, nota-se uma maior diminuição para o modelo preventivo, onde o tratamento prévio com o medicamentos tornaram a expressão do TF menor, quando comparado ao modelo terapêutico, onde o pré-tratamento por LPS foi realizado.

Dentre os fármacos em questão, MIX II no modelo preventivo e terapêutico desempenhou um melhor papel no que diz respeito a reduzir a produção de TF, seguido de MIX I. Os medicamentos isolados também promoveram um papel relativamente significativo. A figura 24 apresenta os resultados para estes dois modelos experimentais.

Figura 24: Dosagem dos níveis de Fator Tecidual (TF) total no sobrenadante de HAECS através do método de ELISA após diferentes formas de tratamentos. À esquerda – gráfico demonstrando a dosagem de TF em HAEC quando expostas previamente ao TNFα [10 ng/mL] e posteriormente tratadas com as concentrações farmacológicas citadas. O controle positivo foi obtido através da adição de TNFα [10 ng/mL] e o controle de vida (CV) representa células sem adição do TNFα e sim apenas o meio de tratamento. À direita – gráfico demonstrando a dosagem de TF em HAEC quando expostas previamente às diferentes concentrações de fármacos por 24 horas, seguido de posterior estímulo com TNFα [10 ng/mL], apresentando um controle positivo TNFα [10 ng/mL] e um controle de vida (CV) onde não houve adição de TNFα e sim apenas o meio de tratamento. Resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Linha tracejada sobre as colunas ressaltam os valores significativos de $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle contendo TNFα.

A Tabela 16 apresenta os resultados das dosagens de TF para as diferentes concentrações dos medicamentos utilizados neste presente estudo.

Tabela 16 - Resultados significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de TF em lisado de cultura de HAECs de maneira Terapêutica e Preventiva, com uso de fármacos isolados e agrupados por 24 horas e LPS. Intervalo de confiança de 95%. Análise de variância ANOVA, seguido de “*post-test*” Tukey e Bonferroni.

Tempo (24horas)	Fator Tecidual	Tempo (24horas)	Fator Tecidual
	Terapêutico		Preventivo
C. Vida [ng/mL]	19,00 ± 0,9899	C. Vida [ng/mL]	12,93 ± 1,365
TNFα [ng/mL]	43,73 ± 7,500	TNFα [ng/mL]	47,98 ± 6,298
Tratamento	(ng/mL)	Tratamento	(ng/mL)
TNFα + LVG	20,25 ± 2,516	LVG + TNFα	13,63 ± 1,401
TNFα + EE	22,87 ± 2,558	EE + TNFα	17,40 ± 2,425
TNFα + DNG	18,07 ± 0,6506	DNG + TNFα	16,03 ± 0,6506
TNFα + 17β	25,03 ± 1,747	17β + TNFα	15,87 ± 0,7371
TNFα + MIX I	18,43 ± 0,5132	MIXI + TNFα	18,53 ± 0,8145
TNFα + MIX II	16,90 ± 0,3464	MIX II + TNFα	15,07 ± 0,5859

* Valores de $p < 0.0001$ para todos os grupos avaliados em comparação com coluna controle composta por LPS.

7. Discussão

7. DISCUSSÃO

7.1. LPS Estimula Células Endoteliais

O recrutamento de leucócitos é um processo compreendido em vários passos orquestrados por células endoteliais, moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas endógenas (MITROULIS et al., 2015).

Os lipopolissacáridos (LPS) derivados de bactérias gram-negativas são estimuladores potentes da inflamação (MATTSBY-BALTZER, 1993), que induzem, diretamente por intermédio de citocinas ou não a expressão de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão leucocitária E-selectina e molécula de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1) (BEVILACQUA, 1987).

A estimulação de células endoteliais através desta endotoxina é mediada por CD14 solúvel (sCD14), um receptor específico de LPS (ARDITI, 1993; HAILMAN, 1994; PUGIN, 1993). CD14 é uma glicoproteína com peso de 55-kDa que existe tanto como uma proteína solúvel encontrada no soro em concentrações de 2 a 6 µg/mL e como uma proteína ancorada ao glicosilfosfatidilinositol (mCD14) sobre a superfície de monócitos-macrófagos (ZIEGLER-HEITBROCK, 1993). O lipopolissacárideo (LPS), cuja maior porção se encontra na membrana exterior de bactérias Gram-negativas, é um dos mais importantes estímulos patogênicos no sangue, pois promove diretamente a inflamação vascular.

DAUPHINEE & KARSAN (2006) demonstraram em cultura de HUVECs que após estimulação por LPS, inicia-se um excesso de produção de citocinas inflamatórias, tais como a interleucina (IL) -1-β, IL-6, IL-8, TNFα, quimiocinas, moléculas de adesão tais como VCAM-I, ICAM-I e fatores vasoativos. Os resultados obtidos em nossas diferentes curvas de dose-resposta por LPS para moléculas de adesão tanto no sobrenadante quanto na superfície celular revelou além da expressão de VCAM-I e ICAM-I, como citado por YAMAGAMI e colaboradores (2003), uma significativa indução na produção de E-Selelina, o que nos permitiu padronizar uma curva de estímulo por LPS em tempo/resposta para avaliar a ação dos medicamentos frente a um mecanismo de lesão celular.

De acordo com HUO (2015),

[...] ICAM-1 e VCAM-1 são duas das diversas moléculas de adesão expressas por células endoteliais em resposta a vários estímulos inflamatórios, e são responsáveis pela aderência de monócitos e outras células do sistema imunológico.

QIAOLI e colaboradores (2013) revelaram que durante um experimento onde LPS foi o agente de estímulo das células endoteliais, a concentração de (50 ng/mL) foi capaz de ativar e induzir expressão de ICAM-I e VCAM-I em cultura de HUVEC após intervalos de 24 horas de maneira significativa. No entanto, nossos resultados revelaram que (1000 ng/mL) durante 24 horas de estímulo foi necessário para induzir as HUVEC a produzirem não somente VCAM-I e ICAM-I, mas também E-Selectina, o que equivale a 20 vezes mais a concentração de LPS. Para a produção de interleucinas (a exemplo - IL1 β), 16 horas foram necessárias segundo os pesquisadores. O pico de produção em nosso modelo experimental para esta citocina se deu em transcorridas 24 horas de estímulo.

Moléculas de adesão são expressas em duas formas no organismo: constitutível e indutível. Sabe-se que os níveis de ICAM-I, por exemplo, são basalmente expressos em níveis baixos no endotélio vascular, mas ao ser induzido por algum agente estimulatório do tipo LPS, IL-6 ou TNF α , eleva-se rapidamente. Estudos realizados demonstraram que a estimulação de HUVEC com 1 μ g/mL de LPS bacteriano durante 6, 12, 18 e 24 horas induzem a produção de moléculas de adesão, tanto no sobrenadante quanto na superfície celular das células endoteliais (DE ANDRADE, 2009).

Outros dados na literatura apontam que incubação de HUVEC com 100 ng/mL de LPS durante 18 horas é capaz de ativar a expressão de VCAM-I e ICAM-I e essa mesma concentração durante 6 horas é suficientemente capaz de ativar a produção de E-Selectina, os quais são passíveis de detecção em imunoenaios enzimáticos (SIMONCINI et al., 2005).

No entanto, alguns estudos revelam que a expressão máxima de moléculas de adesão depende do tipo de modelo experimental que é utilizado. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram uma máxima expressão das moléculas de

adesão no intervalo de 24 horas, transcorridas após estímulo tanto no sobrenadante quanto na superfície celular de HUVEC.

7.2. Contraceptivos Orais Combinados Diminuíram a Expressão de Moléculas de Adesão sVCAM-I, sICAM-I e sE-Selectina / VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina em HUVEC

MACKMAN & TAUBMAN (2009) descreveram que um dos primeiros passos para o desenvolvimento da trombose arterial é o espessamento e a ruptura da placa aterosclerótica, a qual se desenvolve através de acúmulo de lipídeos, células espumosas, lesão a célula endotelial e produção de substâncias inflamatórias no local da lesão que podem modificar a superfície do endotélio para um estado pró-trombótico.

Neste contexto, a quantificação da produção de moléculas de adesão é tida como um biomarcador de risco para doenças endoteliais bem aceita na literatura. Recentes teorias afirmam que o estrógeno pode atuar na prevenção de DCV e que este efeito pode ser influenciado de acordo com a terapia hormonal utilizada.

Com base neste contexto, ESMON (2005) destaca que

[...] A relação das moléculas de adesão e a DCV está relacionada com o processo inflamatório gerado no local da lesão, bem como a ativação de monócitos por moléculas de adesão do tipo ICAM-I, VCAM-I e E-Selectina. Este mecanismo resulta na ativação de Fator Tecidual (TF) dentre outras citocinas pró-inflamatórias, resultando em um estado de hipercoagulação.

ICAM-I é fisiologicamente expressa nas células em repouso e seu pico máximo pode ser obtido após 48 horas de exposição (KILIC et al., 2015). Os resultados obtidos para esta molécula revelaram que o máximo de produção se deu em 24 horas.

E-selectina, expressa de maneira constitutiva e indutiva no endotélio inflamado, desempenha um papel chave nas interações leucócito-endotélio durante o recrutamento de leucócitos para locais de inflamação (KUMMITA, 2012).

