

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema
complemento

Renata Ignácio Bertozzi

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema
complemento

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

Orientada: Renata Ignácio Bertozzi

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

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

Ribeirão Preto
2011

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.

Bertozi, Renata Ignácio

Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento. Ribeirão Preto, 2011.
67 p.; 30cm.

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

Orientador: Marzocchi-Machado, Cleni Mara.

1. Contraceptivo hormonal combinado 2. Sistema
Complemento 3. Neutrófilos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Renata Ignácio Bertozzi

Título do trabalho: Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento

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: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo (FAPESP),
processo 2008/02633-2 (bolsa) e 2007/58578-7 (auxílio pesquisa);
CNPq Universal (481873/2009-0)**

**Dedico este trabalho à minha
família, por todo incentivo, dedicação
e ensinamentos que me foram concedidos
durante toda minha caminhada.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e me orientar em meus momentos mais difíceis, me dando sustentação para continuar persistindo em meus desejos e sonhos.

Aos meus familiares pela presença constante, carinho e compreensão com que percebem os passos da minha caminhada existencial e profissional.

Ao meu marido Esdras Nunes da Silva, por todo seu amor, dedicação, carinho e estímulo.

Às voluntárias que participaram desta pesquisa, pela atenção, compreensão e disposição em colaborar com este trabalho.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, pelo conhecimento que me passou durante o tempo que estivemos juntas, agradeço pelo grande apoio, dedicação e amizade.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim por ceder toda a infra-estrutura do seu laboratório de pesquisa.

À farmacêutica-bioquímica Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, pela dedicação e pelo grande apoio concedido durante a realização das atividades no laboratório.

À pós-doutoranda Ana Paula Landi Librandi, pela preciosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal, que me incentivou com palavras de ânimo e coragem, me ajudando a acreditar na realização deste sonho.

Às amigas do curso, Juliana Escher Toller e Isabel Cristina Costa Vigato, por dividirem comigo as alegrias, as conquistas e, também, os momentos de dificuldades.

Às companheiras de trabalho, Bianca Stocco e Helen Fumagalli, pela companhia e dedicação, que foram de muita importância para a realização e conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Regina Torqueti pela parceria neste estudo.

Ao Dr. Silvio Franceschini e à Profa. Dra. Carolina Sales Vieira pela contribuição no recrutamento de voluntárias no Centro de Saúde Escola, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

À Profa. Dra. Virgínia Paes Leme Ferriani e à Profa. Dra. Carolina Sales Vieira pelas dicas e orientações concedidas que foram muito importantes para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica, Suellen Priscila dos Santos Migueleti, Carolina Nakau Fuzissaki, Luciana Mariko Kabeya, Micássio Fernandes de Andrade, Thalita Estracanholi de Castro, Andréa Silva Garcia de Figueiredo e Everton de Oliveira Lima dos Santos, pela ajuda oferecida nos momentos que precisei, e pelos momentos de descontração que tornavam o ambiente de trabalho muito agradável.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica, Nadir Mazzucato e Alcides Silva Pereira, pelo apoio e amizade.

Ao funcionário José Eduardo Cavalcanti Del Lama pela atenção e apoio.

Aos coordenadores e funcionários do programa Biociências Aplicadas à Farmácia pela disposição e atenção.

À Fabiana Rossetto de Moraes pela atenção em realizar as leituras no citômetro de fluxo.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida.

**“O futuro pertence àqueles
que acreditam na beleza de
seus sonhos”
(Voltaire)**

RESUMO

BERTOZI, R. I. **Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento.** 2011. 67f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A ocorrência de trombose está freqüentemente associada com a presença de um ou mais fatores de riscos, os quais podem ser genéticos e/ou adquiridos, tais como as mudanças hormonais que ocorrem durante a gravidez, a terapia de reposição hormonal e o uso de contraceptivos hormonais combinados (CHC). A inflamação, por sua vez, é uma importante resposta do organismo às agressões e envolve vários mecanismos biológicos relacionados entre si e altamente regulados, tais como: coagulação, fibrinólise, ativação do sistema complemento (SC), antioxidação e regulação hormonal. Fisiologicamente, os sistemas complemento e da coagulação compartilham componentes. A ativação do fator XII da coagulação é controlada pela mesma proteína reguladora da ativação do sistema complemento, o inibidor de C1. A deficiência do inibidor de C1 leva a uma patologia conhecida como angioedema hereditário. No entanto, uma manifestação clínica similar ao angioedema tem sido descrita em mulheres que usam CHC ou recebem terapia de reposição hormonal com estrogênio (E). Esta influência do estrogênio na coagulação e no SC também é evidenciada pela ação regulatória do E sobre a expressão do fator XII e dos seus níveis plasmáticos. Considerando o efeito pleiotrópico do E, e as interações do SC e da hemostasia, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes CHC sobre: a) a atividade hemolítica (AH) do SC e ativação das vias clássica/lectina e alternativa; b) a atividade opsonizante do SC em mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos; e c) a função dos receptores para complemento (CR) em mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos. Nós estudamos 5 CHC diferentes e observamos que a) drospirenona + 30µg E mostrou uma tendência a aumentar o *burst* oxidativo mediado por CR; b) gestodeno + 20µg E mostrou redução da capacidade opsonizante do SC; c) levonorgestrel + 30µg E e gestodeno + 20µg E promoveram uma redução no número de neutrófilos positivos para a expressão de CR1; d) drospirenona + 30µg E e drospirenona + 20µg E promoveram um aumento da AH da via clássica (VC) do SC; e) levonorgestrel + 30µg E promoveu uma redução da AH da VC do SC; f) drospirenona + 30µg E, gestodeno + 20µg E e levonorgestrel + 30µg E promoveram uma diminuição do nível sérico de C4d, produto da ativação das vias clássica/lectina do SC; g) levonorgestrel + 30µg E apresentou um aumento da concentração sérica de inibidor de C1; h) nenhum dos CHC mostrou diferenças na ativação da via alternativa do SC. Os resultados mostram a importância de considerar os diferentes grupos de CHC nas comparações com o Grupo Controle, uma vez que algumas diferenças foram significativas apenas para CHC em particular. Estas observações podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dos processos inflamatórios associados ao uso de estrogênios.

Palavras-chave: contraceptivos hormonais; sistema complemento; neutrófilos

ABSTRACT

BERTOZI, R. I. Evaluation of the effect of hormonal contraceptives on the complement system. 2011. 67f. Dissertation (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The occurrence of thrombosis is often associated with the presence of one or more risk factors, which may be genetic and/or acquired, such as hormonal changes that occur during pregnancy, hormone replacement therapy and the use of combined hormonal contraceptives (CHC). The inflammation in turn, is an important body's response to the aggression and involves several biological mechanisms related and highly regulated, such as coagulation, fibrinolysis, activation of the complement system (CS), oxidation and hormonal regulation. Physiologically, the complement and coagulation systems share components. Activation of coagulation factor XII is controlled by the same regulatory protein activation of the complement inhibitor C1. The deficiency of C1 inhibitor leads to a condition known as hereditary angioedema. However, a clinical manifestation similar to angioedema has been reported in women using CHC or receiving hormone replacement therapy with estrogen (E). The influence of E on coagulation and the CS is also evidenced by the regulatory action of E on the expression of factor XII and its plasma levels. Considering the pleiotropic effects of E, and the interactions of CS and hemostasis, the goal of this study was to evaluate the effect of different CHC on: a) hemolytic activity (HA) CS and activation of classical/lectin and alternative pathways, b) the opsonizing activity of the CS in mediating the oxidative burst of neutrophils, and c) the function of receptors for complement (CR) in mediating the oxidative burst (OB) of neutrophils. We studied 5 different CHC and data showed: a) drospirenone + 30 μ g E increase of the OB neutrophils mediated by CR; b) gestodene + 20 μ g E had a reduced opsonizing ability; c) levonorgestrel + 30 μ g E and gestodene + 20 μ g E promoted a reduction of neutrophils positive for the expression of CR1, d) drospirenone + 30 μ g E and drospirenone + 20 μ g E promoted an increase in HA for classical pathway (CP); e) levonorgestrel + 30 μ g E reduced the HA for CP; f) drospirenone + 30 μ g E and gestodene + 20 μ g E and levonorgestrel + 30 μ g E reduced the serum level of C4d; g) levonorgestrel + 30 μ g E showed an increase of the serum level of C1 inhibitor; h) none of CHC showed differences in activation of the alternative pathway in CS. The results show the importance of considering the different groups of CHC in comparison with the control group, since some differences were significant only for CHC in particular. These observations may contribute to the understanding of the mechanisms involved in the pathophysiology of inflammatory processes associated with estrogen use.

Keywords: hormonal contraceptives, the complement system, neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da interação das vias de ativação da coagulação e a regulação pelas proteínas C e S e a regulação do fator XII pelo inibidor de C1	3
Figura 2. Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento e suas funções efetoras.	7
Figura 3. População de neutrófilos obtida a partir do método de gelatina	26
Figura 4. Representação do perfil de quimioluminescência registrado	26
Figura 5. Curva da concentração de zimosan para estimular o <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos	27
Figura 6. Quimioluminescência de neutrófilos estimulados por complemento do SHN e do SHC	28
Figura 7. Expressão do CR1 e CR3 nos neutrófilos avaliada por citometria de fluxo	29
Figura 8. Atividade hemolítica das vias clássica e alternativa	31
Figura 9. Ativação das vias clássica/lectina medida pela concentração de C4d no soro	32
Figura 10. Ativação da via alternativa medida pela concentração do fragmento Bb no soro	32
Figura 11. Atividade do inibidor de C1	33
Figura 12. Imunoeletroforese semi-quantitativa em foguete para inibidor de C1 no soro	34
Figura 13. Quantificação relativa do inibidor de C1 no soro por migração em gel de agarose 1,3% com 1,3% de anticorpo anti-inibidor de C1 por imunoeletroforese semi-quantitativa em foguete	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados epidemiológicos	14
Tabela 2 - Dados dos hemogramas	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEH	angioedema hereditário
CAM	complexo de ataque à membrana
CFD	diluyente para fixação do complemento
CH	contraceptivo hormonal
CHC	contraceptivo hormonal combinado
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
cpm	contagem de fótons por minuto
CR	receptor para complemento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
EA	complexo eritrócito/anti-eritrócito
EDTA-K₃	sal tripotássico do ácido etileno diamino tetracético
ERO	espécies reativas de oxigênio
FbDP	produto da degradação da fibrina
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FgDP	produto da degradação do fibrinogênio
HCM	hemoglobina corpuscular média
IMC	índice de massa corporal
MBL	lectina ligante de manose (MBL: <i>mannose-binding lectin</i>)
PAI-1	inibidor de ativador de plasminogênio do tipo 1
PBS	salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
QL	Quimioluminescência
rpm	rotação por minuto
SHC	soro de voluntárias que usam contraceptivo hormonal combinado
SHN	soro humano normal
SHNI	soro humano normal inativado
SISUSP	Serviço Integrado de Saúde da USP
T1/2	tempo necessário para o complemento lisar 50% de uma suspensão padronizada de eritrócitos

TAFI	inibidor da fibrinólise ativado por trombina
TEA-EDTA	trietanolamina e ácido etileno diamino tetracético
TEA-EGTA	trietanolamina e ácido etileno glicol tetracético
t-PA	ativador de plasminogênio do tipo tecidual
u-PA	ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
USP	Universidade de São Paulo
VA	via alternativa
VC	via clássica
VCM	volume corpuscular médio
ZI	Zimosan

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hemostasia	1
1.2 O Sistema Complemento	5
1.3 A Relação Contraceptivos Hormonais, Hemostasia e Sistema Complemento	8
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivo específico	12
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	12
3.1 Voluntárias da pesquisa	12
3.2 Principais reagentes e soluções	15
3.3 Equipamentos utilizados	15
3.4 Obtenção de neutrófilos	16
3.5 Obtenção do soro humano	16
3.6 Preparo do estímulo: zimosan e zimosan opsonizado	16
3.7 Preparo do luminol	17
3.8 Medida de quimioluminescência das amostras estudadas	17
3.9 Atividade hemolítica do complemento sérico	17
3.9.1 Atividade hemolítica da via clássica	18
3.9.1.1 Preparo do EA (complexo eritrócito/anti-eritrócito)	18
3.9.1.2 Ensaio hemolítico cinético da via clássica	18
3.9.2 Atividade hemolítica da via alternativa	19
3.9.2.1 Preparo da suspensão de eritrócitos de coelho	19
3.9.2.2 Ensaio hemolítico cinético da via alternativa	19
3.10 Avaliação da atividade funcional do inibidor de C1	20
3.10.1 Reagentes e materiais	20
3.10.2 Procedimento do ensaio	20
3.11 Avaliação da ativação das vias clássica/lectina através da quantificação do fragmento C4d	21

3.11.1 Reagentes e materiais	21
3.11.2 Procedimento do ensaio	21
3.12 Avaliação da ativação da via alternativa através da quantificação do fragmento BB	22
3.12.1 Reagentes e materiais	22
3.12.2 Procedimento do ensaio	22
3.13 Determinação de inibidor de C1 no soro por técnica de imunoeletroforese semi-quantitativa em foguete	22
3.14 Quantificação dos receptores para complemento CR1 e CR3	23
3.15 Hemograma	24
3.16 Análise estatística	24
4. RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Padronização dos ensaios para medida do <i>burst</i> oxidativo por quimioluminescência (QL)	25
5.2 Ensaios de QL com neutrófilos: medida do <i>burst</i> oxidativo	27
5.3 Expressão de CR1 e CR3 nos neutrófilos	29
5.4 Avaliação da atividade hemolítica do complemento sérico	30
5.5 Ativação das vias clássica/lectina, determinação do fragmento C4d	31
5.6 Ativação da via alternativa, determinação do fragmento Bb	32
5.7 Avaliação da atividade funcional do inibidor de C1	33
5.8 Concentração do inibidor de C1, determinação por imunoeletroforese semi-quantitativa em foguete	33
5.9 Dados dos hemogramas	34
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	44
8. REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	55
ANEXO: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	67

1. INTRODUÇÃO

Os contraceptivos hormonais combinados (CHC) consistem em uma dose diária constante de uma associação de estrogênio e progestagênio, sendo a forma mais freqüente prescrita de pílulas anticoncepcionais (ROSENDAAL, 2005). Os CHC apresentam efeitos benéficos sobre a saúde, por exemplo aliviando a dismenorréia, mastodinia e tensão pré-menstrual, doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, endometriose, melhorando acne e hirsutismo (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2001). No entanto, a ocorrência de trombose (oclusão vascular por formação de um coágulo) está freqüentemente associada com a presença de um ou mais fatores de riscos, os quais podem ser genéticos e/ou adquiridos, tais como as mudanças hormonais que ocorrem durante a gravidez, a terapia de reposição hormonal e o uso de CHC (ROSING; CUVERS; TANS, 2001).

