

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Camila Marques de Andrade

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Camila Marques de Andrade

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Regina Torqueti

Ribeirão Preto
2009

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

Andrade, Camila Marques.

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

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

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Camila Marques de Andrade

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

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Regina Torqueti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

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

Agradecimentos

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

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

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

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

À Professora Maria Regina Torqueti Tolo pelo apoio e confiança.

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

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

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

Aos meus queridos amigos por me ouvirem.

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