O efeito vasodilatador que o estrógeno exerce sobre o tônus vascular devido a produção de NO (PAULO et al, 2009; GUETTA et al., 1997), a potenciação da fibrinólise (KOH, 2006) e a redução da expressão de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina, envolvidas nas interações endotélio-leucócitos e leucócitos-leucócitos estão dentre os principais mecanismos pelos quais estrogênio consegue diminuir o risco de trombose arterial e demais efeitos adversos.

Entretanto, alguns estudos revelaram que dependendo do tipo de progesterona sintética inserida na pílula contraceptiva, estes efeitos benéficos do estrógeno podem ser anulados, causando um aumento nos níveis destas moléculas de adesão tanto no soro quanto no plasma de pacientes, refletindo um maior grau de inflamação e ativação do endotélio (BILGIR et al., 2009).

A incidência de doenças cardiovasculares é diferentemente significativa entre homens e mulheres. O tônus vascular, bem como o sistema reprodutivo, o músculo esquelético, o tecido ósseo, fígado e cérebro, são reconhecidos como alvos importantes para a ação do estrógeno. Efeito direto de estrogênio sobre o tônus vascular, portanto, são de importância central para a medicina clínica. No tônus vascular, o estrógeno desenvolve efeitos rápidos de longo prazo sobre a resposta a lesões e ao desenvolvimento da aterosclerose (MENDELSON, 2010).

Nossos resultados demonstraram que a nova formulação contraceptiva contendo Dienogest e Valerato de Estradiol promoveu redução nos níveis de VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina no modelo de inflamação vascular estudado em HUVEC quando comparado ao MIX I. Entretanto, significativa diminuição, porém de menor proporção na expressão das moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina também foi observada com o modelo experimental utilizando a formulação contendo Levonorgestrel e Etinilestradiol¹¹.

O presente estudo foi capaz de demonstrar que células endoteliais, mediante estímulo por LPS, foram capazes de expressar moléculas de adesão, onde partes

¹¹ Resultado apresentado sob a forma de “pôster”, intitulado “*Combined oral contraceptives reduce expression of adhesion molecules and the production of proinflammatory interleukin on human endothelial cell culture*”, durante o **1st Meeting of the Fertility Control Club (FCC) - Hormonal contraception methods: From basic research to clinical practice**. Barcelona, Espanha, fev. 2015.

permaneceram ligadas à superfície celular e parte foi liberada para o meio sobrenadante.

Um possível mecanismo anti-inflamatório tem sido proposto por vários pesquisadores a fim de explicar alguns dos possíveis efeitos benéficos de estrógenos sobre células endoteliais (APPT, 2004). Sabe-se que a expressão de VCAM-I pode representar um mecanismo através do qual os estrógenos induzem esta ação via receptor ER-positivo (CLARKSON; ANTHONY; MORGAN, 2001).

No modelo experimental preventivo e terapêutico, observamos que os medicamentos foram capazes de reduzir significativamente os níveis de moléculas de adesão VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina tanto no sobrenadante das culturas como na superfície das células endoteliais, sendo que a utilização dos hormônios em mistura mimetizando a pílula contraceptiva hormonal combinada - representados pelos modelos MIX I e MIX II provocaram redução em suas expressões.

Nota-se que os resultados das condições preventivas, onde os fármacos foram adicionados antes da lesão celular foram mais expressivos no que diz respeito à produção de VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina do que nas condições terapêuticas – com pré-tratamento das amostras por LPS para posterior adição dos fármacos.

No modelo onde se avaliou o efeito preventivo dos COCs sobre a expressão de moléculas de adesão no sobrenadante, observou-se maior diminuição dos níveis de E-Selectina quando comparado às demais moléculas.

A expressão de várias moléculas de adesão foi encontrada em lesões ateroscleróticas. Em humanos, lesões ateroscleróticas detectaram forte expressão de P-selectina no endotélio sobrejacente, mas não sobre em placas ateroscleróticas do endotélio arterial (SHIRAI, 2015).

No entanto, vale a pena ressaltar que não encontramos muitos dados na literatura apontando a capacidade de novos progestágenos como o dienogest e valerato de estradiol, em reduzir a expressão de moléculas de adesão endoteliais em modelo de inflamação vascular.

Embora o modelo proposto tenha sido *in vitro*, em pacientes mulheres saudáveis. SIEGER et al., (2002) observaram diminuição nos níveis plasmáticos de ICAM-I após utilização por seis meses de contraceptivo contendo EE + LVG.

VCAM-I está intimamente envolvida com a adesão de monócitos e com o rolamento de leucócitos no endotélio vascular. STOCCO et al., (2011) demonstrou significativa redução dos níveis desta molécula em plasma de usuárias de

contraceptivo contendo Drospirenona e Etinilestradiol em comparação ao grupo controle semelhante ao que utilizamos nesta pesquisa, contendo Levonorgestrel e Etinilestradiol (segunda geração de contraceptivo oral combinado).

E-Selectina, um membro da família das selectinas (P-selectina, E-selectina e L-selectina) vem sendo observada acima dos níveis basais em doenças tais como o *Diabetes mellitus* e demais doenças inflamatórias (JILMA et al., 2003).

No entanto, vale a pena ressaltar que independentemente do modelo experimental, os hormônios de maneira isolada também exerceram papel anti-inflamatório diante do modelo experimental proposto.

Observamos também que os resultados revelaram uma proporcionalidade entre a expressão de moléculas de adesão ligadas à superfície celular e a sua liberação para o meio de cultivo (sobrenadante).

De ANDRADE et al., (2009) durante um trabalho utilizando fitoestrógenos Daidzeína e Genisteína, demonstraram em um modelo de cultura de células HUVEC que estes fitohormônios foram capazes de reduzir a expressão de VCAM-I, ICAM-I e E-Selectina na superfície celular, que refletiu diretamente sobre a produção destas mesmas moléculas para o sobrenadante em 24 horas de exposição. Neste estudo, os dois modelos experimentais (Terapêutico e Preventivo) foram pesquisados.

Estes pesquisadores encontraram melhor resultado no modelo Preventivo para a redução de moléculas de adesão e dentre estas, o melhor resultado foi para os níveis de E-Selectina, onde previamente as células endoteliais HUVECs foram tratadas com fitoestrógenos genisteína, daidzeína, formometina e biocanina A e posteriormente foram estimuladas com LPS.

Não muito diferente, nossos resultados revelaram similaridade com estes resultados (embora tenham utilizado fitohormônios derivados de extrato de soja), onde o melhor desempenho dos estrógenos e progesteronas foi no modelo preventivo.

Nossos resultados em HUVEC revelaram que os fármacos isoladamente e em mistura foram capazes de reduzir as três moléculas de adesão nos dois sistemas avaliados (superfície celular e sobrenadante) de maneira terapêutica quando demonstraram atuar reduzindo as moléculas mesmo quando o LPS já está em ação e preventiva, quando previamente as células são tratadas com os fármacos e doravante estabelece-se um maior mecanismo de proteção em cultura de células endoteliais.

7.3. Contraceptivos Orais Combinados Diminuíram a Produção de IL-1 β e IL-6 no Sobrenadante de Cultura de HUVEC

Citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas em diferentes distúrbios no organismo (PUCHNER et al., 2015). Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que são secretadas por diferentes tipos de células e possuem uma variedade de ações inflamatórias e imunes. Com o advento dos ensaios de sensibilidade para avaliar os níveis de citocinas na circulação, baixas concentrações antes não detectáveis na circulação de indivíduos passaram a ser quantificadas pelos diferentes tipos de ensaios.

Os níveis de expressão de citocinas, inibidores de citocinas e proteínas de fase aguda são governados por hormônios. Os estrógenos, bem como andrógenos inibem a produção de IL-1 β e TNF- α em monócitos-macrófagos. Outros estudos sugerem que o estradiol é mais inibitório às citocinas do tipo Th1 (por exemplo, Interferon gama, IL-2), enquanto que a testosterona é inibidora de citocinas do tipo Th2 (por exemplo, IL-4). É sabido que as citocinas também controlam o eixo das glândulas hipotálamo-hipofisário-adrenal, bem como a produção e secreção de hormônios sexuais. A discrepância entre os estudos sugere que os mecanismos são diferentes em condições fisiológicas e fisiopatológicas (BURGER, 2002).

A IL-1 é produzida por diferentes tipos de células e tem um papel importante na resposta imune sistêmica. Tem sido bem demonstrado pela literatura a presença de IL-1 β no desenvolvimento de doença (VALLEJO, 2014).

De acordo com nossos resultados, os contraceptivos isolados e em mistura diminuíram a produção de IL-1 β e IL-6 tanto no modelo terapêutico, quanto no modelo preventivo.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, que é produzida por diferentes tipos de células imunes e não imunes. IL-6 se liga a uma subunidade de baixa afinidade denominada gp80 ou IL-6Ra na superfície das células alvo, promovendo recrutamento de subunidades alfa do complexo de transdução de sinal chamada gp130 ou IL-6R β (SZÓSTEK, 2014).

Não há dados na literatura apontando o papel de Valerato de Estradiol e Dienogest sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias no endotélio. No entanto,

alguns estudos experimentais, a exemplo de um modelo proposto por KHOSRAVISAMANI (2014), revelou o papel de hormônios esteroides femininos (estrógeno e progesterona) sobre a “*down regulation*” da produção de IL-1 β e TNF- α durante o processo inflamatório em mulheres com periodontite.