Os fatores de risco da doença tromboembólica são imobilidade, neoplasias, idade, sexo, obesidade, traumatismo, insuficiência cardíaca em tratamento com diuréticos, contraceptivos hormonais, distúrbios congênitos com deficiência da antitrombina ou da proteína C (ALBUQUERQUE; VIDAL, 1996). Já o uso de CHC pode aumentar o risco de doenças tromboembólicas em mulheres com história familiar ou pessoal anterior, e/ou com doenças inflamatórias crônicas (ROSING; CUVERS; TANS, 2001).

A inflamação, por sua vez, é uma importante resposta do organismo às agressões e envolve vários mecanismos biológicos relacionados entre si e altamente regulados. Tais mecanismos incluem coagulação, fibrinólise, ativação do sistema complemento, antioxidação e regulação hormonal através do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (ESMON, 2004). A regulação destes sistemas pode ser influenciada por variações no estado fisiológico, patológico ou ainda por ação de drogas e/ou medicamentos (TANRIVERDI et al., 2003). Nestas circunstâncias, as respostas biológicas mediadas por estes sistemas podem ter implicações fisiopatológicas, prejudicando a homeostase do hospedeiro.

1.1 – Hemostasia

A hemostasia é o processo responsável pela manutenção da integridade vascular e da fluidez do sangue no sistema circulatório. Graças à ação regulada de uma variedade

de mecanismos, o sistema hemostático simultaneamente contrapõe-se à perda excessiva de sangue e evita a formação de trombos intravasculares. Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise. A coagulação sanguínea é iniciada quando o sangue é exposto a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (lesão vascular) ou alterações bioquímicas (FRANCO, 2001).

O processo de coagulação é, didaticamente, dividido em duas vias, a extrínseca (envolvendo componentes do sangue e elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular), e a intrínseca (fatores presentes no espaço intravascular) (Figura 1). Do ponto de vista fisiológico, não há distinção clara entre estas vias, que atuam de modo altamente interativo *in vivo* e culminam em uma via comum. A coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica, seqüencial de zimógenos, resultando na formação de trombina que, então, converte o fibrinogênio solúvel em coágulo de fibrina (insolúvel). Na via extrínseca, o fator VII plasmático, na presença de fator tecidual, diretamente ativa o fator X. Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas, e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular. O fator XII ativado (XIIa) ativa o fator XI, que por sua vez ativa o fator X. A partir da ativação do fator X (fator Xa), em ambas as vias é desencadeada a formação de trombina, que, em concentração suficiente, irá imediatamente converter o fibrinogênio em um gel de fibrina (COLMAN, 2001). Dessa forma, é formado o coágulo, que consiste de uma rede de filamentos de fibrina que se estende em todas as direções e que aprisiona células sanguíneas, plaquetas e plasma.

Para impedir a coagulação excessiva, as proteínas anticoagulantes controlam a formação da trombina, e uma vez formado o coágulo, o sistema de fibrinólise é ativado para promover a dissolução da fibrina e restabelecer a fluidez dentro do vaso (FRANCO, 2001).

O inibidor natural da coagulação mais importante é a antitrombina, que possui atividade anticoagulante inibindo a trombina e outras proteinases da coagulação, como os fatores Xa, IXa, XIa, XIIa e a caliceína (BLOOM et al., 1994).

A proteína C e o seu cofator, a proteína S, são importantes controladores da coagulação, constituindo a chamada via da proteína C. A proteína C ativada requer proteína S, fosfolipídios e íons cálcio para exercer seu efeito anticoagulante (BLOOM et

al., 1994). Além da atividade anticoagulante, o complexo proteína C/proteína S estimula a fibrinólise através da ativação do ativador de plasminogênio do tipo tecidual e da inativação proteolítica de um inibidor do ativador do plasminogênio (NARAYANAN; HAMASAKI, 1998; RAPAPORT, 1987).

A proteína S circula no plasma sob a forma livre ou como um complexo com a proteína de ligação C4b-binding protein (C4BP), uma proteína reguladora do sistema complemento. Aproximadamente 40% da proteína S circulam na forma livre e 60% na forma do complexo proteína S/C4BP. Apenas a proteína S livre age como cofator da proteína C ativada. Dessa forma, a C4BP é um regulador importante da via da proteína C (BLOOM et al., 1994). Deficiências de proteína C, proteína S e antitrombina estão associadas à predisposição à trombose (BERTINA, 1999).

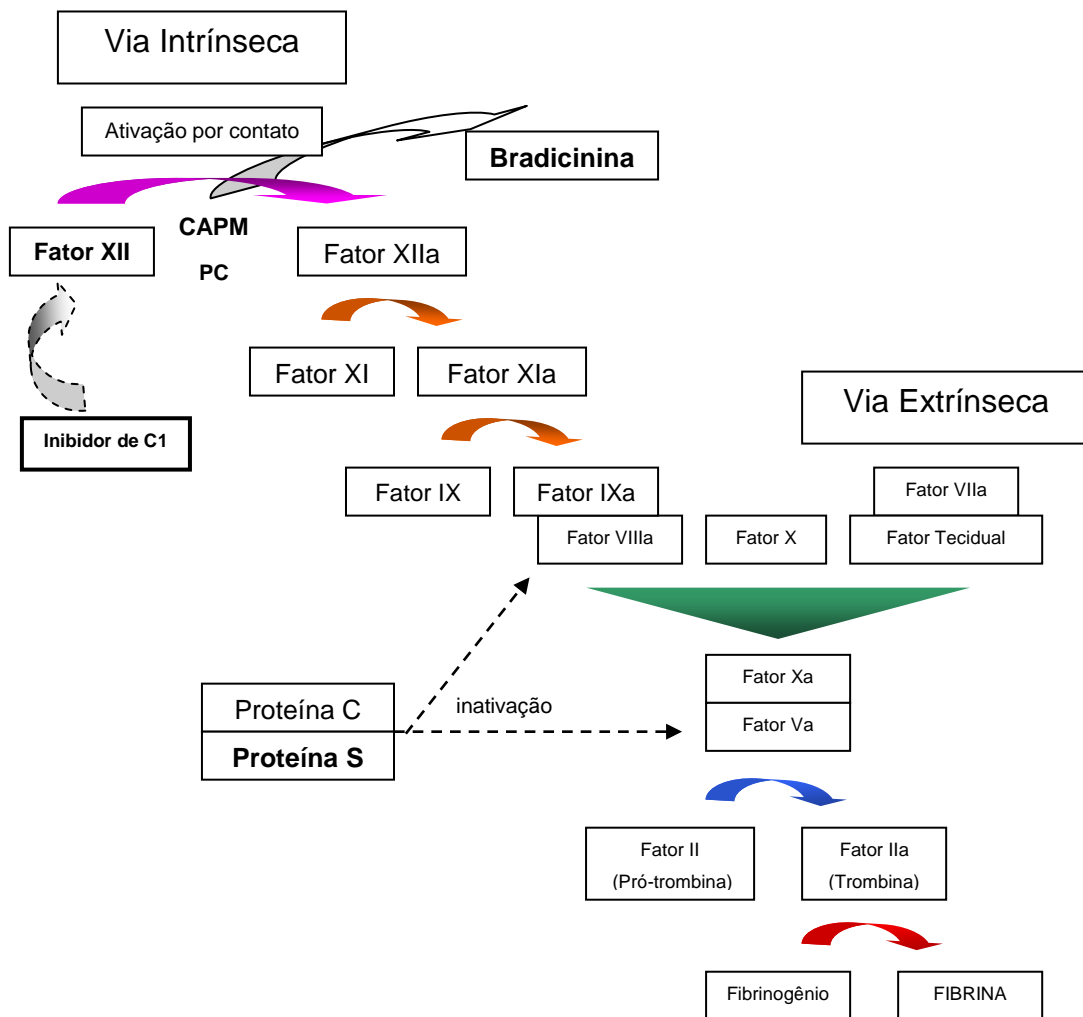


Figura 1. Representação esquemática da interação das vias de ativação da coagulação e a regulação pelas proteínas C e S e a regulação do fator XII pelo inibidor de C1. CAPM = cininogênio de alto peso molecular. PC = pré-caliceína. Adaptado a partir de AMARA et al. (2010).

O sistema fibrinolítico participa da remoção do coágulo do leito vascular e sua ativação é, normalmente, uma resposta fisiológica à deposição de fibrina. Esse sistema compreende três componentes: a pró-enzima plasminogênio, precursor inativo da plasmina; os ativadores do plasminogênio, que podem ser de diferentes origens; e os inibidores do sistema fibrinolítico, os quais rapidamente neutralizam a plasmina ou interferem na ativação do plasminogênio (VERSTRAETE; VERMYLEN, 1989).

A ativação do plasminogênio pode ocorrer por vias intrínseca e extrínseca. Os principais componentes da ativação intrínseca são o fator XII, a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular. A ativação extrínseca do plasminogênio ocorre quando há liberação de dois tipos de ativadores de plasminogênio que são fisiologicamente importantes: o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (*tissue plasminogen activator* - t-PA) pelas células do endotélio vascular e o ativador de plasminogênio do tipo urinário ou uroquinase (*urokinase plasminogen activator* - u-PA) pelas células epiteliais dos ductos excretórios, endotélio vascular e macrófagos (NARAYANAN; HAMASAKI, 1998; RAPAPORT, 1987; VERSTRAETE; VERMYLEN, 1989).

A fibrinólise também é rigorosamente controlada e dois inibidores específicos são importantes: o inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (*plasminogen activator inhibitor* -PAI-1) que inibe o t-PA e o u-PA; e a alfa-2-antiplasmina que inibe a plasmina (BLOOM et al, 1994). O PAI-1 encontra-se em uma concentração plasmática muito baixa, sendo liberado em grandes quantidades quando as plaquetas são ativadas. Deficiências de PAI-1 são associadas com tendências hemorrágicas e os níveis elevados aumentam o risco de trombose (BLOOM et al., 1994).

Uma importante via de regulação de geração de plasmina se dá através do complexo trombina/trombomodulina, que apesar de ativar a fibrinólise através da proteína C ativada, também ativa um inibidor dessa via denominado inibidor da fibrinólise ativado por trombina (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor* - TAFI). A plasmina age sobre o fibrinogênio, resultando na formação dos fragmentos X, D, Y e E, também chamados produtos da degradação do fibrinogênio (FgDP, *fibrinogen*

degradation products) e sobre o polímero de fibrina, resultando nos produtos de degradação da fibrina (FbDP, *fibrin degradation products*), entre eles os dímeros-D, que resultam da degradação das ligações cruzadas da fibrina (NARAYANAN; HAMASAKI, 1998).

Assim, sob condições fisiológicas, o sistema hemostático é balanceado por uma interrelação de proteínas pró-coagulantes, anticoagulantes e do sistema fibrinolítico presentes no plasma. A hiperatividade do sistema pró-coagulante ou defeitos nas proteínas anticoagulantes podem levar a um distúrbio do balanço hemostático conhecido como estado pró-trombótico, o qual pode resultar na formação excessiva de trombina e no desenvolvimento de trombose venosa (ROSING; CUVERS; TANS, 2001).

1.2 - O Sistema Complemento

O sistema complemento é um dos principais componentes do sistema imune (RUS; CUDRICI; NICULESCU, 2005). É constituído por proteínas séricas e de membrana, que interagem de maneira altamente regulada, para gerar como produtos proteínas biologicamente ativas, que participam de diferentes funções envolvidas com a eliminação de antígenos, tais como: lise osmótica de células estranhas, fagocitose, processamento de imunocomplexos e quimiotaxia, sendo também um mediador importante da resposta inflamatória (MÜLLER-EBERHARD, 1988; WALPORT, 2001). A organização e o funcionamento deste sistema também incluem proteínas de membrana com ação regulatória, que protegem as células do hospedeiro da ativação autóloga do complemento (LISZEWSKI et al., 1996).

A maioria das proteínas do sistema complemento é proteína de fase aguda e se encontra na forma inativa na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea. A ativação deste sistema ocorre de maneira seqüencial, como um efeito cascata, pela clivagem proteolítica de um componente inativo inicial, cujo produto contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado (MÜLLER-EBERHARD, 1988).

O sistema complemento pode ser ativado por três vias (Figura 2): a via clássica, que é estimulada por anticorpo; a via da lectina ligante de manose (MBL), iniciada pela ligação desta lectina à manose e ficolinas a diferentes açúcares nas superfícies de patógenos; e a via alternativa é iniciada pela hidrólise espontânea do componente C3, cujo produto pode se ligar às superfícies vizinhas, células do hospedeiro e patógenos, e iniciar a ativação do sistema complemento. Os diferentes componentes de cada uma das

vias são ativados para gerar enzimas chamadas C3 convertases, as quais clivam o componente central do sistema complemento, o C3. As três vias levam a uma via lítica comum com a formação da C5 convertase, que, por sua vez, leva à formação do complexo de ataque à membrana (CAM). A partir da produção das convertases, as funções efetoras do complemento são geradas e são idênticas para as três vias de ativação (FUJITA; ENDO; NONAKA, 2004).

Dentre as principais funções efetoras destacam-se a geração de anafilatoxinas (fragmentos C4a/C3a/C5a), a formação do CAM e a opsonização (deposição dos fragmentos gerados pela ativação do complemento, opsoninas). As anafilatoxinas são moléculas pró-inflamatórias potentes derivadas da clivagem do C4, C3 e C5, respectivamente. O CAM compreende a inserção dos componentes terminais do complemento C5b ao C9 e que pode causar a lise das células do hospedeiro ou patógenos onde a ativação do complemento foi iniciada (BHAKDI; TRANUM-JENSEN, 1991). A opsonização induz a fagocitose dos alvos revestidos pelas opsoninas, como C3b, e também contribui para a amplificação da ativação da via alternativa do sistema complemento e remoção de imunocomplexos da circulação (WALPORT, 2001; DUNKELBERGER, SONG, 2010).

A organização e o funcionamento deste sistema também incluem proteínas plasmáticas e de membrana com ação regulatória, que controlam a cascata de ativação e protegem as células do hospedeiro da ativação autóloga do complemento. Um destes reguladores é a vitronectina, que inibe a inserção do CAM nas membranas lipídicas das células do hospedeiro, confinando as reações à superfície dos patógenos (LISZEWSKI et al., 1996).

Adicionalmente, durante a ativação do sistema complemento as anafilatoxinas geradas são liberadas e medeiam o recrutamento e a ativação de leucócitos nas respostas inflamatórias. Estas moléculas agem na parede dos vasos, aumentando a permeabilidade vascular e, assim, permitindo o acúmulo de fluidos e células no local da inflamação (DIAS DA SILVA; LEPOW, 1967). Assim, deve-se ressaltar que além das funções imunoregulatórias, o sistema complemento também pode estar envolvido na fisiopatologia de doenças de caráter inflamatório (THURMAN; HOLERS, 2006).