Nossos resultados revelaram que a produção de IL-1 β foi diminuída pelo MIX II e dentre os medicamentos isolados, Levonorgestrel apresentou um melhor desempenho na redução desta citocina. O modelo preventivo foi mais significativo na redução do que o modelo terapêutico. Ao verificar as dosagens de IL-6 nos dois modelos avaliados, notamos que MIX II reduziu de maneira mais significativa os níveis de IL-6 e dentre os medicamentos isolados, 17 β demonstrou ser mais efetivo em sua redução.¹²

Um modelo de inflamação foi proposto por IWASA (2014) para avaliar a capacidade do estrógeno sobre a regulação da resposta inflamatória durante a obesidade. Neste trabalho, IAWSA e colaboradores propuseram um modelo experimental utilizando roedores ovariectomizadas que apresentaram febre após injeção de LPS. Curiosamente, os animais ovariectomizados que receberam dose de estrógeno apresentaram menor produção de IL1 β , TNF- α e IL-6 ao comparar com o grupo controle sem estrógeno.

O estrogênio tem vários efeitos sobre função cardiovascular. Dentre seus efeitos, o estrogênio regula a resposta inflamatória, a função vascular, a sobrevivência dos miócitos cardíacos, metabolismo, a sensibilidade à insulina, e o desenvolvimento de hipertrofia (HOU, 2015).

HOU (2015) demonstrou que a expressão de moléculas de adesão do tipo VCAM-I e ICAM-I após estímulo por IL-1 era reduzida quando tratadas as células arteriais em cultura (HAEC) eram tratadas com estradiol em concentrações nanométricas.

O papel do estrógeno durante a regulação de processos inflamatórios parece estar envolvido na ativação de diversas vias de sinalização intracelular. A exemplo disso, BREITHAUPT-FALOPPA (2014), evidenciou que hormônios sexuais femininos interferiram com a resposta imune, durante um ensaio experimental onde inflamação

¹² Resultado apresentado sob a forma de “*pôster*”, intitulado “*Comined oral contraceptives reduce expression of adhesion molecules and the production of proinflammatory interleukin on human endothelial cell culture*”, durante o **1st Meeting of the Fertility Control Club (FCC) - Hormonal contraception methods: From basic research to clinical practice**. Barcelona, Espanha, fev. 2015.

pulmonar de ratos foi comparada a resposta em ratas. Os resultados apresentados evidenciaram que animais fêmeas não ovariectomizadas são mais resistentes para lesões de órgãos causadas por algum tipo de trauma e que a presença dos hormônios esteroides estrógeno e progesterona é fator de proteção.

Semelhante a este estudo, SHIVERS (2015) demonstrou que a supressão de estrogênio em ratas ovariectomizadas promoveu aumento na produção de IL-1 α e IL-1 β , TNF- α e IL-6 durante um experimento onde inflamação era induzida na raiz dorsal e em gânglios da medula espinhal. A reposição de estrogênio fez decrescer os níveis de citocinas pró-inflamatórias.

KHAKSARI (2013) avaliou o papel de hormônios esteroides sobre a produção de IL-1 β e IL-6 após uma lesão traumática no cérebro de ratas ovariectomizadas. Segundo seus resultados, os níveis das citocinas pró-inflamatórias se mantiveram maiores no soro de ratas ovariectomizadas quando comparado ao grupo controle utilizando ratas não ovariectomizadas, revelando que o estrogênio influenciou os níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Segundo HUSSEIN e colaboradores (2014), atualmente existe uma riqueza de evidências experimentais indicando que o déficit nos níveis de estrogênio endógeno facilita o aparecimento de inflamação que pode ser antagonizada por terapia de reposição estrogênica. Durante um modelo de inflamação do tipo colite, investigou-se o papel de estrógeno no controle da inflamação intestinal, com enfoque nas alterações morfológicas de mastócitos e a expressão de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), fibronectina e espécies reativas de oxigênio. Houve melhora significativa no estado de saúde dos ratos tratados com estrogênio. Além disso, houve diminuição significativa na expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em cerca de 25 %.

7.4. Contraceptivos Orais Combinados Regularam a Produção de Fatores Vasoativos Derivados do Endotélio: Aumentaram a Produção de PGE₂ e Óxido Nítrico (NO) e Diminuíram a Produção de Endotelina (ET-1) em Cultura de HUVEC

No presente estudo, nossos resultados indicaram que as diferentes concentrações dos medicamentos utilizados exerceram efeito regulatório na produção de NO e PGE₂ pelas células endoteliais de maneira dose-dependente utilizando um agente estimulatório antes e após o tratamento com hormônios em cultura de células.

Os efeitos do estrógeno sobre o metabolismo de lipoproteínas, a ação vasodilatadora no endotélio, que ocorre devido a indução da produção de NO (PAULO, 2009) são alguns dos mecanismos que fazem com que os estrógenos reduzam o risco de doenças cardiovasculares.

O estrógeno presente em formulações contraceptivas promove benefícios ao sistema vascular como uma intensa vasodilatação induzida pela síntese e atividade de NO (MENDELSON, 2000), modulação do tônus vascular devida à produção de PGE₂, a expressão de óxido nítrico sintetase e endotelina ET-1 (HERMENEGILDO, 2005), inibição da vasoconstrição induzida pelo sistema nervoso simpático (DHAUN, 2015) e a redução na produção de moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito/endotélio durante a inflamação vascular. Todas estas ações promovidas pelo estrógeno sobre as células endoteliais permitem com que os riscos para eventuais eventos ateroscleróticos e trombóticos sejam prevenidos, graças à regulação da função das células endoteliais (DE CATERINA, 1995).

Os resultados mostraram aumento significativo na produção de NO ao modelo terapêutico apenas para o tratamento por MIX I e MIX II. Dentre os dois avaliados, MIX II apresentou melhor desempenho em induzir a produção de NO pelas células endoteliais do que MIX I. No modelo preventivo, foi observado que a produção de NO induzida pelos medicamentos estudados não se limitou somente a mistura de fármacos formada pelos MIXs, mas também pelo tratamento por 17β. Neste contexto, destacamos que maior significância pode ser atribuída para MIX II.

Outro fato que vale a pena ressaltar foi um importante aumento dos níveis de PGE₂ pelos medicamentos. Observando os nossos resultados, podemos verificar

que tanto no modelo terapêutico quanto no modelo preventivo, houve elevação significativa nos níveis de PGE_2 e dentre os dois modelos apresentados, o modelo preventivo foi quem mais influenciou a geração desta prostaglandina. Ao verificar este grupo, destaca-se a ação do MIX II sobre a maior indução de aumento da produção de PGE_2 , quando comparado ao MIX I e com os demais tratamentos onde os medicamentos foram adicionados de maneira individual.

No entanto, a literatura apresenta poucos dados sobre a produção de NO e PGE_2 por esta combinação de estrógeno e progesterona utilizada neste estudo.

De qualquer forma, o que podemos observar de acordo com nossos resultados foi que os contraceptivos orais combinados contendo Etinilestradiol+Levonorgestrel e Valerato de Estradiol e Dienogest promoveram efeito protetor sobre as células endoteliais em cultura, uma vez que os níveis de NO se mantiveram elevados durante o tempo de exposição de 24 horas e os níveis de PGE_2 aumentaram para o modelo experimental proposto. Dentre as duas formulações avaliadas, o contraceptivo contendo a progesterona Dienogest e o componente estrogênico Valerato de Estradiol apresentou resultados significativos do que o contraceptivo contendo Levonorgestrel e Etinilestradiol.

HERMENEGILDO (2005) demonstrou o aumento significativo nos níveis de PGE_2 em HUVEC após estimulá-las com fitoestrógenos (daidzeína e genisteína). Segundo os resultados obtidos, 0,1 e 1 μM destes fitoestrógenos foram suficientes para aumentar significativamente a produção de PGE_2 nas culturas de HUVEC em um modelo utilizando LPS como agente estimulatório por 48 horas de produção. De maneira semelhante, a regulação dos níveis de COX-2 (uma enzima induzível) em células endoteliais pré-tratadas com fitoestrógenos e posteriormente estimuladas com LPS foi observado por HERTRAMPF et al. (2005). HERTRAMPF e colaboradores revelaram que um dos possíveis mecanismos de regulação de produção deste eicosanoide se deu pela modulação de micro RNA envolvido na expressão de COX 2 (Cox-2 mRNA) após realizar um estudo onde o Estradiol foi o controle comparativo juntamente com fitoestrógenos.

Dentro do contexto cardiovascular, estudar a ação de substância sobre a produção de fatores vasoativos derivados do endotélio tem ganhado mais atenção nas últimas décadas. O uso de contraceptivos orais combinados e o desejo de se criar uma formulação ideal leva a ciência à busca por esclarecer novos mecanismos pelos quais os andrógenos regulam a produção destes fatores. Além disso, nosso

estímulo para a produção de prostaglandina em HUVEC foi de maneira semelhante aos resultados obtidos por GARCIA-MARTINEZ et al., (2003), onde soro de mulheres pós-menopausadas tratadas com uma mistura de fitoestrogénos, revelou estimular a produção de prostaglandina.

A estimulação de PGE_2 obtida com fitoestrógenos é de um nível semelhante ao obtido após exposição de HUVEC ao 17β ou outros tipos de progesteronas (HERMENEGILDO et al., 2005), embora as concentrações de fitoestrógenos necessárias para atingir os mesmos níveis são de aproximadamente 100 vezes maior do que aqueles para os esteroides utilizados em nosso estudo.

Nossos resultados com hormônios revelaram aumento significativo na produção de NO pelas células endoteliais em cultura. Não encontramos na literatura nenhum trabalho elucidando o papel deste novo progestágeno Dienogest sobre a produção de fatores vasoativos derivados do endotélio.

O papel do NO está inserido dentro do contexto da disfunção endotelial. Alterações nos níveis de NO podem resultar em isquemia do tecido (particularmente durante o estresse), isquemia do miocárdio e também ter efeitos nefastos em longo prazo sobre o remodelamento vascular (ARABIAN, 2015).

LISSIN (2000) afirmou que fitoestrógenos são um grupo de substâncias alimentares com estruturas similares ao estradiol, um hormônio esteroide que aumenta a atividade da eNOS e produção de NO pela célula endotelial. YAMAGUSHI (2001) demonstrou que fitoestrógenos podem aumentar a síntese de NO endotélio-dependente e relaxamento na aorta isolada de ratos. KARAMSETTY (2001), demonstrou efeito semelhante em artérias pulmonares isoladas de ratos cronicamente hipóxicos. Da mesma forma, a lesão de isquemia-reperfusão miocárdica global é atenuada em corações de ratas alimentadas com uma dieta suplementada com fitoestrógeno (ZHAI, 2001).

Desde 1985 se iniciou uma investigação acerca das funções de células endoteliais no sistema vascular. Ao longo destas últimas três décadas tem-se enfatizado que o endotélio não é meramente uma barreira física passiva entre o sangue e os tecidos, mas sim um modulador importante da reatividade do compartimento liso vascular subjacente que, por sua vez responde a vários compostos endógenos vasoativos. O evento seminal neste campo foi a descoberta de até então um peptídeo derivado de endotélio que causou vasoconstrição

coronária (YANAGISAWA, 1988), onde mais tarde passou a ser conhecido como endotelina.

Sabe-se que as endotelinas realizam uma variedade de funções fisiológicas e fisiopatológicas, as quais estão inseridas diretamente na biologia vascular, e que desde então, vem sido referenciadas na hipertensão, aterosclerose, doenças cardíacas (hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva), doença pulmonar, doença renal, e muitos outros. Adicionalmente, as endotelinas estão envolvidas em muitos outros processos importantes, tais como a biologia do câncer, a cura de feridas, e até mesmo a neurotransmissão.

A endotelina-1 (ET-1) foi originalmente isolada a partir de células endoteliais de aorta de suínos em 1988. Estruturalmente a endotelina é um peptídeo cíclico de 21 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto que unem os aminoácidos cisteína (posições 1-15 e 3-11) na extremidade N-terminal e aminoácidos hidrofóbicos na extremidade C-terminal do peptídeo (BATISTTINI, 1993).

Curiosamente, a ET-1 parece ser o único membro da família liberado pelo endotélio vascular mediante estímulos inflamatórios, atuando desta forma através da ligação para um dos pelo menos dois receptores de endotelina encontrado no músculo liso vascular (MLV) e células endoteliais, de maneira que a sua atuação pode ocorrer autócrina ou parácrinamente (BATISTTINI, 1993).

Nossos resultados revelaram que a diminuição dos níveis de ET-1 foi ocasionada independentemente da utilização dos medicamentos isolados ou em mistura. Observamos que dentre os ensaios utilizados, MIX II exerceu melhor papel na redução da produção de ET-1 pelas células endoteliais quando comparado aos demais grupos de tratamentos. Comparando estes resultados por nós obtidos com outros estudos, pesquisadores demonstraram que não somente prostaglandina e NO são capazes de antagonizar a vasoconstrição promovida por ET-1, (figura 25), mas que também outros fatores vasoativos tão potentes como estes, tais como relaxina (um hormônio da gravidez) a grelina (DSCHIETZIG et al., 2003).

DE ANDRADE e colaboradores (2014), encontrou diferença significativa na redução da produção de ET-1 após estimular HUVEC com extrato de soja biotransformado, genisteína e daidzeína.

Acreditamos que o aumento de NO e PGE₂ foram fatores cruciais para a redução da produção de ET-1, pois não obstante, os fatores vasoativos são particularmente os mais importantes para promover inibição da síntese de ET-1,

reduzindo a expressão de mRNA pro-ET-1 de células endoteliais (BARKER et al., 2002).

Sabe-se que a resposta a produção de ET-1 está diretamente ligada a estimulação de receptores ETB endoteliais ligados a diferentes vias de sinalização que ainda necessitam serem conhecidas em detalhe (D'ORLE'ANS-JUSTE et al., 2002; DE ANDRADE, 2014).

Figura 25: Síntese de ET e sua regulação. A liberação de ET-1 ativa é controlada através da regulação da transcrição de gene e/ou a conversão de endotelina pela atividade da enzima. Síntese de ET-1 é estimulada por vários fatores, dos quais hipoxia parece ser o mais potente em humanos. Formação de ET-1 é sub-regulada por ativadores da via NO / cGMP e outros fatores. **Fonte: Brunner et al., Elsevier, 2006.**

Em resumo, nos vasos sanguíneos normais, há um equilíbrio entre a produção de NO endotelial, prostaglandina e ET-1. BRUNNER (2006) constatou que

“[...] a capacidade de NO e outros peptídeos vasodilatadores, constantemente agem de maneira a reduzir a produção de ET-1, conferindo ao endotélio um tom constritor-dilatador. No entanto, em estados patológicos, tanto NO e ET-1 podem ter a sua produção desregulada para mais ou para menos.”

HALL et al., (2005) demonstrou durante um estudo experimental com isoflavonas derivadas de soja, que marcadores endoteliais da disfunção endotelial, dentre eles ET-1, estavam diminuídos no plasma de mulheres na pós menopausa, que faziam uso de dieta enriquecida com fitoestrógenos. Dentro deste contexto, a literatura aponta que fitoestrógenos podem ter a capacidade de atenuar respostas inflamatórias em células endoteliais.

7.5. Contraceptivos Orais Combinados Reduziram a Expressão de Fator Tecidual (TF) em Cultura de HAEC

Nosso modelo experimental, tendo como agente estimulatório o $TNF\alpha$, avaliou pela primeira vez a ação de um novo progestágeno em comparação com um contraceptivo de segunda geração sobre células extraídas de artéria humana e cultivadas *in vitro*.

O perfil antitrombótico é claramente associado com o componente estrogênico presente nestas formulações. Segundo ESHRE (2013) a potencial condição para o risco do desenvolvimento de trombose durante terapia hormonal está associada à dose de estrógeno e o tipo de progesterona inserida na formulação. Embora os fatores circunstanciais que aumentam o risco de trombose incluem a idade, imobilização, cirurgia, gravidez, contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e condições inflamatórias (DAHLBÄCK, 2008), sabe-se que progesteronas são capazes de diminuir a estrogenicidade da formulação, além de serem eficientes em contrabalancear os efeitos trombóticos que podem ser induzidos pelo estrógeno.

Figura 26: Início da cascata de coagulação por fator tecidual. **Fonte:** John C. Marshall. **The coagulation cascade in sepsis.** Nature Reviews Drug Discovery **2**, 391-405 (May 2003).

O papel de TF na promoção do tromboembolismo é bem aceito, pois a inibição de TF por anticorpo anti TF ou aplicação de TFPI (na clínica) reduz a formação do trombo em diferentes modelos de trombose (DELGIUDICE, 2009). DAY e colaboradores (2005) descreveram o papel do TF na parede vascular tendo como modelo a artéria carótida de camundongos onde se observou redução na expressão do TF que foi modificado geneticamente nas células dos vasos ou nocaute de TF em células da musculatura lisa vascular (VSMC = *vascular smooth muscle cells*). Nestes casos o tempo de oclusão trombótica foi grandemente prolongado.

Uma outra condição envolvendo o papel do TF é durante o processo inflamatório. Dados na literatura sugerem que as ações diretas de estrogênio sobre os vasos sanguíneos contribuem substancialmente para os efeitos protetores do estrógeno sobre o sistema cardiovascular (MENDELSON, 2000). Além da vasculatura; tecidos reprodutivos, ossos, fígado e cérebro são hoje reconhecidos como alvos importantes de ação do estrogênio.

Várias linhas de pesquisa revelam que a coagulação/trombose *in vivo* é dependente de inflamação. Alguns fatores de coagulação como FVIIa, FXa e Fibrina, são detectáveis durante o processo inflamatório. Além disso, sabe-se que deficiências de anticoagulantes naturais (por exemplo, via do inibidor do fator tecidual (TFPI), antitrombina (AT III), e proteína C ativada) muitas vezes são fatores cruciais para ocasionar uma coagulação intravascular disseminada (CID) (IVERSEN et al., 2000). Diante deste fato, com essa noção de coagulação dependente de inflamação, a anticoagulação prontamente resulta em efeitos anti-inflamatórios *in vivo* e *in vitro*.

O papel do TF na inflamação pode ser elucidado em modelo experimental de artrite (BUSSO et al., 2008), o qual é caracterizado por elevados níveis plasmáticos de IL-6, acompanhado de edema e superprodução de fibrina e a agregação de plaquetas. Além do mais, IL-1 β (uma citocina pró-inflamatória) pode induzir a expressão de TF durante o processo inflamatório (PULHMANN et al., 2005). Por outro lado, sabe-se que a deficiência de TF permite reduzir a inflamação (LUYENDYK et al., 2010).