A presença de receptores para complemento (CR), CR1 e CR3, nos neutrófilos promove a fagocitose de partículas opsonizadas pelos fragmentos do complemento (C3b, C3b inativado (C3bi) e C4b) e estimula nestas células o *burst* oxidativo, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MANTOVANI, 1975;

BABIOR, 1988; OKHURO et al., 1995). Além de serem importantes mediadores dos mecanismos de destruição dos patógenos, as ERO também estão envolvidas na fisiopatologia de processos inflamatórios crônicos e lesão tecidual (VALKO et al., 2007).

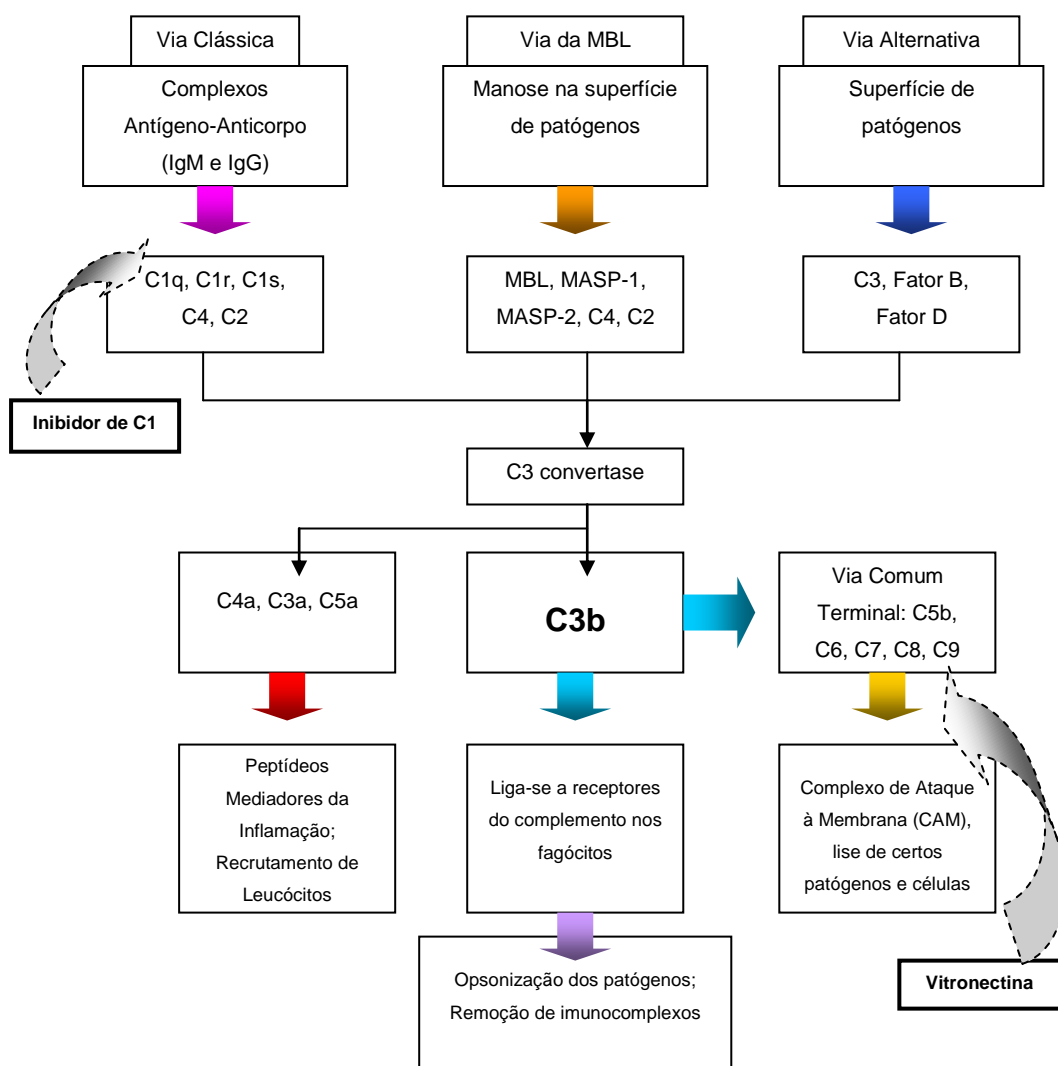


Figura 2. Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento e suas funções efetoras. MBL, lectina ligante de manose; MASP, serina protease associada à MBL; CAM, complexo de ataque à membrana. Adaptado a partir de RICKLIN et al. (2010).

Atualmente o sistema complemento não é somente reconhecido como um importante mediador das defesas do hospedeiro, porém também por contribuir para a fisiopatologia de várias doenças inflamatórias. Uma vez que a inflamação e a coagulação são sistemas relacionados fisiologicamente por uma interface de mediadores, esta relação pode ser influenciada tanto por condições associadas a processos inflamatórios quanto por doenças vasculares e coagulopatias (LEVI; VAN DER POLL, 2005). Isto tem levado ao crescente interesse na investigação e monitoramento da atividade do complemento em diversas condições clínicas (MOLLNES et al., 2007).

1.3 - A Relação Contraceptivos Hormonais, Hemostasia e Sistema Complemento

Os CHC são usados por cerca de 100 milhões de mulheres em todo o mundo. De acordo com estatísticas realizadas em 2003 pelas Nações Unidas, cerca de 48% das mulheres em idade fértil no oeste da Europa usam CHC, enquanto no Japão, onde os CHC foram licenciados em 1999, atualmente somente 1% das mulheres usam pílulas anticoncepcionais (ERKKOLA, 2007).

Considera-se que o uso de CHC pode aumentar o risco de doenças tromboembólicas, principalmente em associação com outros fatores genéticos e/ou adquiridos (KIM; SPANDORFER, 2001), e, ainda, que os efeitos dos CHC sobre a hemostasia podem ser agravados em mulheres com história familiar ou pessoal de doença tromboembólica venosa (KLUFT; LANSINK, 1997).

O aumento da doença tromboembólica como efeito colateral dos CHC foi atribuído ao seu componente estrogênico. O componente progestagênico, que parece regular os efeitos do estrógeno (KLUFT; LANSINK, 1997), tem sido apontado como responsável pelo aumento da pressão sanguínea, interferindo no metabolismo de lipídios e carboidratos (FERREIRA et al., 2000). No entanto, novos estudos confirmam que ambos, o estrogênio e o progestagênio, contidos nos CHC, aumentam o risco do desenvolvimento de trombose (ROSENDAAL, 2005).

A ação dos estrogênios tem sido investigada pelas suas funções regulatórias nos componentes da parede vascular, assim eles podem contribuir para aumentar a prevalência e gravidade de certas doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes (MCMURRAY, 2001). Tais efeitos regulatórios deste hormônio sobre diferentes respostas biológicas podem ser antagonicos dependendo da dose, tempo de exposição ao estrógeno e estímulos pré-existentes (CID; SCHNAPER; KLEINMAN, 2002).

Os progestagênios formam um grupo de esteróides que, apesar de possuírem a característica comum de se ligarem aos receptores de progesterona, têm efeitos sistêmicos diferentes e que são mediados não só pela afinidade aos próprios receptores de progesterona, mas principalmente pela capacidade de ligação com os receptores de outros esteróides, como os estrogênios, androgênios, glicocorticóides e mineralocorticóides. Essa capacidade de ligar-se a outros receptores de esteróides, bem como o perfil de afinidade por cada um desses receptores, pode resultar em riscos diferentes para a trombose, a depender do progestagênio associado ao estrogênio (VIEIRA et al., 2007).

Os CHC podem conter diferentes tipos de progestagênios. Os CHC de primeira geração contêm linestrenol, mas são pouco usados. Os CHC de segunda geração, os quais são bastante usados, contêm levonorgestrel ou, com menor frequência, norgestrel, enquanto os CHC de terceira geração contêm desogestrel ou gestodeno, os quais foram disponibilizados em 1980 e são altamente utilizados. Medicamentos que contêm drospirenona (quarta geração) têm um efeito antimineralocorticóide, também inibem a ovulação e foram disponibilizados no mercado em 2001 (VLIEG et al., 2009). Este efeito antimineralocorticóide determina menor absorção de sódio e maior diurese, reduzindo a retenção de líquidos e os sintomas relacionados a esse efeito (aumento de peso, edema, dor e intumescimento das mamas) (WANNMACHER, 2006).

A partir de 1995, vários estudos foram realizados sobre a diferença de riscos trombóticos associados ao uso de CHC de segunda e terceira geração (BLOEMENKAMP et al., 1995; JICK et al., 1995; PRASAD et. 1999; TCHAIKOVSKI et al. 2007; AHRENDT et al., 2009; GAUSSEM et al., 2011).

Vários estudos confirmam uma associação entre o uso de CHC da terceira geração contendo desogestrel ou gestodeno e risco aumentado de tromboembolismo venoso. Usuárias de CHC de terceira geração enfrentam um risco cerca de duas vezes maior de sofrerem tromboembolismo do que usuárias de outros CHC, mesmo após controle de possíveis fatores que aumentam o risco de tromboembolismo, como por

exemplo, o tabagismo. Em outubro de 1995, o British Committee on Safety of Medicines divulgou resultados preliminares de um estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS) acerca de tromboembolismo venoso (casos hospitalares de trombose venosa profunda e embolia pulmonar) em usuárias de contraceptivos orais, o qual se mostrou quatro vezes maior em comparação às não-usuárias. Usuárias de CHC de terceira geração apresentaram o dobro do risco de tromboembolismo quando comparadas às usuárias de CHC de segunda geração. Frente a essa constatação, um novo estudo do mesmo grupo analisou, secundariamente, o risco de trombose venosa profunda associada com CHC com 35µg ou menos de estrógeno combinado com levonorgestrel ou gestodeno/desogestrel. O risco estimado para gestodeno e desogestrel, isoladamente, foi 2,7 vezes maior em comparação a levonorgestrel (KEMMEREN; ALGRA; GROBBEE, 2001).

Em 2001, uma metanálise avaliou de forma quantitativa os estudos (casos-controles e coortes) que compararam CHC de segunda e terceira geração quanto ao risco de tromboembolismo venoso. Os CHC de terceira geração demonstraram estar associados a risco 1,7 vezes maior de tromboembolismo venoso, quando comparados aos de segunda geração. Kemmeren, Algra e Grobbee (2001) calcularam que aproximadamente 4 mortes por 1.000.000 mulheres/ano poderiam ser evitadas com a substituição de CHC de terceira geração por CHC de segunda geração.

Os CHC que contêm progestagênicos de terceira geração estão associados ao desenvolvimento de resistência adquirida à proteína C ativada mais pronunciada e a uma tendência de produzir níveis mais altos de fatores de coagulação e níveis mais baixos de antitrombina e de proteína S, quando comparados a CHC contendo progestagênio de segunda geração. Esses achados poderiam explicar as observações epidemiológicas de risco aumentado para trombose em usuárias de CHC que contêm progestagênicos de terceira geração, já que a resistência à ação da proteína C (adquirida ou herdada) é um marcador importante para risco aumentado de trombose (VIEIRA et al., 2007).

Os CHC contendo drospirenona, quando comparado ao levonorgestrel, se mostrou menos sensível à proteína C ativada (resistência à ação da proteína C ativada), o que poderia predizer um aumento do risco de trombose associado ao seu uso. Outros autores demonstraram efeitos na hemostasia similares entre CHC contendo 20 µg de etinilestradiol + 3 mg de drospirenona e 20 µg de etinilestradiol + 150 µg de

desogestrel. Apesar destas informações, o risco de trombose foi similar ao das usuárias de CHC contendo levonorgestrel (VIEIRA et al., 2007).

São limitadas as informações disponíveis para o risco de trombose associado com o CHC contendo drospirenona. Porém um risco aumentado associado a esse contraceptivo hormonal foi observado em uma série de casos de trombose venosa (VAN GROOTHEEST; VRIELING, 2003).

Segundo Vlieg e colaboradores (2009) a opção mais segura em relação ao risco de trombose venosa é um CH contendo levonorgestrel combinado com uma dose baixa de estrogênio.

Um exemplo do efeito do estrogênio em doenças inflamatórias é a exacerbação do lúpus eritematoso sistêmico em mulheres durante a gravidez, durante o uso de CHC e durante a reposição hormonal com estrogênio (SÁNCHEZ-GUERRERO et al., 1985).

A relação entre estrogênio e sistema complemento tem sido descrita em estudos que relatam uma manifestação clínica similar àquela do angioedema hereditário em mulheres que usam CHC ou que recebem terapia de reposição hormonal com estrogênios (BINKLEY; DAVIS, 2000; 2004; ANDRE C, ANDRE F, VEYSSEYRE-BALTER, 2003; BORK, 2006; CHICON et al., 2006; DUAN et al., 2009; BINKLEY, 2010). O angioedema hereditário (AEH) é uma condição autossômica dominante caracterizada clinicamente por ataques recorrentes de edema facial, genital, pele e principalmente de laringe, com obstrução das vias aéreas. A maioria dos casos de AEH é atribuída à deficiência ou à função inadequada do inibidor de C1, AEH tipo I e AEH tipo II, respectivamente, como consequência de mutações no gene que codifica esta proteína (BINKLEY; DAVIS, 2000; CHICON et al., 2006). Os ataques de AEH podem ser fatais, pois muitas vezes resultam em hospitalização e internação em centros de terapia intensiva. (LEVY, 2010). O angioedema observado exclusivamente em mulheres e relacionado com condições de altos níveis de estrogênio, como por exemplo, gravidez e o uso de CHC, tem sido classificado como angioedema tipo III (BINKLEY; DAVIS, 2000; CHICON et al., 2006).

O C1 é o primeiro componente da via clássica do sistema complemento e sua ativação é regulada pelo inibidor de C1. Sob condições fisiológicas, o fator XIIa da coagulação cliva a pré-caliceína para formar a caliceína, a qual, por sua vez, gera bradicinina a partir do cininogênio de alto peso molecular. O inibidor de C1 também controla esta cascata inativando o fator XIIa e a caliceína plasmática (COLMAN, 1984). Desta forma, na ausência da ação regulatória do inibidor de C1, pode ocorrer

uma geração maciça de bradicinina, que é um forte indutor de vasodilatação e de permeabilidade vascular, levando às reações de edema observadas no angioedema (NUSSBERGER; CUGNO; CICARDI, 2002; AGOSTONI et al., 2004).

Assim, o fator XII tem sido um forte candidato para o angioedema tipo III por duas razões: a) a atividade proteolítica do fator XII está envolvida na geração de cininas, a qual aumenta a permeabilidade vascular e estimula a formação de edema e b) a expressão do fator XII e os seus níveis plasmáticos são regulados pelo estrogênio (FARSETTI et al., 1995).

Alguns autores têm descrito um aumento nos níveis plasmáticos de fator XII em mulheres que usam CHC (FERREIRA et al., 2000) ou estão sob terapia de reposição hormonal com estrogênio (GORDON et al., 1988).

Vale ressaltar que vários autores têm observado um aumento do fator XII da coagulação e uma diminuição da proteína S em mulheres que usam CHC (ROSING et al., 1999; FERREIRA et al., 2000; FERREIRA et al., 2001). Um estudo preliminar observou um aumento da atividade hemolítica da via clássica do complemento sérico em mulheres usando CHC, sugerindo uma ausência de regulação desta via (RAMOS et al., 2004).

Todos estes aspectos sobre o efeito dos estrogênios podem ter importantes implicações na fisiopatologia de doenças mediadas por distúrbios da coagulação ou doenças inflamatórias crônicas, especialmente aquelas com acentuado envolvimento do sistema complemento.

De acordo com a literatura apresentada há uma crescente evidência sobre a relação do uso de estrogênio com o angioedema tipo III. Esta observação sugere uma influência na regulação do sistema complemento e de fatores da coagulação sangüínea. No entanto, os mecanismos envolvidos na regulação destas respostas biológicas sob o efeito dos CHC permanecem não esclarecidos e necessitam ser investigados.

O estudo da relação entre estes dois sistemas pode ser importante tanto para a doença vascular tromboembólica, quanto para as conseqüências na patogênese de lesões teciduais e subsequente falência de órgãos em doenças inflamatórias crônicas. Assim, baseando-se em estudos experimentais e clínicos, as terapias poderão ser mais bem sucedidas com a modulação simultânea de ambas, coagulação e inflamação, preferencialmente do que terapias específicas dirigidas a um único componente.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes funções do sistema complemento em mulheres usando cinco formulações diferentes de contraceptivos hormonais.

2.2 – Objetivo específico

Avaliar o efeito de cinco formulações diferentes de contraceptivos hormonais sobre:

- A atividade opsonizante do complemento sérico em mediar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos;
- A função dos receptores para complemento em mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos.
- A atividade hemolítica das vias clássica e alternativa;
- A ativação das vias clássica/lectina: quantificação do fragmento C4d;
- A ativação da via alternativa: quantificação do fragmento Bb;
- A medida da concentração sérica e da atividade do inibidor de C1;

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - Voluntárias da pesquisa

As voluntárias incluídas nesse trabalho consistiram de 64 mulheres saudáveis (alunas de graduação, pós-graduação e pacientes do Serviço Integrado de Saúde da USP - SISUSP), com faixa etária de 19 a 33 anos (idade média 25,01 anos), não fumantes, não usuárias de medicamentos controlados e que faziam ou não uso de contraceptivos hormonais há pelo menos 6 meses.

Foram divididas em 6 grupos: Grupo Controle (n=20); Grupo 1, contraceptivo hormonal contendo etinilestradiol (30µg) + drospirenona (3mg) (n=17); Grupo 2, contraceptivo hormonal contendo etinilestradiol (20µg) + drospirenona (3mg) (n=10); Grupo 3: contraceptivo hormonal contendo etinilestradiol (30µg) + levonorgestrel (0,15mg) (n=8); Grupo 4: contraceptivo hormonal contendo etinilestradiol (20µg) + gestodeno (0,075mg) (n=7); Grupo 5: contraceptivo hormonal contendo etinilestradiol (20µg) + levonorgestrel (0,15mg) (n=2).

Os medicamentos avaliados são considerados, segundo suas composições, de segunda (Grupos 3 e 5), terceira (Grupo 4) e quarta geração (Grupos 1 e 2) (VIEIRA et al., 2007).

Os grupos foram escolhidos devido à composição do medicamento (tipo de hormônio e concentração). Quando comparamos o Grupo 1 com o Grupo 2, estamos atribuindo as possíveis diferenças a serem apresentadas ao componente estrogênico, pois ambos possuem o mesmo tipo e concentração de progestagênio (3mg de drospirenona), e a concentração do estrogênio varia entre os grupos.

Quando comparamos o Grupo 1 com o Grupo 3, estamos atribuindo as possíveis diferenças a serem apresentadas ao componente progestagênico, pois neste caso, ambos possuem a mesma concentração de estrogênio em sua composição (30µg de etinilestradiol), e a variável está no tipo e concentração do progestagênio.

Quando comparamos o Grupo 4 com os Grupos 2 e 5, estamos atribuindo as possíveis diferenças a serem apresentadas ao componente progestagênico, pois todos possuem a mesma concentração de estrogênio (20µg de etinilestradiol), e a variável está no tipo e concentração do progestagênio.

O Grupo 3 e o Grupo 5 também podem ser comparados isoladamente, pois ambos possuem o mesmo tipo e concentração de progestagênio (0,15mg de levonorgestrel), nesse caso, as possíveis diferenças a serem apresentadas serão atribuídas ao componente estrogênico.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros epidemiológicos analisados, com os respectivos valores de média e desvio padrão, calculados a partir das amostras incluídas nesse estudo, com as seguintes observações:

- No Grupo Controle, sete voluntárias nunca fizeram uso de contraceptivos hormonais, não sendo incluídas, portanto, no cálculo da média desse parâmetro.

- Uma voluntária do Grupo 1 estava no dia da coleta há quatro anos e seis meses sem interromper o uso do contraceptivo hormonal, e outra voluntária, também do Grupo 1, estava há 2 meses sem interrupção do uso do contraceptivo.

- Três voluntárias, sendo uma do Grupo 1, uma do Grupo 2 e uma do Grupo 4, não souberam informar suas alturas, não sendo possível calcular seus índices de massa corporal.

- No Grupo 3, uma voluntária não se lembrou a data de sua última menstruação no dia da coleta, assim, não foi possível calcular o dia do ciclo que foi coletado o seu sangue para pesquisa.

Nos Apêndices A e B encontram-se os valores de cada parâmetro analisado.

Tabela 1. Dados epidemiológicos

	Controle (média±DP)	Grupo 1 30 µg etinilestradiol + 3mg drospirenona (média±DP)	Grupo 2 20µg etinilestradiol + 3mg drospirenona (média±DP)	Grupo 3 30µg etinilestradiol + 0,15mg levonorgestrel (média±DP)	Grupo 4 20µg etinilestradiol + 0,075 mg gestodeno (média±DP)	Grupo 5 20µg etinilestradiol + 0,15mg levonorgestrel (média±DP)
Idade (anos)	24,85 ± 2,434	23,47 ± 2,375	21,60 ± 2,119	24 ± 4,536	27,14 ± 3,716	29 ± 1,414
IMC (kg)	22,07 ± 2,743	22,33 ± 2,887	21,79 ± 2,766	21,98 ± 3,922	22,57 ± 2,143	21,10 ± 0,4243
Tempo sem uso / uso de CHC (meses)	25,23 ± 18,19	43,47 ± 33,60	15,40 ± 12,29	37,50 ± 17,20	44,71 ± 27,27	16,5 ± 10,61
Dia do ciclo	16,25 ± 7,239	15,67 ± 11,66	15,70 ± 10,49	21,71 ± 8,519	9,714 ± 6,422	15 ± 7,071

DP, desvio padrão; IMC, índice de massa corporal; CHC, contraceptivo hormonal combinado.

O presente projeto recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP para a sua execução (ANEXO 1). A doadora voluntária foi esclarecida sobre a pesquisa e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e respondeu um questionário (APÊNDICE E). As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa, com a utilização de escalpe, sendo 8mL armazenados em frascos contendo o anticoagulante Alséver, para obtenção dos neutrófilos, 8mL em frascos sem anticoagulante, para a obtenção de soro e 8mL em frascos com citrato de sódio, para o estudo da hemostasia (parte de projeto em colaboração). Um volume adicional de 4mL foi colhido em tubo com EDTA-K₃ (sal tripotássico do ácido etileno diamino tetracético) para a realização do hemograma.

3.2 - Principais reagentes e soluções

- * Solução de Hanks pH 7,2 (PAUL, 1970).
- * Solução de Alséver (tampão citrato com azida sódica pH 6,1).
- * Líquido de Turk (violeta de genciana 1% em solução de ácido acético 1%).
- * CFD - Tampão de Fixação de Complemento com 0,1% de gelatina (pH 7,2), tampão barbital, contendo CaCl₂ 0,25mM e MgCl₂ 0,83mM.
- * Solução fisiológica (NaCl 0,15M).

- * Solução de NH_4Cl 0,83% pH 7,2.
- * Solução de gelatina (*Difco*) 2,5% em NaCl 0,15M.
- * Zimosan A – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, (Sigma Z4250).
- * Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona) - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, (Sigma A8511).
- * Dimetilsulfóxido (DMSO) – Merck.
- * PBS – salina tamponada com fosfato pH 7,4.
- * Azul de Tripán – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.
- * TEA-EGTA - trietanolamina e ácido etileno glicol tetracético 8mM, com gelatina 0,1%, pH 7,4.
- * TEA-EDTA - trietanolamina e ácido etileno diamino tetracético 10mM, com gelatina 0,1%, pH 7,4.
- * TEA- Mg^{2+} - trietanolamina com magnésio 2mM, com gelatina 0,1%, pH 7,4.
- * TEA-EGTA 8mM / Mg^{2+} 2mM, com gelatina 0,1%, pH 7,4.

3.3 - Equipamentos utilizados

- * Centrífuga Refrigerada Eppendorf modelo 5810R (Eppendorf Instruments Inc., Hamburg, Germany);
- * Freezer -80°C (Forma Scientific);
- * Luminômetro EG&G Berthold, modelo Auto Lumat LB 953;
- * Microscópio Óptico Olympus BX51;
- * Espectrofotômetro DU – 70 (Beckman, Fullerton, CA, USA);
- * Leitor de ELISA Multi-Well Reader
- * Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (“Fluorescent Activated Cell Sorter”), “software Cell Quest Pro™” (Becton Dickinson).
- * cuba e fonte de eletroforese.

3.4 - Obtenção de Neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos a partir de sangue total das voluntárias, coletados através de punção venosa. Posteriormente à coleta, esse sangue foi transferido para um tubo Falcon contendo anticoagulante Alséver pH 6,1 (v/v).

A técnica empregada para separação das células foi o método de Henson (1971) modificado por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue colhido foi centrifugado a 750xg por 10 minutos a 22°C , e o plasma removido. As células sedimentadas foram

suspensas com uma solução de gelatina a 2,5% em solução fisiológica (NaCl 0,15M) na proporção de duas vezes o volume de células, e deixadas em repouso por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante contendo os neutrófilos foi centrifugado a 750xg por 10 minutos, com finalidade de retirar a gelatina. Para eliminar as hemácias presentes na solução foi utilizado um tratamento com cloreto de amônio 0,83%, pH 7,2 por 5 minutos a 37°C. Após esse período foi realizada a centrifugação a 750xg por 10 minutos. As células foram posteriormente lavadas com uma solução fisiológica e centrifugadas a 750xg por 10 minutos. Uma alíquota da suspensão de células foi diluída em líquido de Turk para contagem em Câmara de Neubauer. Então, a concentração de neutrófilos foi ajustada para 2×10^6 células/mL em solução balanceada de Hanks contendo 0,1% de gelatina, pH 7,2 e a viabilidade celular foi avaliada, volume a volume, por exclusão com o corante azul de Tripán (0,1% em NaCl 0,15M).

3.5 - Obtenção do soro humano

Os soros foram obtidos a partir do sangue total de voluntárias saudáveis, colhido por punção venosa na ausência de anticoagulante. O sangue foi deixado em repouso à temperatura ambiente durante 1 hora para retração do coágulo formado, sendo posteriormente centrifugado a 750xg por 10 minutos a 4°C. O soro obtido foi alíquotado e armazenado a -80°C até o momento do uso. A partir de soros de voluntárias saudáveis não usuárias de contraceptivos, foi constituído um *pool* de soro humano normal (SHN), o qual foi alíquotado e armazenado a -80°C até o uso. Parte desse *pool* foi submetida ao tratamento a 56°C por 30 minutos, para inativação do sistema complemento (soro humano normal inativado, SHNI) e, então, alíquotado e armazenado a -80°C até o uso.

3.6 - Preparo do estímulo: zimosan e zimosan opsonizado

O preparo do zimosan opsonizado foi realizado seguindo-se o método descrito por Cheung, Archibald e Robinson (1983). O zimosan (Sigma Z4250) (20mg) foi ressuspenso em solução de NaCl 0,15M, fervido em banho-maria durante 30 minutos, centrifugado a 400xg por 5 minutos. Parte do zimosan foi mantida sem opsonização, para ser utilizada como estímulo sem complemento. A outra parte do zimosan foi ressuspenso na proporção de 0,1mL de soro diluído 1:2 em diluente para a fixação de complemento (CFD)/gelatina 0,1%, pH 7,2 para cada 1mg de zimosan. A mistura zimosan e soro foi mantida a 37°C por 30 min para opsonização, após lavagem em PBS,

a concentração foi ajustada para 2mg de zimosan/mL de PBS. O zimosan foi opsonizado com *pool* de SHN, *pool* de SHNI e com o soro de cada voluntária usuária de contraceptivo hormonal (SHCH).

3.7 - Preparo do luminol

Para uma amplificação da resposta da medida de quimioluminescência, foi utilizada solução de luminol (Sigma). Foi pesado 5 mg de luminol e dissolvido em 1mL de DMSO, para uma solução estoque $1,0 \times 10^{-2}$ M. A adição dessa sonda no tubo de reação resultou em uma concentração final de $1,0 \times 10^{-4}$ M. O luminol é oxidado pelas ERO geradas pelo burst dos neutrófilos, atuando como uma sonda luminescente por emitir fótons quando volta ao estado eletronicamente estável.

3.8 - Medida de quimioluminescência das amostras estudadas

O ensaio de quimioluminescência (QL) foi realizado segundo Marzocchi-Machado et al. (2002). Aos tubos de reação foram adicionados: a suspensão de neutrófilos (concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/mL), a solução de Hanks contendo gelatina 0,1%, e a sonda luminol (concentração final de $1,0 \times 10^{-4}$ M). Após incubação durante 3 minutos a 37°C, foi adicionado em cada tubo os estímulos ZI/SHN, ZI/SHCH, zimosan ou ZI/SHNI (concentração final no tubo de reação de 1mg/mL) e, imediatamente a seguir foram medidas as quimioluminescência (QL) em c.p.m. (fótons contados por minuto) durante 15 minutos a 37°C, em luminômetro Autolumat LB953 (EG&G Berthold, Alemanha). Como controle da QL espontânea, cada amostra de célula foi incubada nas mesmas condições na ausência de estímulo.