Alterações hemostáticas têm sido implicadas no risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e tromboembolismo em mulheres usuárias de hormônio terapia. No entanto os mecanismos envolvidos ainda não são claros (NATH and SITRUK-WARE, 2009; KOH and YOON, 2006).

Nossos resultados revelaram que a expressão de TF foi controlada pela adição dos medicamentos isolados e em mistura, sendo que dentre estes, MIX II teve melhor desempenho quando comparado aos demais tratamentos.

JEANETTE et al., (2013) revelaram durante um de seus experimentos com HUVEC, onde 17 β Estradiol foi adicionado às culturas juntamente com acetato de noretisterona, que a expressão de TF em HUVEC após 24 horas de incubação com as drogas foi regulada para menos pela ação destes hormônios. Os nossos resultados em cultura de HAEC, demonstraram que 17 β -estradiol promoveu diminuição significativa da expressão de TF antes e depois de um estímulo inflamatório

No entanto, JEANETTE e colaboradores constataram que a maior regulação foi obtida pela progestina acetato de noretisterona. Além disso, fibrinogênio e VII mRNA foi regulada entre 2 a 4 vezes para menos pelos hormônios estradiol e

estrona. A expressão de TF (o principal gatilho para a produção de trombina) foi regulada para menos, ou seja; reduziu sua expressão.

Um estudo recente também mostrou que a produção de trombina endógena em usuárias de terapia hormonal oral foi correlacionada com os níveis de estrona (BAGOT, 2010).

O papel de progestágenos na mediação do risco de trombose venosa e arterial é um fenômeno bem conhecido na contracepção oral pelas usuárias e recentemente foi implicada no risco de trombose venosa (TV) e trombose arterial (TA) durante terapia hormonal por algumas mulheres no pós-menopausa (CANONICO et al., 2008; LALIBERTE, 2010).

Desta forma, pudemos constatar que os contraceptivos utilizados neste trabalho promoveram um efeito protetor no endotélio vascular nos dois modelos utilizados por nós (HUVEC em células venosas e HAEC em células arteriais), uma vez que os níveis de TF expressos após estímulo inflamatório foram reduzidos pelos diferentes estrógenos e progesteronas isolados e em mistura.

Ressaltamos que por se tratar de um estudo experimental comparativo *in vitro*, pesquisas *in vivo* são necessárias para confirmar os resultados que aqui foram obtidos.

8. Conclusões

8. CONCLUSÕES

- A. Realizamos a padronização da extração e do cultivo de células endoteliais extraídas de cordão umbilical humano, bem como a sua identificação e caracterização por imunofenotipagem CD 31+, o que garantiu a qualidade dos experimentos executados;
- B. Através de um modelo inflamatório, realizamos a padronização do tempo de estímulo ideal por LPS em HUVECs para a quantificação da produção de moléculas de adesão nos sobrenadantes e expressas na superfície celular para este modelo, o tempo escolhido foi de 24 horas, com concentração de 1µg/mL [LPS];
- C. Os medicamentos isolados e em mistura (MIXs) demonstraram exercer efeito protetor sobre as duas linhagens de células endoteliais. Este efeito foi observado entre as diferentes dosagens dos fatores vasoativos, hemostáticos e inflamatórios;
- D. Dentre todos os MIXs avaliados, observamos que neste trabalho, MIX II (Dienogest + 17β Estradiol) exerceu maior influência na diminuição dos níveis de VCAM-I, ICAM-I, E-Selectina – tanto no sobrenadante quanto na superfície celular;
- E. Fatores vasoativos tais como NO e PGE2 elevaram-se durante os tratamentos medicamentosos isolados e em mistura. ET-1 teve a produção diminuída pelos medicamentos;
- F. IL1β e IL-6 e mostraram-se estar diminuídas nos dois modelos experimentais. Dentre os medicamentos avaliados, MIX II apresentou redução mais significativa quando comparado a MIX I, porém de modo geral, levonorgestrel se mostrou estatisticamente significativo na redução desta citocina;

G. Fator tecidual em HAEC teve a sua expressão diminuída pelos medicamentos isolados e em mistura, porém a maior redução foi atribuída ao tratamento por MIX II;

9. Referências

9. REFERÊNCIAS

ANDRADE, C.M.; TORQUETI, M.R. Effects of phytoestrogens derived from soy bean on expression of adhesion molecules on HUVEC. 15:18-194. **Climacteric** 2012;

APPT, SE. Usefulness of monkey model to investigate the role soy in postmenopausal women's health p. 200-211. **ILAR J**, 2004.

ARABIAN M.; ABOUTALEB N.; SOLEIMANI M.; MEHRJERDI F.Z.; AJAMI M.; PAZOKI-TOROUDI H. Role of morphine preconditioning and nitric oxide following brain ischemia reperfusion injury in mice. **Iran J Basic Med Sci.** ,2015.

ARDITI M.; ZHOU J.; DORIO R.; RONG G.W.S.; GOYERT M.; KIM K. S. Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. **Infect. Immun.** 1993.

BADIMON L.; STOREY R.F.; VILAHUR G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. **Thromb Haemost.** 2011.

BATTISTINI B; D'ORLEANS-JUSTE P.; SIROIS P. **Lab. Invest.** 1993.

BAGOT C.N.; MARSH M.S.; WHITEHEAD M.; SHERWOOD R.; ROBERTS L.; PATEL R.K. et al. The effect of estrone on thrombin generation may explain the different thrombotic risk between oral and transdermal hormone replacement therapy. **J Thromb Haemost**, 2010.

BARKER S.; LEES D.M.; WOOD E.G.; CORDER R. Inhibitory effect of adrenomedullin on basal and tumour necrosis factor alpha-stimulated endothelin-1 synthesis in bovine aortic endothelial cells is independent of cyclic AMP. **Biochem Pharmacol**, 2003.

BARTON M; PROSSNITZ E.R. Emerging roles of GPER in diabetes and atherosclerosis. **Trends Endocrinol Metab**, 2015.

BEVILACQUA M.P.; POBER J.S.; MENDRICK D.L.; COTRAN R.S.; GIMBRONE M. A. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1987.

BILGIR O.; KEBAPCILAR L.; BILGIR C.T.F. et al. The effect of ethinylestradiol (EE) / cyproterone acetate (ACA) and EE/CA plus metformin treatment on adhesion molecules in cases with polycystic ovary syndrome. **Internal Med**; 2009.

BREITHAUPT-FALOPPA A.C.; FANTOZZI T.E.; ROMERO C.; RODRIGUES A.; DE SOUSA P.T.; FRANCO L.S.A.; OLIVEIRA-FILHO R.M.; BORIS V.T. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. **Shock**.2014.

BRUNNER F.; OPIE L. H. Role of endothelin-A receptors in ischemic contracture and reperfusion injury. **Circulation**, 1998.

BURGER D.; DAYER J.M. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. **Ann N Y Acad Sci.**, 2002.

BUSSO N. ; CHOBAS-PECLAT V.; HAMILTON J.; SPEE P.; WAGTMANN N. ; SO A. Essential role of platelet activation via protease activated receptor 4 in tissue factor-initiated inflammation. **Arthritis Research and Therapy**, 2008.

BUTENAS S. KRUDYSZ-AMBLO J. Decryption of tissue factor. **Thromb Res.**; 2012.

CANONICO M.; PLU-BUREAU G.; LOWE G.D.; SCARABIN P.Y. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. **BMJ**; 2008.

CHAN A.; SINGH A.J.; NORTHCOTE P.T.; MILLER J.H. Inhibition of human vascular endothelial cell migration and capillary-like tube formation by the microtubule-stabilizing agent peloruside A. **Invest New Drugs**. 2015.

CLARKSON T.B.; ANTHONY M.S.; MORGAN T.M. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. **J Clin Endocrinol Metab.**; Jan 2001.

CLOONAN L.; FITZPATRICK K.M.; KANAKIS A.S.; FURIE K.L.; ROSAND J.; ROST N.S. Metabolic determinants of white matter hyperintensity burden in patients with ischemic stroke. **Atherosclerosis.**; 2015.

COLLINS, R.G.; VELJI, R. GUEVARA, N.V. HICKS, M.J, CHAN, L.; BEAUDET, A.L. P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM-I) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, 2000.

COOKE JP. The endothelium: a new target for therapy. **Vasc Med**; 2000.

D'ORLE'ANS-JUSTE, P.; LABONTE J.; BKAILY G.; CHOUFANI S.; PLANTE M.; HONORE J.C. Function of endothelinB receptor in cardiovascular physiology and athophysiology. **Pharmacol Ther**, 2002.

DAHLBÄCK B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. **Blood.** ;2008.

DAÍ W.; KLONER R.A. Relationship between cyclooxygenase-2 inhibition and thrombogenesis. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, 2004.

DAUPHINEE S.M.; KARSAN A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Lab Invest.** , 2006.

DAVIE E.W.; & RATNOFF O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, 1964.

DAY S.M.; REEVE J.L.; PEDERSEN B. et al. Macrovascular thrombosis is driven bt tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. **Blood**, 2005.

DE ANDRADE C.M.; SÁ M.F.S.; TOLOI M.R.T. Effects of phytoestrogens derived from soybean on expression of adhesion molecules on HUVEC. **Climacteric**; 2012.

DE ANDRADE C.M.; BIANCHINI F.J.; REY F.M.; FONSECA M.J.; TOLOI M.R. Effects of aglycone-zich biotransformed soybean extract in human endothelial cells. **Climacteric**, 2014.