3.9 - Atividade hemolítica do complemento sérico

A determinação da atividade hemolítica das vias clássica e alternativa do sistema complemento foi realizada segundo a metodologia descrita por Ferriani et al. (1999). Para tanto foi empregado um ensaio cinético a fim de determinar o T1/2 de cada amostra de soro correspondendo ao tempo requerido para que o complemento produza a lise de 50% de uma suspensão padronizada de eritrócitos. Os soros foram preparados em diferentes diluições, em tampão CFD com gelatina 0,1% pH 7,2 (via clássica), e em tampão TEA-EGTA/Mg²⁺ 2mM com gelatina 0,1% pH 7,4 (via alternativa). O ensaio hemolítico constituiu na mistura de cada diluição dos soros e de uma suspensão de eritrócitos complexados com anticorpo anti-eritrócito de carneiro (EA) (via clássica) e

de uma suspensão de eritrócitos de coelho (via alternativa). A hemólise dos eritrócitos pelo soro humano foi monitorada pelo registro da absorvância em 700nm e o T1/2 foi calculado a partir de curvas de lise.

3.9.1 - Atividade hemolítica da via clássica

3.9.1.1 - Preparo do EA (complexo eritrócito/anti-eritrócito)

Foi colhido sangue de dois carneiros, volume a volume, com Alséver pH 6,1 como anticoagulante e foi deixado a 4°C durante 24 horas. Após esse armazenamento, pegou-se uma alíquota (1mL) de sangue de cada carneiro, e cada uma delas colocadas em tubos separados. Os tubos foram completados com tampão CFD/gelatina 0,1%, e, em seguida, centrifugados a 700xg, por 10 minutos, a 22°C. Os sobrenadantes de cada tubo foram desprezados e os eritrócitos foram colocados em um mesmo tubo, que foi completado com o tampão CFD/gelatina 0,1%. O procedimento de centrifugação foi repetido mais duas vezes, perfazendo um total de três vezes. Os eritrócitos sedimentados foram ressuspensos em CFD/gelatina 0,1%, e esta suspensão foi ajustada no espectrofotômetro à densidade ótica de 0,7 a 0,8, em 700nm. Para isto, colocou-se 975µL do tampão e adicionou-se 25µL da suspensão. Foi utilizado o anticorpo anti-estroma de eritrócito de carneiro (hemolisina) que foi produzido em coelho e, previamente, titulado para o ensaio hemolítico (1:100). A hemolisina em PBS pH 7,4 foi adicionada, volume a volume, à suspensão de eritrócitos já ajustada. A amostra foi incubada na geladeira por 15 minutos. Em seguida, a suspensão de eritrócitos revestida com o anticorpo (EA) foi ajustada a uma densidade ótica de 0,7 a 0,8 em 700nm. Para isto, colocou-se 300µL do tampão e adicionou-se 600µL do EA.

3.9.1.2 - Ensaio hemolítico cinético da via clássica

Primeiramente foi feita a leitura do branco, que consistiu apenas no tampão utilizado. Foram misturados 300µL de cada diluição dos soros a 600µL da suspensão de eritrócitos (EA), finalizando um volume igual a 900µL. Os ensaios foram realizados em duas diluições diferentes:

$900\mu\text{L (1:20)} = 45\mu\text{L de soro} + 255\mu\text{L de CFD/gelatina 0,1\%} + 600\mu\text{L de EA.}$

$900\mu\text{L (1:40)} = 22,5\mu\text{L de soro} + 277,5\mu\text{L de CFD/gelatina 0,1\%} + 600\mu\text{L de EA.}$

Foi colocado o tampão CFD/gelatina 0,1% pH 7,2 nas cubetas, e, em seguida, foi colocado o soro. A mistura foi incubada em espectrofotômetro provido de banho a

37°C, por 2 minutos e 30 segundos. Após esse tempo, o EA foi colocado rapidamente nas cubetas. A cinética da lise dos eritrócitos, pelo soro humano, foi monitorada pelo registro da absorvância a 700nm, por 10 minutos. O tempo necessário para causar 50% da lise dos eritrócitos ($T_{1/2}$) foi calculado a partir de curvas de lise.

3.9.2 - Atividade hemolítica da via alternativa

3.9.2.1 - Preparo da suspensão de eritrócitos de coelho

Foi colhido sangue de dois coelhos com solução de Alséver pH 6,1 como anticoagulante, volume a volume. A esta amostra foi adicionado igual volume do tampão TEA-EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 10mM, pH 7,4, com gelatina 0,1% e, em seguida, deixada no banho-maria a 37°C, por 15 minutos. Foi feita a centrifugação a 700xg, por 10 minutos, a 20°C, o sobrenadante foi desprezado e os eritrócitos foram ressuspensos em TEA-Mg²⁺ 2mM, pH 7,4, com gelatina 0,1%, e foram lavados três vezes com esse tampão. Após esse processo, os eritrócitos foram ressuspensos em Alséver e mantidos a 4°C por 24 horas. Para o uso, pegou-se uma alíquota (500µL) da suspensão de eritrócitos de cada coelho, e adicionou-se TEA-EGTA (8mM) e Mg²⁺ (2mM), pH 7,4, com gelatina 0,1%. A amostra foi centrifugada a 700xg, por 10 minutos a 20°C, e repetiu-se esse procedimento duas vezes. Em seguida, os eritrócitos foram ressuspensos em TEA-EGTA-Mg²⁺/gelatina 0,1%, e essa suspensão foi ajustada para uma densidade ótica de 0,7 a 0,8 a 700nm no espectrofotômetro. Para isto, colocou-se 300µL do tampão e adicionou-se 600µL da suspensão de eritrócitos.

3.9.2.2 - Ensaio hemolítico cinético da via alternativa

Primeiramente, foi colocado apenas o tampão TEA-EGTA-Mg²⁺/gelatina 0,1% para leitura do branco no espectrofotômetro. Foram misturados 300µL de soro de cada diluição a 600µL da suspensão de eritrócitos, finalizando um volume igual a 900µL, sendo que foram feitas duas diluições diferentes:

900µL (1:6) = 150µL de soro + 150µL de TEA-EGTA-Mg²⁺/gelatina 0,1% + 600µL da suspensão de eritrócitos.

900µL (1:9) = 100µL de soro + 200µL de TEA-EGTA-Mg²⁺/gelatina 0,1% + 600µL da suspensão de eritrócitos.

O tampão TEA-EGTA-Mg²⁺/gelatina 0,1% foi colocado, primeiramente nas cubetas, e logo após, foi colocado o soro. Esta mistura permaneceu no espectrofotômetro em banho a 37°C, por 2 minutos e 30 segundos, em seguida, a suspensão de eritrócitos foi colocada rapidamente nas cubetas. A cinética da lise dos eritrócitos, pelo soro humano, foi monitorada pelo registro da absorvância a 700nm, por 10 minutos. O tempo necessário para causar 50% da lise dos eritrócitos (T1/2) foi calculado a partir de curvas de lise.

3.10 - Avaliação da atividade funcional do inibidor de C1

O imunoenensaio enzimático de inibidor de C1 da MicroVue (A003, Quidel™, San Diego, CA, USA) destina-se a medir a quantidade de proteína inibidora de C1 funcional em plasma ou soro humanos, utilizando-se como reagente o fragmento C1s ativado. Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

3.10.1 - Reagentes e materiais

O kit MicroVue C1-Inhibitor Enzyme Immunoassay (A003, Quidel™) é composto de cinco padrões: (A, B, C, D, E) que contêm uma quantidade conhecida de inibidor de C1 em plasma humano, dois controles: L (controle anormal) que contém plasma humano com um nível reduzido de inibidor de C1 e N (controle normal) que contém plasma humano com um nível normal de inibidor de C1.

Cada Padrão e Controle foi reconstituído com 1mL de reagente hidratante por 15 minutos e as amostras de soro das voluntárias foram diluídas 1:101 com um diluente de amostras do complemento.

3.10.2 - Procedimento do ensaio

Primeiramente, foram colocados 100µL de cada padrão e controle reconstituídos e as amostras de soro das voluntárias diluídas em microtubos previamente rotulados. Em seguida, foi adicionado 20µL do reagente de inibidor de C1 (o C1s ativado) aos microtubos e foi agitado vigorosamente. Foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e logo após foi colocado 50µL do diluente da amostra do complemento (branco), de cada padrão, dos controles e de cada amostra teste nos poços da placa. Foi incubado por 10 minutos. Após incubação, os poços foram lavados cinco vezes com solução de lavagem e em seguida, foi adicionado 50µL do anticorpo conjugado anti-

inibidor de C1 e incubou-se por 60 minutos. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com solução de lavagem, e logo após, foi colocado 100µL da solução substrato e incubado por 30 minutos. Após incubação, foi colocado 50µL da solução de parada e foi feita a leitura da densidade ótica a 405nm em leitor de ELISA EIA Multi-Well Reader. A análise dos resultados do ensaio foi feita através de curva padrão.

3.11 - Avaliação da ativação das vias clássica/lectina através da quantificação do fragmento C4d

O fragmento C4d foi determinado através do kit MicroVue C4d Fragment Enzyme Immunoassay (A008, Quidel™) que mede a quantidade de fragmentos de C4d, resultantes da clivagem da proteína C4 das vias clássica/lectina, presentes no soro e plasma humano. Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

3.11.1 - Reagentes e materiais

O kit MicroVue C4d Fragment Enzyme Immunoassay (A008, Quidel™) é composto de cinco padrões: (A, B, C, D e E) que contêm soro humano contendo quantidades conhecidas de fragmentos C4d, dois controles: H (*high*) e L (*low*) que contêm soro humano com fragmentos C4d diluídos em PBS.

Cada Padrão e Controle foi reconstituído com 2mL de reagente hidratante por 15 minutos e as amostras foram diluídas 1:70 com um diluente de amostras do complemento.

3.11.2 - Procedimento do ensaio

Primeiramente, todos os poços da placa do ensaio foram lavados três vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram colocados 100µL do diluente das amostras do complemento (branco), os padrões, os controles e as amostras de soros das voluntárias nos poços revestidos com anti-C4d. Foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, lavou-se cinco vezes com a solução de lavagem e logo após, foi colocado 50µL do anticorpo anti-C4d conjugado e foi incubado por 30 minutos. Após incubação, os poços foram lavados cinco vezes com solução de lavagem e em seguida, foi adicionado 100µL da solução substrato e incubado por 30 minutos. Após incubação, foi colocado 50µL da solução de parada e foi feita a leitura da densidade

ótica a 405nm em leitor de ELISA EIA Multi-Well Reader. Os valores das amostras foram calculados a partir da curva padrão.

3.12 - Avaliação da ativação da via alternativa através da quantificação do fragmento Bb

O fragmento Bb foi determinado através do kit MicroVue Bb Plus Enzyme Immunoassay (A027, Quidel™) que mede a quantidade de fragmentos Bb, resultantes da ativação do fator B da via alternativa do sistema complemento, presentes no soro e plasma humano. Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12.1 - Reagentes e materiais

O kit MicroVue Bb Plus Enzyme Immunoassay (A027, Quidel™) é composto de cinco padrões: (A, B, C, D e E) que contêm concentrações conhecidas do fragmento Bb no soro humano, dois controles: H (*high*) e L (*low*) que contêm soro humano com fragmentos Bb diluídos em PBS.

Cada Padrão e Controle foi reconstituído com 1mL de reagente hidratante por 15 minutos e as amostras foram diluídas 1:20 com um diluente de amostras do complemento.

3.12.2 - Procedimento do ensaio

Primeiramente, todos os poços da placa do ensaio foram lavados três vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram colocados 100µL do diluente das amostras do complemento (branco), os padrões, os controles e as amostras de soros das voluntárias nos poços revestidos com anti-Bb. Foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, lavou-se cinco vezes com a solução de lavagem e logo após, foi colocado 50µL do anticorpo conjugado anti-Bb e foi incubado por 30 minutos. Após incubação, os poços foram lavados cinco vezes com solução de lavagem e em seguida, foi adicionado 100µL da solução substrato e incubado por 15 minutos. Após incubação, foi colocado 100µL da solução de parada e foi feita a leitura da densidade ótica à 450nm em leitor de ELISA EIA Multi-Well Reader. Os valores das amostras foram calculados a partir da curva padrão.

3.13 - Determinação do inibidor de C1 no soro por técnica de imunoelektroforese semi-quantitativa em foguete

As amostras de soro das voluntárias dos grupos de contraceptivos, do Grupo Controle e de *pools* de soro humano normal (soros de mulheres não usuárias de contraceptivos) (5 μ L) foram aplicadas em orifícios de placas de vidro (7,5 x 5 cm) revestidas com agarose 1,3% em tampão barbital pH 8,3, contendo 1,3% do anticorpo anti-inibidor de C1 (A300, Quidel™). As condições da corrida foram 12h a 20mA/placa. Após a secagem do gel, as placas foram expostas ao corante Ponceau S, para melhor evidencição da reação antígeno-anticorpo. A distância percorrida pelo inibidor de C1 foi medida (em cm) a partir da borda do orifício onde a amostra de soro foi aplicada até o ponto mais alto da linha de precipitação formada.

Os ensaios foram realizados em duplicadas e na presença de pool de soro humano normal como controle das reações de precipitação.

3.14 - Quantificação dos receptores para complemento CR1 e CR3

Amostras de sangue total (100 μ L) de cada voluntária foram utilizadas. Cada amostra foi incubada, à temperatura ambiente, por 20 minutos, ao abrigo da luz, com 5 μ L do anticorpo anti-receptor específico marcado com fluorocromo ou com o anticorpo isotipo controle como descrito por Marzocchi-Machado et al. (2002). As amostras que receberam o isotipo controle foram utilizadas para descontar a fluorescência causada pela ligação inespecífica do respectivo isotipo anti-receptor à célula. Após este período de incubação, todas as amostras receberam 2000 μ L de tampão de lise (Becton & Dickinson), para lisar os eritrócitos e foram mantidas à temperatura ambiente, por 10 minutos, ao abrigo da luz, e, em seguida, centrifugadas a 755xg, a 4°C, por 10 minutos. As misturas foram lavadas em 2000 μ L de PBS/SBF (soro bovino fetal) 2%/azida \leq 0,1 % pH 7,2 gelado, a 755xg, a 4°C, por 10 minutos, e ressuspensas em 500 μ L de PBS/formol 1%, para leitura no citômetro de fluxo dentro de 24 horas.

Os anticorpos marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína) ou PE (ficoeritrina) usados foram: a) isotipo controle para anti-CR3 (clone MOPC-21; IgG1, κ); b) IgG1-PE de camundongo anti-CD11b (CR3; Mac-1) humano (clone ICRF44; IgG1, κ); c) IgG1-FITC de camundongo anti-CD35 (CR1) humano (clone E11; IgG1, κ); e d) IgG1-FITC de camundongo, isotipo controle para anti-CD35 (CR1) (clone MOPC-21; IgG1, κ). As análises foram feitas em um citômetro de fluxo modelo

FACSCalibur™ (“Fluorescent Activated Cell Sorter”), “software Cell Quest Pro™” (Becton Dickinson). Os resultados estão expressos como mediana da fluorescência/célula determinada em um histograma em escala logaritmo e como porcentagem de células fluorescentes na população total. Os neutrófilos foram identificados por tamanho e complexidade.