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**, 1995.

_____.Anticoagulants in heart disease: current status and perspectives. **Eur Heart J**, 2007.

DELGIUDICE L. A.; WHITE G. A. The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in health and disease states. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 2009.

De MACEDO G.F.K.; DIAS S.F.R.; QUEIROZ R.V.; ALFREDO G.A.J. Cowpea protein reduces LDL-cholesterol and apolipoprotein B concentrations, but does not improve biomarkers of inflammation or endothelial dysfunction in adults with moderate hypercholesterolemia. **Nutr Hosp**, 2015.

De NUCCI G.; THOMAS R.; D'ORLE'ANS-JUSTE P.; ANTUNES E.; WALDER C.; WARNER T.D. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proc Natl Acad Sci**, 1988.

Di NISIO M.; MIDDELDORP S.; BÜLLER H.R. Direct thrombin inhibitors. **N Engl J Med**. ,2005.

DSCHIETZIG, T.; BARTSCH, C.; RICHTER, C.; LAULE, M.; BAUMANN, G.; STANGL K. Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist—Attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin Type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor- κ B. **Circ Res**, 2003.

DHAUN N.; YUZUGULEN J.; KIMMITT R.A.; WOOD E.G.; CHARITYAVILASKUL P.; MACINTYRE I.M.; GODDARD J.; WEBB D.J.; CORDER R. Plasma pro-endothelin-1 Peptide concentrations rise in chronic kidney disease and following selective endothelin a receptor antagonism. **J Am Heart Assoc**. ,2015.

ESHRE CAPRI Workshop Group. Venous thromboembolism in women: a specific reproductive health risk. **Hum Reprod Update**; 2013.

ESMON, C.T. The protein C pathway. **CHEST**. ,2003.

FERRARIO C.M. & STRAWN WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. **Am J Cardiol**., 2006.

FRUZZETTI F.; TREMOLLIERS F.; BITZER J. An overview of the development of combined oral contraceptives containing estradiol: focus on estradiol valerate/dienogest. **Gynecological Endocrinology**,2012.

GARCÍA-MARTÍNEZ M.C.; HERMENEGILDO C.; TARÍN J.J.; CANO A. Phytoestrogens increase the capacity of serum to stimulate prostacyclin release in human endothelial cells. **Acta Obstet Gynecol Scand**,2003.

GIANTURCO L.; BODINI BD.; ATZENI F.; COLOMBO C.; STELLA D.; , SARZI-PUTTINI P.; DRAGO L.; GALAVERNA S.; TURIEL M. Cardiovascular and autoimmune diseases in females: The role of microvasculature and dysfunctional endothelium. **Atherosclerosis**. 2015.

GRANGER J.P. Inflammatory cytokines, vascular function, and hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** ,2004.

GUETTA V.; QUYYUMI A.A.; PRASAD A.; PANZA J.A.; WACLAWIW M.; CANNON R.O.The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. **Circulation**,1997.

GUIDA, M.; BIFULCO, G.; DI SPIEZIO SARDO, A.; SCALA, M.; FERNANDEZ, L.M.; NAPPI, C. Review of the safety, efficacy and patient acceptability of the combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill. **International Journal of Womens Health**, 2010.

HAILMAN, E.; LICHENSTEIN H.S.; WURFEL M.M.; MILLER D.S.; JOHNSON D. A.; KELLEY M.; BUSSE L.A.; ZUKOWSKI M.M.; WRIGHT S.D. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14, **J. Exp. Med**,1994.

HALL W.L.; VAFEIADOU K.; HALLUND J.; BÜGEL S.; KOEBNICK C.; REIMANN M.; FERRARI M.; BRANCA F.; TALBOT D.; DADD T.; NILSSON M.; DAHLMAN-WRIGHT K.; GUSTAFSSON J.A.; MINIHANE A.M.; WILLIAMS C.M. Soy-isoflavone-enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular disease risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. **Am J Clin Nutr** ,2005.

HAMMOND, G.L.; RABE, T.; WAGNER, J.D. Preclinical profiles of progestins used in formulations of oral contraceptives and hormone replacement therapy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 2011.

HERMENEGILDO C.; OVIEDO P.J.; GARCIA-PEREZ M.A.; TARIN J.J.; CANO A. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. **J Pharmacol Exp Ther** ,2005.

HERTRAMPF T.; SCHMIDT S.; LAUDENBACH-LESCHOWSKY U.; SEIBEL J.; DIEL P. Tissue-specific modulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the uterus and the v. cava by estrogens and phytoestrogens. **Mol Cell Endocrinol** ,2005.

HUO, Y.; LEY, K.. Adhesion molecules and atherogenesis. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, 2001.

HOU X.; PEI F. Estradiol Inhibits Cytokine-Induced Expression of VCAM-1 and ICAM-1 in Cultured Human Endothelial Cells Via AMPK/PPAR α Activation. **Cell Biochem Biophys.** 2015.

IVERSEN N.; STREKERUD F. G.; AND ABILDGAARD U. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in disseminated intravascular coagulation: low levels of the activated factor X-TFPI complex. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, 2000.

IWASA T.; MATSUZAKI T.; TUNGALAGSUV D A.; MUNKHZAYA M.; KAWAMI T.; KATO T.; KUWAHARA A.; YASUI T.; IRAHARA M. Effects of ovariectomy on the inflammatory responses of female rats to the central injection of lipopolysaccharide. **J Neuroimmunol.** ,2014.

JAFFE E.A.; NACHMAN R.L.; BECKER C.G.; MINICK C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. **J Clin Investig**,1973.

JEANETTE F. BROSNAN; BRIAN L.SHEPPARD; L.A. KELLY; JOHN J. O'LEARY; LUCY A.NORRIS. Norethisterone acetate alters coagulation gene expression in vitro in human cell culture. **Thrombosis Research**, 2013.

JILMA B.; JOUKHADAR C.; DERHASCHNIG U.; RASSOUL F.; RICHTER V.; WOLZT M.; DORNER G.T.; PETTERNEL V.; WAGNER O.F. Levels of adhesion molecules do not decrease after 3 months of statin therapy in moderate hypercholesterolaemia. **Clin Sci.** ,2003.

KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood**,1996.

_____.Selectins and their ligands: currents concepts and controversies. **Blood**, 1996.

KARAMSETTY M.R.; KLINGER J.R.; HILL N.S. Phytoestrogens restore nitric oxide-mediated relaxation in isolated pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther**,2001.

KHAKSARI M.; KESHAVARZI Z.; GHOLAMHOSEINIAN A.; BIBAK B. The effect of female sexual hormones on the intestinal and serum cytokine response after traumatic brain injury: different roles for estrogen receptor subtypes. **Can J Physiol Pharmacol.**,2013.

KHOSRAVISAMANI M.; MALIJI G.; SEYFI S.; AZADMEHR A.; NIKFARJAM A.B.D. B.; MADADI S.; JAFARI S. Effect of the menstrual cycle on inflammatory cytokines in the periodontium. **J Periodontal Res.**,2014.

KILIC I.D.; FINDIKOGLU G.; ALIHANOGLU Y.I.; YILDIZ B.S.; USLU S.; ROTA S.; EVRENGUL H. Circulating adhesion molecules and arterial stiffness. **Cardiovasc J Afr.** ,2015.

KIM E.; KIM O.V.; MACHLUS K.R.; LIU X.; KUPAEV T.; LIOI J.; WOLBERG A.S.; CHEN D.Z.; ROSEN E.D.; XUA Z.; ALBER M. Correlation between fibrin network structure and mechanical properties: an experimental and computational analysis. **Soft Matter**; 2011.

KIM-SCHULZE S.; MCGOWAN K.A.; HUBCHAK S.C. et al. Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. **Circulation**;1996.

KUMMITHA C.M.; SHIRURE V.S.; DELGADILLO L.F.; DEOSARKAR S.P.; TEES D.F.; BURDICK M.M.; GOETZ D.J. HECA-452 is a non-function blocking antibody for isolated sialyl Lewis x adhesion to endothelial expressed E-selectin under flow conditions. **J Immunol Methods**., 2012.

KLUFT, C. Determination of prekallikrein in human plasma: optimal conditions for activating prekallikrein. **The Journal of Laboratorial and Clinical Medicine**. 1978.

KOH K.K.; YOON B.K. Controversies regarding hormone therapy: Insights from inflammation and hemostasis. **Cardiovasc Res** ,2006.

LALIBERTE F.; DEA K.; DUH M.S.; KAHLER K.H.; ROLLI M.; LEFEBVRE P. Does the route of administration for estrogen hormone therapy impact the risk of venous thromboembolism? Estradiol transdermal system versus oral estrogen-only hormone therapy. **Menopause**,2011.

LAMAS A.Z.; CALIMAN I.F.; DALPIAZ P.L.; DE MELO A.F.J.R.; ABREU G.R.; LEMOS E.M.; GOUVEA S.A.; BISSOLI N.S. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. **Life Sci** ,2015.

LEFKOWITZ J.B. Coagulation Pathway and Physiology. In: Hemostasis Physiology. **JB Lippincott**, 2006.

LEE D.Y.; KIM J.Y.; KIM J.H.; CHOI D.S.; KIM D.K.; KOH K.K.; YOON B.K. Effects of hormone therapy on ambulatory blood pressure in postmenopausal Korean women. **Climacteric** ,2011.

LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature** ,2002.