3.15 - Hemograma

O hemograma das amostras foi realizado no setor de Hematologia do Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, através da Metodologia Automatizada - CELL DYN 3500SL.

3.16 - Análise Estatística

Os dados não apresentaram distribuição normal, portanto foram analisados por testes não paramétricos. As comparações entre três ou mais grupos foram feitas pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Para as comparações entre o Grupo Controle e o grupo de contraceptivos, sem separar por grupos de contraceptivos, o teste utilizado foi o teste de Mann Whitney. O teste pareado de Wilcoxon foi utilizado para comparações dentro de cada grupo de contraceptivos estimulados com Zi/SHN e Zi/SCH. Para todas as análises o nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

Em virtude do $n=2$, o Grupo 5 não foi incluído nas análises estatísticas. Os dados desse grupo somente foram inseridos nas comparações quando consideramos o grupo CH total.

Para os dados epidemiológicos e hemograma, os valores são apresentados como média e desvio padrão.

4. RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Foram colhidas amostras de sangue de 64 voluntárias, e com esse material foram concluídas as seguintes etapas:

- Obtenção dos soros;
- Obtenção dos neutrófilos;

- Opsonização do zimosan com *pool* de soro humano normal (SHN), com soro humano de usuária de contraceptivo hormonal combinado (SCH) e com *pool* de soro humano normal inativado (SHI);
- Avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilos por quimioluminescência (QL):
 1. Padronização dos ensaios de QL: diferentes concentrações de zimosan;
 2. Avaliação do efeito dos contraceptivos hormonais combinados (CHC) sobre a atividade opsonizante do complemento sérico: ensaios de QL com neutrófilos de voluntárias que usam CHC estimulados com zimosan, zimosan opsonizado por SHN (ZI/SHN), com ZI opsonizado como soro da própria usuária de CHC (ZI/SCH) e com ZI opsonizado por SHI (ZI/SHI);
 3. Avaliação do efeito dos CHC sobre a função dos receptores para complemento (CR) em mediar o *burst* oxidativo: ensaios de QL com neutrófilos de voluntárias que usam CHC e voluntárias que não usam CHC (controles) estimulados com ZI/SHN.
- Avaliação da atividade hemolítica do complemento sérico: vias clássica e alternativa;
- Medida da concentração sérica e da atividade do inibidor de C1;
- Avaliação da ativação da vias clássica/lectina através da quantificação do fragmento C4d;
- Avaliação da ativação da via alternativa através da quantificação do fragmento Bb;
- Determinação do inibidor de C1 no soro, por técnica de imunoelektroforese semi-quantitativa em foguete;
- Quantificação dos receptores para complemento CR1 e CR3 dos neutrófilos por citometria de fluxo;
- Como controle, hemogramas foram realizados nas amostras de sangue das voluntárias.

5. RESULTADOS

6 - DISCUSSÃO

A contracepção confiável é uma das principais conquistas do último século, particularmente para as mulheres. Cerca de 100 milhões de mulheres em todo o mundo usam contraceptivos na forma de pílula. Além da contracepção, o uso da pílula tem

benefícios terapêuticos para muitas desordens ginecológicas, por exemplo, dismenorréia, sangramentos irregulares e excessivos, acne, endometriose e, sobretudo, reduz a incidência de anemia por deficiência de ferro (DHONT, 2010). No entanto, não há dúvidas de que o estrógeno aumenta de 2 a 4 vezes o risco de tromboembolismo e estudos epidemiológicos mostram que o efeito do estrógeno é modulado pelo tipo de progestagênio associado (VAN HYLCKAMA et al., 2009).

Desde o advento da pílula há 50 anos, há uma busca constante para minimizar os efeitos colaterais indesejáveis dos contraceptivos hormonais, caracterizada pela redução das doses de hormônios, diferentes combinações de progestagênios com estrogênio e o desenvolvimento de vias alternativas de administração. Esta evolução foi e é facilitada pelos avanços no conhecimento dos mecanismos hormonais e monitoramento dos efeitos metabólicos e endócrinos elucidados pelos contraceptivos (DHONT, 2010).

Em virtude do crescente interesse científico nas interações entre o sistema complemento (SC), a hemostasia e o uso de contraceptivos hormonais, nesse estudo nós investigamos o efeito do uso de diferentes contraceptivos hormonais combinados (CHC) sobre o sistema complemento.

As atividades biológicas do SC são mediadas por produtos gerados durante a sua ativação. Os receptores para complemento (CR) reconhecem produtos de ativação, como C3b, depositados nas superfícies estranhas, promovendo lise, fagocitose e/ou *clearance*. Já os peptídeos quimiotáticos (C3a, C4a e C5a) favorecem a resposta inflamatória (RICKLIN et al., 2010).

Esta investigação abordou o efeito do uso dos CHC sobre diferentes funções do sistema complemento: a capacidade dos receptores para complemento (CR) mediar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) dos neutrófilos (*burst oxidativo*); a capacidade opsonizante do soro, para estimular os CR nos neutrófilos; a atividade hemolítica do complemento sérico; os níveis séricos e atividade funcional do inibidor de C1 e a geração de produtos de ativação do SC.

Primeiramente nós analisamos a capacidade dos CR (CR1 e CR3) nos neutrófilos de usuárias de CHC responderem ao estímulo opsonizado com fragmentos do complemento de soro humano normal. Para esta análise, nós estimulamos os neutrófilos das voluntárias de CHC com zimosan opsonizado com *pool* de soro de

voluntárias não usuárias de CHC. Neste modelo, a única variável dependente do efeito do CHC é o CR no neutrófilo da usuária de contraceptivo.

O método de quimioluminescência (QL) foi usado para estudar o efeito dos CHC no *burst* oxidativo dos neutrófilos mediado pelos CR em resposta aos produtos de ativação do SC. A comparação do grupo de mulheres CHC como um todo, sem discriminar os diferentes tipos, com o Grupo Controle não mostrou diferença. No entanto, quando consideramos os diferentes CHC em grupos separados, a produção de ERO apresentou variações entre os grupos, embora não significativas na maioria das análises estatísticas. Houve uma tendência a maior produção de ERO no Grupo 1 (drospirenona + 30µg de estrogênio) em relação ao controle. É difícil explicar este resultado, uma vez que os Grupos 2 e 3 compartilham com o Grupo 1 o mesmo progestagênio e a mesma concentração de estrogênio, respectivamente, e não mostraram aumento da QL. Talvez a associação hormonal no Grupo 1 seja a responsável pela tendência ao aumento da produção de ERO.

A geração de ERO pelos neutrófilos é mediada pelas enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase (MPO), representando um importante mecanismo da imunidade inata contra patógenos (ROSS et al., 2003). Várias evidências mostram que os hormônios esteróides sexuais influenciam o padrão da resposta inflamatória em humanos, em particular, o papel do progestagênio como um imunossupressor natural, que modula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias nos neutrófilos (CUTOLO et al., 2004). Quando os níveis de progestagênio estão elevados, como na gravidez e na fase lútea do ciclo menstrual, há uma maior suscetibilidade às infecções por *Candida albicans* (FIDEL et al., 2000). Chen e colaboradores (2009) relataram o efeito modulador importante do progestagênio na interação de neutrófilos com cepas de *Neisseria gonorrhoeae* causadoras de infecção assintomática. Os autores observaram que o progestagênio induz um atraso na apoptose de neutrófilos sem contudo alterar o *burst* oxidativo.

Quanto ao estrogênio, Babior et al. (1973) demonstraram que o estrogênio aumenta a produção de ânion superóxido por neutrófilos ativados. Também foi descrito que o estrogênio pode liberar MPO dos neutrófilos (KLEBANOFF et al., 1977). Estas observações podem explicar o aumento da resposta de QL dos neutrófilos causada pelo estrogênio descrita por Jansson (1991), que implica na liberação de MPO. Além disso, Kenneth et al. (2004) mostraram que o estrogênio aumenta a desgranulação (MPO e elastase) e a produção de ânion superóxido, a primeira ERO gerada no *burst* oxidativo

pelos neutrófilos. O aumento da MPO resultou em aumento da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Esta observação suporta a hipótese da ação benéfica pró-oxidante do estrogênio, uma vez que a oxidação da LDL favorece seu *clearance* e, conseqüentemente, contribui para a prevenção da doença cardiovascular.

Assim, a tendência ao aumento da QL observado no Grupo 1 pode refletir um efeito da maior concentração de estrogênio (30µg) comparada aos outros grupos e não ser influenciada pelo progestagênio. Embora, o Grupo 3 também tenha a mesma concentração de estrogênio, o número de amostras (n) foi pequeno. Isto pode ter subestimado o efeito do estrogênio na QL dos neutrófilos desse grupo.

Ainda utilizando o modelo de QL dos neutrófilos, uma segunda abordagem analisou o efeito dos CHC na capacidade opsonizante do soro. Nesta análise, nós comparamos a resposta de QL das usuárias de CHC estimulada por complemento autólogo (SCH) com aquela destas mesmas células estimuladas com complemento do Grupo Controle (SHN). A mesma população de neutrófilos foi comparada com diferentes fontes de complemento. As comparações foram pareadas dentro de cada grupo de CH. O Grupo 4 foi o único que apresentou diferença significativa entre o SHC e o SHN. Nós observamos uma redução na produção de ERO quando os neutrófilos do Grupo 4 foram estimulados com zimosan opsonizado pelo soro autólogo (Zi/SCH). Este resultado pode sugerir uma redução dos níveis séricos do complemento, mas no momento nós não temos dados para suportar esta hipótese. As análises séricas realizadas nesse grupo incluíram somente a atividade hemolítica e a determinação semi-quantitativa do inibidor de C1, sendo que para ambas não observamos diferença em relação ao controle. Desta maneira, esta redução da QL mediada pelo nível sérico do complemento no Grupo 4 permanece a esclarecer.

É importante ressaltar que apesar de todos os efeitos fisiológicos do estrogênio na manutenção das funções reprodutivas e não reprodutivas estes efeitos dependem do tipo celular, do tipo de receptor de estrogênio, da dose e da exposição ao hormônio. O estrogênio também tem sido associado à indução de ERO, as quais podem mediar a ativação de fatores de transcrição para a progressão do câncer (OKOH et al., 2011).

O estrogênio pode também exercer efeitos anti-oxidantes por ação do seu metabólito catecolestrogênio no ciclo de *redox* do ferro e, então, atuar nos genes com elementos responsivos para anti-oxidantes. Assim, por suas ações anti- e pró-oxidantes

o estrogênio pode produzir ambos efeitos benéficos e adversos importantes na prevenção e na patogênese das doenças (NATHAN; CHAUDHURI, 1998).

Os resultados das respostas de QL dos neutrófilos sugeriu a avaliação da expressão de CR1 e CR3, uma vez que esses eram os receptores envolvidos na produção de ERO pelos neutrófilos estimulados com zimosan opsonizado por complemento. Nós analisamos a densidade da expressão desses receptores na membrana dos neutrófilos, que foi expressa pela intensidade de fluorescência/célula, e pela porcentagem de neutrófilos positivos, ou seja, a % de neutrófilos expressando o receptor na população estudada.

A densidade do CR1 e do CR3 na membrana dos neutrófilos e a % de neutrófilos positivos para CR3 não foram diferentes entre os grupos estudados. Esta observação contribui para o entendimento da resposta de QL, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos, apesar da tendência de aumento da QL no Grupo 1. No entanto, nós encontramos uma redução significativa da % de neutrófilos expressando CR1 no grupo CH como um todo e nos Grupos 3 e 4, quando comparados ao controle. Este tipo de observação, geralmente, reflete uma característica adquirida. Neste caso, sugere-se que seria adquirida pelo efeito do CH sobre o CR1 no neutrófilo.

O efeito dos hormônios esteróides sexuais na expressão dos CR é pouco explorado e há uma escassez de relatos na literatura. Jansson e Holmdahl (1998) mostraram que a artrite reumatoide (AR) tende a melhorar durante a gravidez, correspondendo com níveis de estrogênio elevados e que este também suprime a AR induzida por colágeno. Nilsson et al. (2009) descreveram um possível papel do estrogênio na expressão do CR1 em um modelo de AR induzida por colágeno em camundongos. Esses autores observaram uma redução da expressão do CR1 em linfócitos B dos camundongos com AR e ovariectomizados, sugerindo um efeito protetor do estrogênio contra a auto-imunidade. Ainda nesse estudo, os autores compararam a expressão de CR1 nos linfócitos B de homens e mulheres saudáveis. Eles observaram uma redução de CR1 no grupo de mulheres, que foi relacionada com o aumento da idade. Estas observações podem sugerir uma explicação para o aumento da frequência de AR na pós-menopausa.

Quanto ao CR3, o único trabalho que encontramos na literatura foi realizado por Lamote et al. (2006). Eles investigaram se a ocorrência frequente de mastite em vacas

no final da gestação era influenciada pelos esteróides sexuais. O estudo analisou a viabilidade e a expressão de CR3 em neutrófilos. Nem o estrogênio nem o progestagênio influenciaram a expressão do CR3. Nosso resultado está de acordo com esta observação, uma vez que o CR3 não foi influenciado por nenhum dos CHC estudados.

Até aqui pode ser sugerido que o aumento da QL no Grupo 1 não é devido a alteração da expressão dos CR, mas provavelmente esteja relacionada ao efeito do estrogênio diretamente na liberação da MPO e produção de ERO. Os resultados obtidos apontam para a investigação futura dos mecanismos envolvidos na ativação da NADPH oxidase e da desgranulação dos neutrófilos.

Como já discutido, o tempo de exposição ao estrogênio pode ser determinante dos efeitos deste sobre diferentes órgãos e sistemas no organismo. Isto pode apontar a favor do caráter adquirido na redução de neutrófilos positivos para CR1 nos Grupos 3 e 4. Assim, nossos resultados precisam ser reconsiderados a luz da relação do tempo de uso do CHC e da análise da expressão de CR1.

Na etapa seguinte, nós analisamos a AH do SC medida pelo T1/2. O T1/2 representa o tempo necessário para que o complemento presente no soro lise uma suspensão de eritrócitos padronizada. O valor de T1/2 é inversamente proporcional à AH, isto é, quanto menor o valor de T1/2, maior a AH do SC. Nós observamos um aumento significativo da AH da via clássica (VC) nos Grupos 1 e 2, quando comparados ao controle e uma diminuição significativa da AH no Grupo 3, quando comparada aos Grupos Controle, 1 e 2. Também não há muitos dados na literatura para fundamentar nossos resultados. Booth e Lucchesi (2007) mostraram que o tratamento com estrogênio reduziu a ativação do SC, em um modelo de isquemia cardíaca em coelho, e que esse efeito foi antagonizado por progestagênio. É muito difícil relacionar este resultado com os nossos, por se tratarem de modelos diferentes. No nosso estudo, nos Grupos 1 e 3 há a mesma concentração de estrogênio (30µg) e a AH destes é influenciada de maneira inversa, com aumento e diminuição, respectivamente.