LISSIN L.W.; COOKE J.P. Phytoestrogens and cardiovascular health. **J. Am.Coll. Cardiol**,2000.

LIU, Y. et al,. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interaction and signaling events. **Journal of Immunology**, Baltimore, 2004.

LIU M.M.; FLANAGAN T.C.; LU C.C.; FRENCH A.T.; ARGYLE D.J. Corcoran BMCulture and characterisation of canine mitral valve interstitial and endothelial cells. **Vet J**, 2015.

LORENZI T.F. Atlas de hematologia – Clinica Hematológica Ilustrada. Textbook. **Guanabara Koogan**, 2006.

LUYENDYK J. P., SULLIVAN B. P., GUO G. L., AND WANG R.. Tissue factor-deficiency and protease activated receptor- 1-deficiency reduce inflammation elicited by diet-induced steatohepatitis in mice. **American Journal of Pathology**, 2010

MACKMAN N.; TAUBMAN M. Tissue factor: past, present, and future. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**,2009 .

MASTERS S.L.; LATZ E.; O'NEILL L.A. The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. **Sci Transl Med** ,2011.

MATTSBY-BALTZER I.; ROSEANU A.; MOTAS C.; ELVERFORS J.; ENGBERG I.; HANSON L.A. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxininduced interleukin-6 response in human monocytic cells. **Pediatr**,1996.

MENDELSON M.E; KARAS R.H. Estrogen and the blood vessel wall. **Curr Opin Cardiol**; 1994.

_____.Comparison of pharmacodynamic properties of various estrogen formulations. **Am J Obstet Gynecol**; 1982.

_____.Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2000.

_____.Mechanisms of disease: the protective effects of estrogen on the cardiovascular system, **Nem Eng. J. Med.**,1999.

_____. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2000.

_____. Rapid progress for non-nuclear estrogen receptor signaling. **J Clin Invest.**,2010.

MIDDELDORP S.; MEIJERS J.C.; VAN DEN ENDE A.E.; VAN ENK A.; BOUMA B.N.; TANS G.; ROSING J.; PRINS M.H.; BÜLLER H.R. Effects on coagulation of levonorgestrel- and desogestrel-containing low dose oral contraceptives: a cross-over study. **Thromb Haemost**,2000.

MITROULIS I.; ALEXAKI V.I.; KOURTZELIS I.; ZIOGAS A.; HAJISHENGALLIS G.; CHAVAKIS T. Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. **Pharmacology & Therapeutics**, 2015.

MOSMANN T.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**,1983 .

MOMBOULI J.V.; VANHOUTTE P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**, 1999.

NAKASHIMA M.; & VANHOUTTE P.M. Endothelin-1 and -3 cause endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. **Am J Physiol**,1993.

NAPPI R.E.; SERRANI M.; JENSEN J.T. Noncontraceptive benefits of the estradiol valerate/dienogest combined oral contraceptive: a review of the literature. **Int J Womens Health.** ,2014.

NATH A.; SITRUK-WARE R. Different cardiovascular effects of progestins according to structure and activity. **Climacteric**,2009.

NAUCK M. et al. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**,1997.

ODLIND V.; MILSOM I.; PERSSON I.; VICTOR A. Can changes in sex hormone binding globulin predict the risk of venous thromboembolism with combined oral contraceptive pills? **Acta Obstet Gynecol Scand**,2002.

PARKE S.; JUNGE W.; MELLINGER U.; DUIJKERS I.; KLIPPING C. Comparative effects of a four-phasic regimen of estradiol valerate/dienogest versus ethinylestradiol/levonorgestrel on haemostatic parameters. **Hum Reprod**;,2008.

PARKE S.; NAHUM G.G.; MELLINGER U.; JUNGE W.; Metabolic effects of a new fourphasicoral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest. **Obstet Gynecol** ,2008.

PAULO, M.; SALVADOR, M.M.; DOS ANJOS NETO FILHO M.; MONTES, M.B.; FRANCESCHINI, S.A.; TOLOI, M.R.T. Effect of isoflavones extract on human endothelial cell damage and nitric oxide production. **Menopause**,2009.

PETITTI D.B. Clinical practice. Combination estrogen-progestin oralcontraceptives.**The New England Journal of Medicine.** 2003.

POSTON R.N.; HASKARD D.O.; COUCHER J.R.; GALL N.P.; & JOHNSON-TIDEY R.R. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. **Am J Pathol**,1992.

PUGIN J.; SCHURER-MALY C.C.; LETURCQ D.; MORIARTY A.; ULEVITCH R.J.; TOBIAS P.S. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. **Proc. Natl. Acad. Sci.**,1993.

PUCHNER A.; BLÜML S. IL-6 blockade in chronic inflammatory diseases. **Wien Med Wochenschr** ,2015.

PUHLMANN M.; WEINREICH D. M.; FARMA J. M.; CARROLL N. M.; TURNER E. M.; AND ALEXANDER H. R. JR. Interleukin-1 β induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. **Journal of Translational Medicine**, 2005.

QIAOLI L.; FANG Y.; XIAODONG C.; JIN'AO D.; QINAN W. ; PRAKASH N.; DAPING F. Sparstolonin B suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. **Arch. Pharm. Res**, 2013.

RIDKER P.M. Are statins anti-inflammatory? Issues in the design and conduct of the pravastatin inflammation C-reactive protein evaluation. **Curr Cardiol Rep**,2000.

ROSENDAAL F.R. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**,2005.

SAYANI F.A.; ABRAMS C.S. How I treat refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood**, 2015.

SITIA S.; TOMASONI L.; ATZENI F.; AMBROSIO G.; CORDIANO C.; CATAPANO A.; TRAMONTANA S.; PERTICONE F.; NACCARATO P.; CAMICI P.; PICANO E.; CORTIGIANI L.; BEVILACQUA M.; MILAZZO L.; CUSI D.; BARLASSINAC.;SARZI-PUTTINIP.; TURIEL M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. **Autoimmun Rev**. 2010.

SCHNEIDER M.P.; BOESEN E.I.; POLLOCK D.M. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**,2007.

SHIBATA H.; SPENCER T.E.; ONATE S.A.; JENSTER G.; TSAI S.Y. et al., Role of co-activators and co-receptors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action, Recent Prog. **Hormone Res**,1997.

SHIRAI T.; HILHORST M.; HARRISON D.G.; GORONZY J.J.; WEYAND C.M. Macrophages in vascular inflammation - From atherosclerosis to vasculitis. **Autoimmunity**, 2015.

SHISHEHBOR M.H.; BHATT D.L. Inflammation and atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**.,2004.

SHIVERS K.Y.; AMADOR N.; ABRAMS L.; HUNTER D.; JENAB S.; QUIÑONES-JENAB V. Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. , 2015.

SITRUK-WARE R.; EL-ETR M. Progesterone and related progestins: potential new health benefits. **Climacteric**.,2013.

SPEROFF L.; FRITZ M.A. **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**,2005.

STOCCO B.; FUMAGALLI H.F.;FRANCESCHINI S.A.; MARTINEZ EZ, MARZOCCHI-MACHADO C.M.; TOLOI M.R. Drospirenone and levonorgestrel in combination with either 30 or 20 mcg ethinylestradiol reduce soluble adhesion molecules in Brazilian women; cross-sectional study. **Contraception**,2012.

SZÓSTEK A.Z.; ADAMOWSKI M.; GALVÃO A.M.; FERREIRA-DIAS G.M.; SKARZYNSKI D.J. Ovarian steroid-dependent tumor necrosis factor- α production and its action on the equine endometrium in vitro. **Cytokine**,2014

TOSTES R.C.; NIGRO D.; FORTES Z.B.; CARVALHO M.H. Effects of estrogen on the vascular system. **Braz J Med Biol Res**,2003

TRUSSELL J. Contraceptive efficacy. In: Hatcher RA, Trussell J, Stewart F, et al, editors. **Contraceptive Technology**, 2004.

VALLEJO S.; PALACIOS E.; ROMACHO T.; VILLALOBOS L.; PEIRÓ C.; SÁNCHEZ-FERRER C.F. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol.**, 2014.

van der Veen P.H. A theoretical model of biochemical control engineering based on the relation between oestrogens/progestagens and prostaglandins. **Med Hypotheses**. 2015.

van TILBURG N.H.; ROSENDAAL F.R.; BERTINA R.M. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. **Blood** , 2000.

WIEGRATZ I.; LEE J.H.; KUTSCHERA E.; WINKLER U.H.; KUHL H. Effect of four oral contraceptives on hemostatic parameters. **Contraception** , 2004.

WILSON A.M.; RYAN M.C.; BOYLE A.J. The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: risk marker or pathogen. **Int J Cardiol** , 2006.

WOLSKI H. [Selected aspects of oral contraception side effects]. **Ginekol Pol**, 2014.

YAMASHITA A.; MATSUDA S.; MATSUMOTO T.; MORIGUCHI-GOTO S.; TAKAHASHI M.; SUGITA C.; SUMI T.; IMAMURA T.; SHIMA M.; KITAMURA K.; ASADA Y. Thrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal intima of hyperlipidemic rabbits. **Atherosclerosis**. , 2009.

YAMAGUCHI K.; HONDA H.; WAKISAKA C.; TOHEI A.; KOGO H.. Effects of phytoestrogens on acetylcholine- and isoprenaline-induced vasodilation in rat aorta. **Jpn. J. Pharmacol**, 2001.