A drospirenona é o progestagênio dos Grupos 1 e 2, os quais diferem quanto à concentração de estrogênio, 30µg no primeiro e 20µg no segundo grupo, e esses grupos não apresentaram diferenças na AH entre si, mas mostraram um aumento significativo em relação ao controle e ao Grupo 3. Contudo, os Grupos 1 e 3 diferem quanto ao tipo de progestagênio, drospirenona e levonorgestrel, respectivamente. Este resultado sugere

um efeito modulador da AH da VC do SC por diferentes progestagênios, a qual merece atenção e precisa ser investigada mais detalhadamente.

Uma vez que os radicais livres, tais como as ERO, estão envolvidos na lesão tecidual associada com os processos inflamatórios, dentre estes a ativação do complemento, no nosso estudo podemos especular que o efeito do CHC do Grupo 1 no aumento da QL dos neutrófilos, somado ao aumento da atividade hemolítica, pode ter implicações nos processos inflamatórios crônicos. Obviamente, a hipótese de um efeito benéfico ou adverso deve ser considerada em um contexto mais amplo e bem definido para cada modelo.

Ainda quanto à influência dos CHC na ativação da VC e nenhum efeito sobre a via alternativa (VA), podemos comentar as inter-relações do sistema complemento com a hemostasia. O SC e a hemostasia têm implicações clínicas importantes no contexto da lesão tecidual e da inflamação. Embora esses sistemas tenham sido descritos como cascatas separadas, ambos pertencem a uma complexa rede inflamatória e exibem algumas características similares e comuns em relação às funções de seus ativadores e inibidores. Em particular, o inibidor de C1 e as proteínas C e S (AMARA et al., 2010).

Várias interações entre o SC e a hemostasia têm sido propostas, embora ainda não completamente elucidadas (AMARA et al., 2008). Atenção especial é dada ao angioedema observado na terapia de reposição hormonal com estrogênio (BINKLEY; DAVIES, 2000; 2004; BORK et al., 2003; 2006). O estrogênio pode precipitar ataques de angioedema, enquanto o progestagênio pode ser protetor (KAPLAN, JOSEPH, 2010).

O fator XII ativado (FXIIa) da coagulação pode ativar o componente C1r do complemento e iniciar a ativação da VC. O inibidor de C1 controla negativamente as 3 vias de ativação do SC e também a via intrínseca da coagulação (a calicreína e o FXIIa) (DAVIES et al., 2008).

No angioedema provocado pelo estrogênio, os pacientes têm níveis funcionais normais de inibidor de C1 e na maioria são mulheres (KAPLAN, JOSEPH, 2010). Há um subgrupo de pacientes com angioedema que apresentam uma mutação no gene do FXII, que quando ativado, tem uma atividade muito maior do que a proteína normal (CHICON et al., 2006), levando ao aumento da produção de bradicinina, que resulta em angioedema.

Além deste mutante, altos níveis de estrogênio, como na gravidez e no uso de contraceptivos orais, estão associados com o aumento do FXII, provavelmente devido a um fator responsivo ao estrogênio na região promotora para o gene do FXII (FARSETTI et al., 1995). Sob condições com elevados níveis de estrogênio, a maior disponibilidade do FXII para a ativação favorece a produção da bradicinina. Os níveis aumentados de estrogênio durante a gravidez e o uso de contraceptivos também podem estar associados com níveis reduzidos do inibidor de C1. O inibidor de C1 inibe o FXIIa e a calicreína; a redução da inibição do FXIIa e da calicreína com altos níveis de estrogênio também favorece a formação da bradicinina. Somado a isso, o estrogênio ainda suprime a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA), que degrada a bradicinina e seu metabólito ativo. O aumento de estrogênio e a diminuição da ECA favorecem o acúmulo da bradicinina. Esta por sua vez é um importante mediador da vasodilatação e extravasamento de líquido, ocasionando o inchaço característico do angioedema (BINKLEY, 2010).

No nosso estudo, a avaliação do inibidor de C1 funcional não mostrou diferença entre os grupos. Curiosamente, na análise semi-quantitativa do inibidor de C1 sérico, houve um aumento significativo da concentração do inibidor de C1 no grupo de CHC considerado em conjunto, sem discriminar o tipo de CHC, em relação controle. Quando consideramos os diferentes grupos, somente o Grupo 3 mostrou níveis do inibidor de C1 significativamente elevados quando comparados ao Grupo Controle. No Grupo 3 o aumento do inibidor de C1 sérico relacionou-se com a diminuição da atividade hemolítica da VC, que pode estar mais lenta por aumento da inibição do C1 nessa via. Além disso, esse grupo apresentou diminuição do fragmento C4d (produto da ativação das vias clássica/lectina). Uma vez que o inibidor de C1 regula C1 e C4 (KAPLAN; JOSEPH, 2010), a diminuição dos níveis de C4d pode ser devida ao maior nível deste inibidor neste grupo. No entanto, não houve relação dos resultados para os Grupos 1 e 2, onde a AH está mais acelerada e os níveis de inibidor de C1 não diferem do controle.

As voluntárias usuárias de CHC incluídas neste estudo não têm diagnóstico de angioedema. Nós especulamos que este aumento do inibidor de C1 possa estar relacionado com possíveis alterações na hemostasia ocasionadas pelo uso de CHC (VLIEG et al., 2009). O nosso estudo faz parte de um projeto mais amplo que avalia também a hemostasia nos grupos de CHC aqui analisados. No entanto, os resultados da

hemostasia não fazem parte do contexto deste trabalho e não são apresentados aqui, porém podem ser discutidos.

Huber-Lang e colaboradores (2006) demonstraram que a trombina é capaz de gerar o produto de ativação C5a na ausência de C3 em estudo murino. Em outro estudo, Clark e colaboradores (2008) sugeriram que a trombina e a plasmina podem contribuir para uma ativação não tradicional do complemento na ausência de C4 e durante a inibição do fator B.

Amara e colaboradores (2010) mostraram que a trombina, o FXIIa e a plasmina são capazes de gerar C3a e C5a *in vitro*. Além disso, o FXIIa resultou na diminuição da AH do soro. Estes resultados podem suportar nossas observações, em especial para o Grupo 3, que apresentou resultados significativamente diferentes em relação ao controle. No Grupo 3 observou-se aumento do tempo de protrombina (resultado não apresentado) e uma tendência ao aumento do FXII. Como demonstrado por Amara e colaboradores (2010), a trombina pode ativar C3. Portanto, os resultados sugerem que um maior consumo de C3 pode comprometer a amplificação da ativação da VC e assim reduzir a AH do Grupo 3. Este aumento no consumo de tempo de protrombina não ocorre nos Grupos 1 e 2 e, ao contrário do Grupo 3, há uma maior AH ainda não explicada.

A tendência ao aumento do FXII pode sugerir que no Grupo 3, neste momento, há uma maior demanda de inibidor de C1, o que explicaria o aumento do inibidor de C1 sérico, que por sua vez ocasionaria a diminuição da AH da VC e conseqüentemente do C4d sérico. No entanto, é difícil explicar a diminuição do C4d e aumento da AH da VC nos Grupos 1 e 2, com níveis de inibidor de C1 igual ao Grupo Controle. No estudo realizado por Liu et al. (2005) observou-se um aumento da ligação do fragmento C4d nos eritrócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico ativo, sugerindo que esta característica possa ser um marcador da ativação da VC e atividade da doença. Se o aumento da AH da VC nos Grupos 1 e 2 poderia ser resultante da deposição de C4d nos eritrócitos, reduzindo os níveis séricos deste fragmento, precisa ser investigado. De qualquer forma, se essa hipótese for verdadeira, provavelmente a redução dos níveis séricos de C4d nos Grupos 1 e 2 teriam causas diferentes da mesma redução observada no Grupo 3.

Já a análise da VA não mostrou diferença entre os grupos de CHC e o Grupo Controle. Os resultados para a VA estão de acordo com a literatura que apontam as principais interações moleculares do SC e da coagulação com a regulação mediada pelo

inibidor de C1, envolvendo principalmente a VC do SC (BINKLEY, 2010). Ainda que recentemente a literatura apontou para interações moleculares entre o SC e a hemostasia, demonstrando a participação das serinas proteases, comuns a ambas as vias, na clivagem de C3 e C5, o FXIIa foi a mais eficiente de todas (AMARA et al., 2010). Considerando-se que o FXII é regulado pelo inibidor de C1, a interação com a VC parece ser mais óbvia.

Em conjunto, no cenário do foco inflamatório, pode-se imaginar que vários fatores da coagulação contribuem local e sistemicamente para a geração de C3a e C5a, os quais, por sua vez, são quimioatraentes para os fagócitos. Estas células liberam proteases, ERO e citocinas no local da inflamação. As citocinas pró-inflamatórias podem levar à diminuição de proteínas anticoagulantes, por exemplo, proteínas C e S. As atividades pró-coagulantes do SC são aumentadas quando mecanismos anticoagulantes são inibidos, de modo a estabelecer interações de equilíbrio entre os dois sistemas. Frente a esta rede tão complexa, o SC e a hemostasia devem ser analisados em um contexto unificado (ESMON, 2004; MARKIEWSKI et al., 2007; AMARA et al., 2010). O entendimento deste processo torna-se um desafio ainda maior quando somamos a esta rede o efeito dos diferentes CHC, cada um com sua estrutura molecular, dose e variedade de receptores amplamente distribuídos em diferentes tecidos.

Muitas das observações neste estudo são difíceis de relacionar com a literatura, em parte pela escassez de estudos abordando as interações SC, hemostasia e CHC. Mas, sobretudo porque se faz necessário um estudo multicêntrico e multidisciplinar, reunindo as observações dos efeitos biológicos, dados clínicos e laboratoriais, para, então, definir se os efeitos observados têm implicações benéficas ou adversas para a homeostase.

7 - CONCLUSÕES

- A associação drospirenona + 30µg de estrogênio (Grupo 1) mostrou uma tendência a aumentar o *burst* oxidativo dos neutrófilos mediado por receptores para complemento;
- A associação gestodeno + 20µg de estrogênio (Grupo 4) mostrou redução da capacidade opsonizante do complemento sérico;

- As associações levonorgestrel + 30µg de estrogênio (Grupo 3) e gestodeno + 20µg de estrogênio (Grupo 4) promoveram uma redução da % de neutrófilos positivos para a expressão de CR1;
- As associações drospirenona + 30µg de estrogênio (Grupo 1) e drospirenona + 20µg de estrogênio (Grupo 2) promoveram um aumento da atividade hemolítica da via clássica do SC;
- A associação levonorgestrel + 30µg de estrogênio (Grupo 3) promoveu uma redução da atividade hemolítica da via clássica do SC;
- As associações de CHC nos Grupos 1, 2 e 3 promoveram uma diminuição do nível sérico de C4d, que mede o produto da ativação das vias clássica/lectina do SC;
- A associação levonorgestrel + 30µg de estrogênio (Grupo 3) apresentou um aumento da concentração de inibidor de C1 sérico;
- Nenhuma das associações de CHC estudadas mostrou diferenças na ativação da via alternativa do sistema complemento;
- Os resultados sugerem que algumas das funções do sistema complemento podem ser moduladas pelas diferentes combinações hormonais existentes nos contraceptivos. É necessário investigar se esta influência tem implicações para a homeostase, se está relacionada o tempo de uso do contraceptivo e os mecanismos envolvidos nessa modulação.

8 - REFERÊNCIAS

AGOSTONI, A.; AYGOREN-PURSUN, E.; BINKLEY, K.E. et al. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, n. 114:S.51-131, 2004.

AHRENDT, H.J.; MAKALOVÁ, D.; PARKE, S.; MELLINGER, U.; MANSOUR, D. Bleeding pattern and cycle control with an estradiol-based oral contraceptive: a seven-cycle, randomized comparative trial of estradiol valerate/dienogest and ethinyl estradiol/levonorgestrel. **Contraception**, v. 80:436-440, 2009.

ALBUQUERQUE, H.P.C.; VIDAL, P.C. Trombose venosa profunda: revisão dos conceitos atuais. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.31, n.10, 1996.

AMARA, U.; FLIERL, M.A.; RITTIRSCH, D.; KLOS, A.; et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. **The Journal of Immunology**, v. 185:5628-36, 2010.

AMARA, U.; RITTIRSCH, D.; FLIERL, M.; BRUCKNER, U.; KLOS, A.; GEBHARD, F.; LAMBRIS, J.D.; HUBER-LANG, M. Interaction between the coagulation and complement system. **Advance in Experimental Medicine and Biology**, v.632:71-79, 2008.

ANDRE, C.; ANDRE, F.; VEYSSEYRE-BALTER, C. et el. Acquired angioneurotic edema induced by hormonal contraception. **Presse Medical**, n. 32:831-5, 2003.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **The Journal of Clinical Investigations**, v.52:741-744, 1973.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Basic Life Science**, n. 49:815-21, 1988.

BERTINA, R.M. Molecular risk factors for thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, n. 82:601-9, 1999.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Complement lysis: a hole is a hole. **Immunology Today**, 12:318-20, 1991.

BINKLEY, K.E.; DAVIES, A.III. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**, n. 106:546-50, 2000.

BINKLEY, K.E.; DAVIS III, A.E. Estrogen-dependent and estrogen-associated inherited angioedema (previously HAE III), **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.114: S62-S64, 2004.

BINKLEY, K.E. Factor XII mutations, estrogen-dependent inherited angioedema, and related conditions. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v.6:16, 2010.
Binkley KE.

BLOEMENKAMP, K.W.; ROSENDAAL, F.R.; HELMERHORST, F.M. et al. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. **The Lancet**, n. 346:1593-6, 1995.

BLOOM, A.L. et al. **Haemostasis and thrombosis**. New York: Churchill Livingstone, 3rd ed. 1994. v.1.

BOOTH, E.A.; LUCCHESI, B.R. Medroxyprogesterone acetate prevents the cardioprotective and anti-inflammatory effects of 17beta-estradiol in an in vivo model of myocardial ischemia and reperfusion. **American Journal of Physiological Heart and Circulatory Physiology**. v.293, n.3:H1408-15, 2007.

BORK, K.; BARNSTEDT, S.E.; KOCH, P.; TRAUPE, H. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. **The Lancet**, v.356:213-217, 2000.

BORK, K.; FISCHER, B.; G. DEWALD, G. Recurrent episodes of skin angioedema and severe attacks of abdominal pain induced by oral contraceptives or hormone replacement therapy, **The American Journal of Medicine**, 114:294-298, 2003.