YANAGISAWA M.; KURIHARA H.; KIMURA S.; GOTO K.; MASAKI T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. **J Hypertens Suppl** , 1988.

ZHAI P.Y.; EURELL T.E.; COTTHAUS R.P.; JEFFERY E.H.; BAHR J.M.; GROSS D.R. Effects of dietary phytoestrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated female rat hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**, 2001.

ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.; AND R. J. ULEVITCH. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. **Immunol. Today** , 1993.

Apêndice

APÊNDICE I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Laboratório de Citologia Clínica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Resolução nº466/2012 do Conselho Nacional de Saúde)

Título do Projeto: Avaliação endotelial de formulações contraceptivas por parâmetros hemostáticos, vasoativos e inflamatórios.

Pesquisador responsável: Profª. Drª. Maria Regina Torqueti (torqueti@fcfrp.usp.br)

Telefones para contato: (16) 3315-4220 / (16) 3315-0653 / (16) 9-9133-6937

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE OU DE SEU RESPONSÁVEL LEGAL

Nome da paciente:

.....

Documento de identidade: (RG):(CPF):.....

Data de nascimento:/...../..... Idade (anos):

Endereço:

CEP:.....-..... Cidade:..... UF:.....

Fone:.....

Prezada voluntária:

A Senhora mãe está sendo convidada a participar como voluntária em uma pesquisa que precisa usar as células do cordão umbilical de recém-nascidos. O cordão umbilical é sempre jogado fora após o parto. A sua participação é autorizar que o cordão umbilical do seu filho, após o parto, seja doado para esta pesquisa. É necessário que a Senhora leia as informações sobre a pesquisa que estão logo abaixo neste documento. No caso de aceitar em fazer parte desta pesquisa, por gentileza, assine o seu consentimento ao final deste documento. A sua participação é voluntária e se não quiser participar, não haverá nenhum prejuízo para a Senhora ou para o seu atendimento. Se aceitar participar, nos colocamos à disposição para fornecer resultados referentes a esta pesquisa a qualquer momento que desejar, bem como garantimos que o seu nome nunca será divulgado nos resultados desta pesquisa. A Senhora não será remunerada para participar desta pesquisa.

DESCRIÇÃO DA PESQUISA À VOLUNTÁRIA, JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Neste trabalho de pesquisa, queremos avaliar duas formulações diferentes de pílula anticoncepcional disponíveis no mercado. É sabido que as pílulas anticoncepcionais apresentam efeitos colaterais, principalmente nos vasos sanguíneos. Para estudar o efeito das pílulas anticoncepcionais precisamos das células do cordão umbilical de recém-nascidos para imitar, no laboratório, as células dos vasos sanguíneos humanos. Então vamos comparar qual das duas pílulas anticoncepcionais desta pesquisa poderá causar menor efeito aos vasos sanguíneos. Para fazer esta pesquisa, nós precisamos que o cordão umbilical de recém-nascidos nos seja doado após o parto ao invés de ser jogado fora. O cordão umbilical somente nos será entregue ao final do parto, fora da sala de parto, quando a equipe de enfermagem levará o cordão para ser jogado fora. Ao invés disso, o cordão será usado para nossa pesquisa.

Necessitamos de cerca de 20 cm a 30 cm do cordão umbilical, que será utilizado para retirarmos as células que ficam no interior da veia umbilical deste cordão. O cordão umbilical será levado para a pesquisa que acontecerá no Laboratório de Citologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Após a retirada das células, o restante do cordão umbilical será jogado fora no nosso laboratório e não será guardado para outras pesquisas. Ressaltamos que faremos unicamente o uso do cordão como fonte de extração das células que compõe os vasos sanguíneos e nada mais.

A doação do cordão umbilical para a pesquisa não apresenta riscos previsíveis para a mãe e para o bebê, uma vez que a retirada do cordão umbilical é um procedimento normal do parto e o cordão será doado para a pesquisa somente no momento de ser jogado fora.

Mesmo após concordar em participar, você tem a liberdade de desistir da pesquisa a qualquer momento e poderá receber esclarecimentos sobre a pesquisa sempre que desejar. Para isso, é necessário avisar os pesquisadores nos telefones ou e-mail que aparecem no início deste documento. Em caso de dúvidas, você poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pelo e-mail cep@fcrp.usp.br ou pelo telefone (16) 3315-4213.

Você não receberá nenhuma remuneração e também não terá nenhuma despesa para participar desta pesquisa.

A sua participação será nos ajudar a estudar os efeitos de pílulas anticoncepcionais nos vasos sanguíneos.

Somente os resultados da pesquisa é que serão divulgados – nunca a sua identidade. Você deverá assinar duas vias deste documento, sendo que uma ficará com você e a outra com o pesquisador.

Declaro que, após ter sido devidamente esclarecida sobre a pesquisa, concordo em participar, autorizando a doação do cordão umbilical do meu filho(a) após o parto.

Ribeirão Preto, de de 20.....

Assinatura do Paciente ou Responsável Legal

Profa. Maria Regina Torqueti
Pesquisadora responsável FCFRP/USP

Douglas Sousa Amaral
Mestrando da FCFRP/USP

Anexos

ANEXO I

**Carta de Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CRSM-Mater HC/FMRP-USP**

**COMISSÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER
DE RIBEIRÃO PRETO - MATER**

**Ref.: Projeto de Pesquisa: Avaliação endotelial de formulações contraceptivas por
parâmetros hemostáticos, vasoativos e inflamatórios.**

Nº 008/2014

Douglas Sousa Amaral

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clínica do CRSM-Mater no dia 18/09/2014 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Com a ressalva de que o pesquisador poderá utilizar para a pesquisa apenas os 70% excedentes dos cordões umbilicais que não servem para a pesquisa do Hemocentro, tendo em vista que o Hemocentro tem a prioridade nas coletas dos cordões umbilicais.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

- 1- Apresentação do parecer do CEP antes do início da abordagem de potenciais sujeitos para o estudo
- 2- Apresentação de relatórios parciais (Anexo 3), semestralmente, indicando o andamento da pesquisa.
- 3- Apresentação de relatório final de pesquisa (Anexo 3) que deverá ser acompanhado de um resumo estruturado da mesma (uma lauda, contendo introdução, métodos, resultados e conclusões) para a documentação do projeto de pesquisa junto ao CRSM-Mater
- 4- Todos os procedimentos relacionados ao projeto de pesquisa que não estejam dentro da rotina do serviço deverão ser realizados pela equipe do projeto, não se utilizando de funcionários da instituição.

Atenciosamente,

DRª. ANA MÁRCIA SPANÓ NAKANO

Presidente da Comissão de Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher

Av. Wanderley Taffo, nº 330 – Quintino Facci II - CEP 14070-250 – Ribeirão Preto – SP
Fone: (16) 3962-8200 - Fax: (16) 3962-8213

ANEXO II

**Carta de Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
FCFRP-USP**

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

Of. CEP/FCFRP nº. 017/2015
kms

Ribeirão Preto, 7 de abril de 2015.

À
Profª. Drª. Maria Regina Torqueti
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO ENDOTELIAL DE FORMULAÇÕES CONTRACEPTIVAS POR PARAMETROS HEMOSTÁTICOS, VASOATIVOS E INFLAMATÓRIOS**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê de Ética em Pesquisa, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 371** foi aprovado *ad referendum* do CEP/FCFRP em 09/04/2015.

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. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO III

Certificado de Análise e Garantia da Qualidade (HAEC)

Gibco® by Life Technologies®

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT NAME: Human Aortic Endothelial Cells (HAEC)	Catalogue #: C-006-5C
--	------------------------------

Product Information

Description:	Human Aortic Endothelial Cells. Cryopreserved tertiary culture. $\geq 500,000$ cells/vial. For Research Use Only.
Lot Number:	919501
Donor Age/Sex:	41/Male
Storage Conditions:	Liquid Nitrogen

Required Testing and Results

Test	Specification	Result
Viable cells per vial	$\geq 500,000$	727,000
Viability by Trypan Blue exclusion	$\geq 70\%$ viable	91%
Growth rate in log phase	Check and record	1.3 pd/day
Long term growth performance in M200 + LSGS	≥ 16 population doublings (pd)	17
Immunofluorescent detection of von Willebrand factor	Positive	Pass
Immunofluorescent detection of CD31 antigen	Positive	Pass
Active uptake of Di-I-AcI-LDL	Positive	Pass
Immunofluorescent detection of α -actin	$\geq 97\%$ Negative	Pass
DNA fluorochrome assay for detection of mycoplasma	Not detected	Pass
Direct culture test for detection of mycoplasma	Not detected	Pass
PCR detection of HIV-1 virus	Not detected	Pass
PCR detection of Hepatitis B virus	Not detected	Pass
PCR detection of Hepatitis C virus	Not detected	Pass
Long-term antibiotic-, antimycotic-free culture for detection of bacteria, yeast and other fungi	Not detected	Pass

Signature:

Troy Brewster, Engineer, QA/QC

Date: 27 May 2011

The cells in this lot were derived from tissue obtained from accredited institutions. Consent was obtained by these institutions from the donor or the donor's legal next of kin, for use of the tissue and its derivatives for research purposes.

Caution: The user should treat all human cells as potential pathogens. Wear protective clothing and eyewear. Practice appropriate disposal techniques for potentially pathogenic or biohazardous materials.

For research use only. Not intended for human or animal therapeutic or diagnostic use.

www.invitrogen.com Telephone: 800-955-8288