BORK, K. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor activity including hereditary angioedema with coagulation factor XII gene mutations. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.26:709-24, 2006.

CHEN, H.; WU, Z.; LI, J.; CHEN, R.; YU, Y.; XU, L.; SHUAI, J.; TU, Y.T. Effect of progesterone on gonococci-induced apoptosis and respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. **International Journal of Dermatology**, v.48:1011-1016, 2009.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.130, p.2324-2339, 1983.

CHIANG, K.; PARTHASARATHY, S.; SANTANAM, N. Estrogen, neutrophils and oxidation. **Life Sciences**, v.75:2425-38, 2004.

CICHON, S.; MARTIN, L.; HENNIES, H.C. et al. Increased activity of coagulation factor XII causes hereditary angioedema type III. **The American Journal Human Genetics**, n. 79:1098-104, 2006.

CID, M.C.; SCHNAPER, H.W.; KLEINMAN, H.K. Estrogens and the vascular endothelium. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 966:143-57, 2002.

CLARK, A.; WEYMANN, A.; HARTMAN, E.; et al. Evidence for non-traditional activation of complement factor C3 during murine liver regeneration. **Molecular Immunology**, v.45: 3125–3132, 2008.

COLMAN, R.W. Surface-mediated defense reactions: the plasma contact activation system. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 73:1249-53, 1984.

COLMAN, R.W.; CLOWES, A.W.; GEORGE, J.N. et al. Overview of coagulation, fibrinolysis, and their regulation. In: COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J. (Ed). **Haemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice**. 4th ed. 2001. p.17-20.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; CAPELLINO, S.; ET AL . Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. **Lupus**, v.13:635–638, 2004.

DAVIS, A. E. III; MEJIA, P.; LU, F.. 2008. Biological activities of C1 inhibitor. **Molecular Immunology**, v. 45: 4057–4063, 2008.

DEWALD, G.; BORK, K.; Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor, **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.343:1286-1289, 2006.

DHONT, M. History of oral contraception. **The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care**, v. 15, n.S2:S12-18, 2010.

DIAS DA SILVA, W.; LEPOW, I.H. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. **The Journal of Experimental Medicine**, n. 125:921-46, 1967.

DUAN, Q.L.; BINKLEY, K.; ROULEAU G.A. Genetic analysis of Factor XII and bradykinin catabolic enzymes in a family with estrogen-dependent inherited angioedema. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123. n. 4:906-910, 2009.

DUNKELBERGER, J.R.; SONG, W.C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, n.20:34-50, 2010.

ERKKOLA, R. Recent advances in hormonal contraception. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, n.19, p.547-553, 2007.

ESMON, C. T. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. **Trends in Immunology**, v.25:536–542, 2004.

ESMON, C.T. The impact of the inflammatory response on coagulation. **Thrombosis Research**, n. 114:321-7, 2004.

FARSETTI, A.; MISIT, S.; CITARELLA, F. et al. Molecular basis of estrogen regulation of the Hageman factor WII gene expression. **Endocrinology**, n. 136:5076-83, 1995.

FERREIRA, A.C.P.; MONTES, M.B.A.; FRANCESCHINI, S.A. et al. Efeitos do contraceptivo oral contendo 20 µg de etinilestradiol e 150 µg de desogestrel sobre os sistemas de coagulação e fibrinólise. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 22:77-87, 2000.

FERREIRA, A.C.P.; MONTES, M.B.A.; FRANCESCHINI, S.A. et al. Effects of two oral contraceptives, containing 30 or 20 µg of ethinyl estradiol in combination with gestodene, on blood coagulation and fibrinolysis in Brazilian women. **International Journal of Fertility**, n. 46:265-70, 2001.

FIDEL, P.L. JR.; CUTRIGHT, J.; STEELE C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v.68: 651–657, 2000.

FERRIANI, VP; BARBOSA, JE; DE CARVALHO, IF. Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children. **Acta Paediatrica.**, v. 88, n10, 1999, p.1062-6.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, n. 34:229-37, 2001.

FRANK, M.M. Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management in the United States. **Immunology and Allergy Clinic of North American**, v.26:653-658 2006.

FUJITA, T.; ENDO, Y.; NONAKA, M. Primitive complement system- recognition and activation. **Molecular Immunology**, n. 41:103-11, 2004.

GAUSSEM, P.; ALHENC-GELAS, M.; THOMAS, J.L.; BACHELOT-LOZA, C.; REMONES, V.; ALI, F.D.; AIACH, M.; SCARABIN,P.Y. Haemostatic effect of a new

combined oral contraceptive, norgestrel acetate/17 β -estradiol, compared with those of levonorgestrel/ethinyl estradiol. **Thrombosis and Haemostasis**, v.105, 2011.

GHEBREHIWET, B.; SILVERBERG, M.; KAPLAN, A.P. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. **The Journal of Experimental Medicine**, v.153: 665–676, 1981.

GORDON, E.M.; WILLIAMS, S.R.; FRENCH, B.; MAZUR, C.A. et al. Dose dependent effects of postmenopausal oestrogen and progestin on antithrombin III and factor XII. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, n. 111:52-6, 1988.

HENSON, P.M. The immunology release of constituents from neutrophils leukocytes. I The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **The Journal of Immunology**, v.107, n.6, p.1535-1546, Baltimore 1971.

HUBER-LANG, M.; SARMA, J. V.; ZETOUNE, F. S.; et al.. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. **Nature Medicine**, v.12:682–687, 2006.

JANSSON G., Oestrogen-induced enhancement of myeloperoxidase activity in human polymorphonuclear leukocytes—a possible cause of oxidative stress in inflammatory cells. **Free Radical Research Communications**, v.14:195–208, 1991.

JANSSON, L.; HOLMDAHL, R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. **Inflammatory Research**, v.47:290-301, 1998.

JICK, H.; JICK, S.S.; GUREWICH, V.; MYERS, M.W.; et al. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestogen components. **The Lancet**, n. 346:1589-93, 1995.

KEMMEREN, J.M.; ALGRA, A.; GROBBEE, D.E. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. **British Medical Journal**, n. 323: 1-9, 2001.

KIM, V.; SPANDORFER, J. Epidemiology of venous thromboembolic disease. **Emergency Medicine Clinics of North America**, n. 19:839-59, 2001.

KAPLAN, A.; JOSEPH, K. The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v.104:193-204, 2010.

KLEBANOFF, S.J. Estrogen binding by leukocytes during phagocytosis. **The Journal of Experimental Medicine**, n. 145: 983–998, 1977.

KLUFT, C.; LANSINK, M. Effect of oral contraceptives on haemostasis variables. **Thrombosis and Haemostasis**, n. 78:315-26, 1997.

LAMOTE, I.; MEYER, E.; DE KETELAERE, A.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH C. Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation. **Veterinary Research**, v.37, n.1:61-74, 2006.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. **Trends in Cardiovascular Medicine**, n. 15:254-9, 2005.

LEVY, J.H.; FREIBERGER, D.J.; ROBACK, J. Hereditary angioedema: current and emerging treatment options. **Anesthesia and analgesia**, n. 110:1271-80, 2010.

LIDINGTON, E. A.; HASKARD, D.O.; MASON, J.C. Induction of decay-accelerating factor by thrombin through a protease-activated receptor 1 and protein kinase C-dependent pathway protects vascular endothelial cells from complement-mediated injury. **Blood** v.96, n.8:2784–2792, 2000.

LISZEWSKI, M.K. et al. Control of the complement system. **Advanced Immunology**, n. 61:201-84, 1996.

LIU, C.C.; MANZI, S.; KAO, A.H.; RUFFING, M.J.; NAVRATIL, J.S.; AHEARN, J.M.; Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatism**, v.52:3087-3099, 2005.

LOOSE-MITCHELL, D.S.; STANCEL, G.M. **Estrogens and progestins**. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1597-1634.

LUCCHESI, B.R. Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. **Arzneimittelforschung**, v. 44: 420–432, 1994.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **The Journal of Immunology**, Baltimore, n. 132:2015-20, 1984.

MANTOVANI, B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Immunology**, n. 115:15-17, 1975.

MARKIEWSKI, M. M.; NILSSON, B.; EKDAHL, K.N.; MOLLNES, T.E.; LAMBRIS, J.D. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? **Trends in Immunology**, v.28:184-192, 2007.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M. **Caracterização do sistema complemento nas funções efetoras envolvidas no clearance de imunocomplexos, BSA/IgG anti-BSA, no lúpus eritematoso sistêmico**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, 2000.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ALVES, C.M.O.S.; AZZOLINI, A.E.C.S. et al. Fc gamma and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, London, v. 11, n. 4, 2002, p. 240-248.

MC MURRAY, R.W. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. **International Immunopharmacology**, n. 1:995-1008, 2001.

MOLLNES, T.E.; JOKIRANTA, T.S.; TRUEDSSON, L. et al. Complement analysis in the 21st century. **Molecular Immunology**, n. 44:3838-49, 2007.

MÜLLER-EBERHARD, H.J. Molecular organization and function of the complement system. **Annual Review of Biochemistry**, n. 57:321-47, 1988.

NARAYANAN S.; HAMASAKI, N. Current concepts of coagulation and fibrinolysis. **Advances in Clinical Chemistry**, n. 33:133-68, 1998.

NARKIEWICZ, K. et al. Ambulatory blood pressure in mild hypertensive women taking oral contraceptives. A case-control study. **American Journal of Hypertension**, v.8, p.249-253, 1995.

NATHAN, L.; CHAUDHURI, G. Antioxidant and prooxidant actions of estrogens: potential physiological and clinical implications. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v.16:309-314, 1998.

NILSSON, K.E.; ANDRÉN, M.; DIAZ DE STÅHL, T.; KLEINAU, S. Enhanced susceptibility to low-dose collagen-induced arthritis in CR1/2-deficient female mice--possible role of estrogen on CR1 expression. **FASEB Journal**, v.23, n.8:2450-8, 2009.

NUSSBERGER, J.; CUGNO, M.; CICARDI, M. Bradykinin-mediated angioedema. **The New England Journal of Medicine**, n. 347:621-2, 2002.

OHKURO, M.; OGURA-MASAKI, M.; KOBAYASHI, K. et al. Effect of iC3b binding to immune complexes upon the phagocytic response of human neutrophils: synergistic functions between FcγR and CR3. **FEBS Letters**, n. 373:189–92, 1995.

OKOH, V.; DEORAJ, A.; ROY, D. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. **Biochemica and Biophysica Acta**, v.1815:115-33, 2011.

PAUL, J. **Cell and tissue culture**. 4 th ed., New York, Edinburg E. & S. Livingstone, 1970.

PRASSAD, R.N.; KOH, S.C., VIEGAS, O.A.; RATNAM, S.S. Effects on haemostasis after two-year use of low dose combined oral contraceptive with gestodene or levonorgestrel. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 5: 60-70, 1999.

RAMOS, J.C.; CASARINI, K.C.; MARTELLI, O.M. et al. **Hemolytic activity of serum complement in women using oral contraceptives**. **Molecular Immunology**, n. 41:299, abstract 214, 2004.

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; ROSSOUW, J.E.; et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. **JAMA**, v.288, n.8:980–987, 2002.

RAPAPORT, S.I. **Introduction to hematology**. 2nd ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1987. cap.23, p.432-69: Hemostatic mechanisms.

RICKLIN D.; HAJISHENGALLIS G.; YANG K.; LAMBRIS J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v.11: 785-97, 2010.

ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes and Infection**, v.5: 1307–1315, 2003.

ROSING, J.; MIDDELDORP, S.; CUVERS, J. et al. Acquired APC resistance and oral contraceptives: a randomized cross-over study of two low dose oral contraceptives. **The Lancet**, n. 354:2036-40, 1999.

ROSING, J.; CUVERS, J.; TANS, G. Oral contraceptives, thrombosis and haemostasis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology Reproductive Biology**, n. 95:193-7, 2001.

RUS, H.; CUDRICI, C.; NICULESCU, F. The role of the complement system in innate immunity. **Immunology Research**, n. 33:103-12, 2005.

SÁNCHEZ-GUERRERO, J.; LIANG, M.H.; KARLSON, E.W. et al. Postmenopausal estrogen therapy and the risk for developing systemic lupus erythematosus. **Annals of Internal Medicine**, n. 122:430-2, 1995.

TANRIVERDI, F. et al. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. **Journal of Endocrinology**, n. 176:293-304, 2003.

TCHAIKOVSKI, S.N.; VAN VLIET, H.A.; THOMASSEN, M.C.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R., SANDSET, P.M.; HELMERHORST, F.M., TANG, G. ROSING, J. Effect of oral contraceptives on thrombosis generation measures via calibrated automated thrombography. **Thombosis and Haemostasis**, v. 98:1350-6, 2007.

THURMAN, J.M.; HOLERS, V.M. The central role of the alternative complement pathway in human disease. **Journal of Immunology**, n. 176:1305-10, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n. 39:44-84, 2007.

VAN GROOTHEEST, K.; VRIELING, T. Thromboembolism associated with the new contraceptive Yasmin. **British Medical Journal**, n. 326:257, 2003.

VAN HYLCKAMA Vlieg, A.; HELMERHORST, F.M.; VANDENBROUCKE, J.P.; et al. The venous thrombotic risk of oral contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. **British Medical Journal**, n.339:b2921, 2009.

VERSTRAETE, M.; VERMYLEN, J. **Trombose**. São Paulo: Sarvier, 1989. cap.1, p.1-45: Determinantes celulares, químicos e reológicos da trombose e fibrinólise.

VIEIRA, C.S.; OLIVEIRA, L.C.O.; SÁ, M.F.S de. Hormônios Femininos e Hemostasia. **RBGO. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, p.538-547, 2007.

VLIEG, A.V.H.; HELMERHORST, F.M.; VANDENBROUCKE, J.P. et al. The venous thrombotic risk of oral contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. **British Medical Journal**, n. 339: 2921, 2009.

WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, n. 344:1058-66, 2001.

WANNMACHER, L. Novas opções contraceptivas. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v.3, n.7, Brasília 2006.

WHO (World health organization). Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. **The Lancet**, n. 346:1575-82, 1995.

WHO (World health organization). Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. **The Lancet**, n. 346: 1582-88, 1995.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Of. CEP 02/2008 - FCFRP/USP
rlq

Ribeirão Preto, 22 de fevereiro de 2008.

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “*Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento e a hemostasia*”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 114, foi analisado na 63ª Sessão Ordinária deste CEP, realizada no dia 22 de fevereiro de 2008 e considerado **aprovado**.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

PROF.ª. DR.ª. LUCIANA SIMON PEREIRA CROTT
Vice-Coordenadora do CEP - FCFRP/USP

Ilmo. Sr.
Prof.ª. Dr.ª. MARIA REGINA TORQUETI TOLOI
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP