

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Bruna Pache Moreschi

**ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS E
PLAQUETAS DE USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVOS HORMONAIIS ORAIS
COMBINADOS**

Campo Grande, MS

2024

Bruna Pache Moreschi

ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS E
PLAQUETAS DE USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVOS HORMONAIS ORAIS
COMBINADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FACFAN UFMS), como requisito para a obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto Otsubo Jaques

Campo Grande, MS

2024

Sou grata por todas as vezes em que tive coragem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Izabel Cristina, e ao meu pai Waldeir, por todo o apoio à construção da minha educação.

Agradeço à minha irmã Brenda, e ao meu companheiro Daniel, por todo apoio e companheirismo em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Jeandre Jaques, por todo tempo, amparo e atenção destinados ao meu crescimento como pesquisadora.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, Andreza, Igor, Romário, Matheus, Eduarda e Jade, pelo apoio na execução do projeto.

Agradeço às componentes da banca avaliadora deste trabalho, Prof^a Dr^a Inês Tozetti e Prof^a Dr^a Daniela Leal, pela dedicação às contribuições a este.

Agradeço às minhas amigas companheiras de graduação Tainá, Yasmin, Wilma e Dinah. Também, agradeço aos meus amigos Nelson, Jorge e Anderson, pela companhia nos melhores e piores momentos e por toda a contribuição ao meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a todas as mulheres que participaram deste estudo, pelo interesse, disposição e gentileza.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ao Instituto de Biociências, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Laboratório de Bioquímica e Microrganismos, por proporcionarem a estrutura para minha formação como bióloga e mestra em ciências farmacêuticas.

Agradeço à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de estudos que possibilitou a execução do curso de mestrado.

Ainda, a todos os professores e professoras envolvidos com meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada.

RESUMO

ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVOS HORMONAIS ORAIS COMBINADOS

AUTORA: BRUNA PACHE MORESCHI

ORIENTADOR: PROF. DR. JEANDRE AUGUSTO OTSUBO JAQUES

O uso de hormônios sexuais femininos sintéticos com o objetivo de inibir a ovulação teve início em 1950, logo, este se tornou um dos métodos contraceptivos com maior adesão. Diante das evidências de interferência desses hormônios nos parâmetros hemostáticos das usuárias, o uso de contraceptivos hormonais está associado ao desenvolvimento de tromboembolismo. Sabe-se que a adenosina e seus nucleotídeos desempenham um papel proeminente na regulação da agregação plaquetária e ativação linfocitária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico E-NTPDase, E-5'-NT e E-ADA em linfócitos e plaquetas de usuárias de anticoncepcionais orais combinados. Participaram da pesquisa 29 mulheres entre 18 e 40 anos usuárias de anticoncepcionais combinados e 29 não usuárias de contraceptivos hormonais para compor o grupo controle. As participantes faziam uso de anticoncepcionais orais combinados de terceira geração, como drospirenona ou acetato de ciproterona, ou anticoncepcionais de quarta geração, incluindo gestodeno ou desogestrel, ambos associados ao etinilestradiol. Foram coletados 8 ml de sangue periférico, dos quais foram isolados linfócitos e plaquetas. A atividade das ectonucleotidases foi quantificada através da liberação de fosfato inorgânico, enquanto a atividade da E-ADA foi quantificada através da liberação de amônia. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste post hoc de Dunn. Nossos resultados indicam redução da desaminação de adenosina em linfócitos de G3 (66,5%; n = 8; p < 0,01) e diminuição da hidrólise de AMP (69%; n = 8; p < 0,05) e desaminação de adenosina (65%; n = 8, p < 0,01) nas plaquetas do G3, em comparação ao controle. Observamos também aumento da hidrólise de ADP (216%; n = 15; p < 0,01) e diminuição da desaminação de adenosina (50,7%; n = 9; p < 0,05) em linfócitos, e diminuição da hidrólise de ATP (34%; n = 10 ; p < 0,01) e desaminação de adenosina (63%; n = 8, p < 0,01) nas plaquetas de G4, em comparação ao controle. Uma hidrólise reduzida do AMP contribui para o estabelecimento de um microambiente vascular pobre em adenosina. Somado à redução da atividade da E-ADA, que também pode estar associada a uma menor concentração de adenosina neste microambiente, contribuem para a diminuição do seu efeito antiagregante e anti-inflamatório. Os resultados obtidos neste projeto corroboram a literatura, relacionando o uso de anticoncepcionais combinados com maior predisposição ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e circulatórias.

Palavras-chave: E-NTPDase; E-5'-NT; E-ADA; Anticoncepcionais orais; Agregação plaquetária; Sinalização purinérgica.

ABSTRACT

ACTIVITY OF ENZYMES OF THE PURINERGIC SYSTEM IN LYMPHOCYTES AND PLATELETS OF USERS OF COMBINED ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVES

AUTHOR: BRUNA PACHE MORESCHI

SUPERVISOR: PROF. DR. JEANDRE AUGUSTO OTSUBO JAQUES

The use of synthetic female sex hormones with the aim of inhibiting ovulation began in the 1950s, therefore, this became one of the contraceptive methods with the greatest adherence. In view of the evidence of interference of these hormones in user's hemostatic parameters, the use of hormonal contraceptives is associated with the development of thromboembolism. It is known that adenosine and its nucleotides play a prominent role in regulating platelet and lymphocyte aggregation. The objective was to evaluate the activity of the purinergic system enzymes E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA in lymphocytes and platelets of users of combined oral contraceptives. 29 women between 18 and 40 years old, users of combined contraceptives participated in the research and 29 non-users of hormonal contraception to form the control group. Participants used third-generation combined oral contraceptives, such as drospirenone or cyproterone acetate, or fourth-generation contraceptives, including gestodene or desogestrel, both associated with ethinyl estradiol. 8 mL of peripheral blood was collected, from which lymphocytes and platelets were isolated. The activity of the ectonucleotidases was quantified through the release of inorganic phosphate, while the activity of E-ADA was quantified through the release of ammonia. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Our findings indicate decreased adenosine deamination in lymphocytes from G3 (66,5%; $n = 8$; $p < 0.01$), and decreased AMP hydrolysis (69%; $n = 8$; $p < 0.05$) and adenosine deamination (65%; $n = 8$, $p < 0.01$) in platelets from G3, compared to control. We also observed increased ADP hydrolysis (216%; $n = 15$; $p < 0.01$) and decreased adenosine deamination (50,7%; $n = 9$; $p < 0.05$) in lymphocytes, and decreased ATP hydrolysis (34%; $n = 10$; $p < 0.01$) and adenosine deamination (63%; $n = 8$, $p < 0.01$) in platelets from G4, compared to control. Decreased AMP hydrolysis contributes to the establishment of an Ado-poor vascular microenvironment. Added to the decrease in E-ADA activity, which may also be associated with a lower concentration of Ado in this microenvironment, it may contribute to the decrease in its anti-aggregation and anti-inflammatory effect. The results obtained in this project corroborate the literature, linking the use of combined contraceptives with a greater predisposition to the development of cardiovascular and circulatory diseases.

Keywords: E-NTPDase; E-5'-NT; E-ADA; Oral contraceptives; Platelet aggregation; Purinergic signaling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

2 REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Principais famílias de enzimas e receptores do sistema purinérgico 26
- Figura 2.** Representação esquemática da sinalização purinérgica linfocitária 39
- Figura 3.** Representação esquemática da sinalização purinérgica plaquetária 43

CAPÍTULO II

MANUSCRITO I

- Figure 1.** Coagulation cascade and regulation by anticoagulant and fibrinolytic factors 75

CAPÍTULO III

MANUSCRITO II

- Figure 1.** E-NTPDase activity in lymphocytes of oral contraceptive users 93
- Figure 2.** E-ADA activity in lymphocytes of oral contraceptive users 94
- Figure 3.** E-NTPDase activity in platelets from oral contraceptive users 95
- Figure 4.** E-5'-NT activity in platelets of oral contraceptive users 96
- Figure 5.** E-ADA activity in platelets of oral contraceptive users 97

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Principais famílias de enzimas do sistema purinérgico, localização, isoformas, substratos e produtos	28
Quadro 2. Receptores purinérgicos acoplados à proteína G, ligante e resposta respectiva	32
Quadro 3. Células participantes da imunidade inata, origem, função e receptores purinérgicos expressos	34
Quadro 4. Linhagens de linfócitos, local de maturação e função	35

CAPÍTULO II

MANUSCRITO I

Table 1. Relationship between progestogen and estrogenic contraceptives and their effects on hemostatic coagulation, anticoagulant and fibrinolytic cascades	67
---	----

CAPÍTULO III

MANUSCRITO II

Table 1. Sociodemographic data of participants belonging to groups G3, G4 and control group	97
--	----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

17 β -E2	17 β -estradiol
AC	Adenilil-ciclase
ADA	Adenosina desaminase
ADAcP	Adenosina desaminase complexo proteico
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
ALP	Fosfatase alcalina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
APC	Proteína C ativada
ATP	Adenosina trifosfato
BCR	Receptor de linfócito B
Ca	Íon cálcio
dADO	2'-desoxiadensina
DAG	Diacilglicerol
dINO	Desoxiinosina
dTMP3'	Timina 5'-monofosfato
dTMP5'	Timina 5'-monofosfato
dUMP5'	Desoxiuridina 5'-monofosfato
E-5'-NT	Ecto-5' nucleotidase
E-ADA	Ecto-adenosina desaminase
E-NTPDase	Ecto-nucleotídeo trifosfato difosfatase
E2V	Estradiol valerato
E4	Esterol sintético
EE	Etinilestradiol
GPCR	Receptor acoplado à proteína G

GPI Glicofosfatidilinositol
HLA Antígeno leucocitário humano
INO Inosina
IP Inositol fosfato
IPR Receptor de inositol fosfato
K Íon potássio
Mg Íon magnésio
Na Íon sódio
NDP Nucleotídeo difosfato
NH Amônia
NMP Nucleotídeo monofosfato
NTP Nucleotídeo trifosfato
PC Proteína C
PDF Produto de degradação de fibrina
Pi Fosfato inorgânico
PIP Fosfoinositol-piruvato
PLC Fosfolipase C
PS Proteína S
t-PA Ativador tecidual do plasminogênio
TCR Receptor de linfócito T
TEV Tromboembolismo venoso
TFPI Fator tecidual
T Linfócito T regulador
TVC Trombose venosa cerebral
UMP3 Uridina 3'-monofosfato
Zn Íon zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. Introdução	15
2. Revisão bibliográfica	17
2.1 Contraceptivos hormonais	17
2.1.1 Contraceptivos orais	17
2.1.2 Contraceptivos orais e sistema hemostático	19
2.2 Condições tromboembólicas	20
2.3 Contraceptivos orais e condições tromboembólicas	22
2.4 Sistema purinérgico	24
2.4.1 Enzimas	27
2.4.1.1 NTPDase	29
2.4.1.2 5'-NT	29
2.4.1.3 ADA	30
2.4.2 Receptores	31
2.5 Sistema imune e sinalização purinérgica	33
2.5.1 Linfócitos	36
2.5.2 Sinalização purinérgica linfocitária	37
2.6 Plaquetas	40
2.6.1 Sinalização purinérgica plaquetária	40
3. Objetivos	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO II

Manuscrito I	53
ABSTRACT	54
1. INTRODUCTION	55
2. HEMOSTATIC SYSTEM	58
2.1. Oral hormonal contraceptives and the hemostatic system	58
2.2. Thromboembolic conditions	58
3. ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVES AND THROMBOEMBOLIC EVENTS	62
3.1. Conventional progestogens associated with thromboembolic conditions	62
3.2 Conventional estrogens associated with thromboembolic conditions	63
3.3 New formulations	65
3.4 Factors associated with the development of VTE and oral hormonal contraceptives .	66
4. CONCLUSIONS	68
REFERENCES	69
FIGURE	75

CAPÍTULO III

Manuscrito II	76
Abstract	77
Introduction	78
Methods	79
Results	83
Discussion	84
Conclusions	86
REFERENCES	88

FIGURE CAPTIONS	92
FIGURES	93
APÊNDICE I - Comprovante de submissão de artigo I	98
APÊNDICE II - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos UFMS .	99

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de manuscritos. O texto se inicia com uma ampla revisão de literatura, no Capítulo I, a respeito dos temas abordados na construção dos manuscritos I e II.

O Capítulo II se refere à construção de uma revisão de literatura narrativa, Manuscrito I, submetido à revista *Fundamental & Clinical Pharmacology* e adequada às normas da revista. Ainda, neste capítulo encontram-se as referências da íntegra do manuscrito e também o Apêndice I, referente ao comprovante de submissão do Manuscrito I.

O Capítulo III se refere ao artigo experimental executado durante o curso do mestrado, Manuscrito II, que será submetido à revista *Purinergic Signalling* e adequado às normas da revista. Ainda, neste capítulo encontram-se as referências da íntegra do manuscrito e também o Apêndice II, referente ao parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

CAPÍTULO I

1. Introdução

O contraceptivo oral combinado é um dos métodos contraceptivos de maior adesão no Brasil (GUPTA; PRABHAKAR; WAIRKAR, 2022). Esses medicamentos são compostos pela associação de um componente estrogênico, normalmente o etinilestradiol (EE), e por um componente progestágeno (GOLOBOF; KILEY, 2016) e, de acordo com o progestágeno, os contraceptivos orais combinados são classificados por gerações (PLU-BUREAU et al., 2013). Desde a sua popularização, contraceptivos orais combinados são associados a condições adversas dos sistemas cardiovascular e circulatório, principalmente com eventos tromboembólicos (DOUXFILS et al., 2020).

Dentre os mecanismos de interferência dos contraceptivos combinados na hemostasia estão o aumento dos níveis circulantes de fatores de coagulação, como do fator VII (KLUFT; LANSINK, 1997); a redução de fatores anticoagulantes, como desenvolvimento de resistência à proteína C (PC) (TCHAIKOVSKI et al., 2007) e interferência no sistema fibrinolítico (DOUXFILS et al., 2020).

Há divergências sobre qual seria o componente dos contraceptivos orais combinados responsável pela interferência nos parâmetros hemostáticos. Desde a popularização desse método contraceptivo, acredita-se que o estrogênio seja o principal responsável pelos efeitos observados na hemostasia (BELICOVÁ et al., 2003). Na literatura, encontram-se evidências de que contraceptivos orais combinados com progestágenos de terceira geração, como desogestrel e gestodeno, estão mais relacionados a ocorrências de condições adversas do sistema circulatório (MARTÍNEZ et al., 2012).

A manutenção da hemostasia depende de inúmeros componentes bioquímicos. Dentre eles, com especial interesse para este estudo, o sistema purinérgico. Esse sistema é composto por nucleotídeos e nucleosídeos purínicos e pirimidínicos, que sensibilizam receptores purinérgicos de membrana celular. Essas moléculas têm sua concentração extracelular controlada por diferentes enzimas. Nesse trabalho, destaca-se a atividade da enzima E-NTPDase, responsável pela hidrólise de ATP em ADP e ADP em AMP; da E-5'-NT, responsável pela hidrólise de ADP em AMP; e da E-ADA, responsável pela desaminação irreversível da adenosina (CARDOSO et al., 2021).

Os receptores purinérgicos são expressos na superfície de diversas células, tais como linfócitos e plaquetas (CEKIC; LINDEN, 2016). Os receptores P1, sensibilizados por

adenosina, desencadeiam respostas anti-agregantes e anti-inflamatórias, enquanto que os receptores P2X e P2Y, sensibilizados por moléculas como ATP e ADP, desencadeiam em sua maioria eventos pró-agregantes e pró-inflamatórios, desencadeados comumente pela mobilização de cálcio intracelular (FUENTES; PALOMO, 2015).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Contraceptivos hormonais orais

A síntese de hormônios sexuais femininos com o objetivo de inibir a ovocitação em mulheres se iniciou na década de 1950 e, em 1960, houve a aprovação da primeira pílula contraceptiva comercializada nos Estados Unidos, fazendo com que em 1970 o produto já estivesse popularizado. As primeiras fórmulas de contraceptivos hormonais tinham dosagens muito altas, que por consequência causavam sérios efeitos adversos como aumento da pressão arterial e trombose venosa. Esse fato levou a uma reformulação desses medicamentos, que na década de 1980 passaram a ter doses menores de hormônios, assim reduzindo seus efeitos adversos mais sérios (DHONT, 2010).

O contraceptivo hormonal é um dos métodos contraceptivos com maior adesão no Brasil, tanto por conta de sua praticidade de uso, quanto pela eficácia e segurança (GUPTA; PRABHAKAR; WAIRKAR, 2022). A contracepção hormonal ainda é usada como uma forma de tratar desequilíbrios hormonais tais como problemas dermatológicos (acne), em casos de cólicas (GUPTA; PRABHAKAR; WAIRKAR, 2022) e no tratamento da síndrome de ovário policístico (AL KHALIFAH et al., 2021; VRBÍKOVÁ; CIBULA, 2005).

Métodos contraceptivos são categorizados por diferentes mecanismos para evitar a ovocitação, fertilização ou a implantação do embrião na mucosa uterina (RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999). Há uma grande variação na composição e na via de administração entre os contraceptivos hormonais, além de diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Além disso, a possibilidade de trocas frequentes entre estes métodos contraceptivos desperta a curiosidade da comunidade científica a respeito das possíveis consequências no organismo das usuárias (ACHILLES et al., 2020).

2.1.1 Contraceptivos orais

De forma geral, há dois tipos de contraceptivos orais: os não combinados, compostos apenas por progestágenos (minipílulas); e os combinados, que têm formulações variadas associando estrogênio a progestágenos. Neste caso, o componente progestágeno tem a função principal de impedir a ovocitação, enquanto o estrogênio tem função principal de regularizar o ciclo menstrual por conta da estabilização da dose hormonal (GOLOBOF; KILEY, 2016).

As pílulas contraceptivas ainda são classificadas por gerações, de forma correspondente com o componente progestágeno e a dose do componente estrogênico. São consideradas de primeira geração as pílulas que contêm uma alta dose de estrogênio (maior ou igual a 50 µg), geralmente o etinilestradiol (CREININ; JENSEN, 2020) ou mestranol, e noretinodrel, noretindrona ou diacetato de etinodiol como progestágeno (GOLOBOF; KILEY, 2016). As pílulas de segunda geração apresentam uma redução na dose do componente estrogênico comparadas à primeira geração (de 50 a 35 µg) (CREININ; JENSEN, 2020; GOLOBOF; KILEY, 2016) e, nestas, ocorre o estabelecimento do etinilestradiol como principal componente estrogênico, juntamente com levonorgestrel ou noretisterona como componentes progestágenos. As pílulas de terceira geração contêm gestodeno, desogestrel (GOLOBOF; KILEY, 2016) ou norgestimato (CREININ; JENSEN, 2020) como componente progestágeno, podendo ou não estar associado ao etinilestradiol. Por fim, existem pílulas mais modernas que contêm como componente progestágeno a drospirenona, acetato de nomegestrol, acetato de ciproterona ou dienogest, associado ou não a um estrogênio (GOLOBOF; KILEY, 2016). Contudo, ainda há divergências quanto a existência de uma quarta geração, derivadas de testosterona que apresentam um efeito antiandrogênico maior comparadas a outros progestágenos (PLU-BUREAU et al., 2013). Com o objetivo de contracepção, a dose hormonal necessária para impedir a ovocitação é constante, porém, os progestágenos sofreram mudanças apenas de composição química, assim caracterizando diferentes tipos (GOLOBOF; KILEY, 2016).

Parte da adesão dos contraceptivos orais combinados no Brasil se dá por uma ampla distribuição pelo Sistema Único de Saúde (SUS), onde a maioria contém etinilestradiol associado à progestágenos como norgestrel e levonorgestrel de segunda geração, e desogestrel e gestodeno de terceira geração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os contraceptivos hormonais orais combinados contendo dois hormônios sintéticos atuam de forma semelhante aos hormônios naturalmente produzidos pelos ovários (RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999). Esse método é considerado eficaz, com taxa de falha em até 0,3% dos casos. Porém, pode chegar a 9% de falha em uso contínuo habitual (DRAGOMAN, 2014; TRUSSELL, 2011). Contudo, a efetividade do método depende de seu uso correto e pode ter sua ação interrompida por interação medicamentosa em virtude do uso de outros fármacos, tais como alguns antibióticos, e em virtude de condições como vômitos e diarreia (DHONT, 2010).

O sistema endócrino é responsável pelo controle de diversas funções biológicas. Em se tratando de hormônios presentes nos contraceptivos, os efeitos almejados ou adversos dependem da composição da fórmula e da dose. No que diz respeito ao estrogênio, sua dose excessiva pode causar dismenorrea, alto fluxo menstrual, sensibilidade mamária, aumento das mamas, aumento de peso, náuseas e vômitos, supressão da lactação, dores de cabeça, cloasma, irritabilidade e redução da libido, enquanto seu déficit pode causar a redução do fluxo menstrual e *spotting*¹. Já o progestágeno em altas doses pode causar efeitos na pele, tais como acne ou excessiva produção de óleo pelas glândulas sebáceas, irritabilidade, menstruação de curta duração, nervosismo e icterícia colestática². O déficit de progestágeno, por sua vez, pode resultar em hemorragia prolongada, *spotting*, fluxo menstrual elevado, dismenorrea e atraso no início do ciclo menstrual (SHOUPE; MISHEL JR, 2006).

É possível encontrar na literatura um volume substancial de pesquisas que demonstram a relação entre o uso de contraceptivos hormonais orais e doenças tromboembólicas (ACHILLES et al., 2020; DOUXFILS et al., 2020; FRUZZETTI; CAGNACCI, 2018; KLUFT et al., 2017; ROCHA; VIEIRA; DOMINATO, 2021).

2.1.2 Contraceptivos orais e sistema hemostático

A hemostasia é um conjunto de mecanismos responsáveis pela manutenção do fluxo sanguíneo no interior dos vasos, evitando eventos trombóticos e hemorrágicos (REZENDE, 2010). O sistema circulatório é responsável pelo transporte e distribuição das moléculas e nutrientes pelo organismo e seu funcionamento é dependente de vários mecanismos responsáveis pela manutenção do sangue, em seu estado fluido, dentro da rede de vasos sanguíneos que formam o sistema cardiovascular. O sistema hemostático é formado pelas plaquetas, vasos sanguíneos, fatores de coagulação, anticoagulantes e o sistema fibrinolítico (VIEIRA; OLIVEIRA; SÁ, 2007). Em caso de lesão nos vasos, a prevenção e estancamento de sangramentos é feita por meio de adesão e recrutamento de plaquetas, que promovem a formação do tampão hemostático temporário, que posteriormente é reforçado pela ação da fibrina, promovendo a coagulação (SALLES et al., 2008).

Para que a hemostasia seja estabelecida, é importante a integridade dos vasos sanguíneos, promovida pela presença de proteínas plasmáticas pró-coagulantes,

¹ Sangramento de escape que ocorre fora da época do fluxo menstrual normal.

² Pele e mucosas com coloração amarelada, causada por excesso de bilirrubina.

anticoagulantes e do sistema fibrinolítico, e ainda que as plaquetas estejam em número ideal e funcionais (LIMA et al., 2017). Faz parte da hemostasia uma agregação plaquetária eficiente em resposta ao dano vascular, sendo que enquanto a coagulação promove a interrupção da perda sanguínea, a fibrinólise remove a fibrina formada em excesso, fazendo com que o sangue volte a fluir no vaso, em equilíbrio dinâmico (CAGNOLATI et al., 2007).

A relação entre contraceptivos orais e o sistema cardiovascular é muito discutida por conta da expressão de receptores de estrogênio e progesterona nas células endoteliais (BRITO; NOBRE; VIEIRA, 2011; MORIARTY; KIM; BENDER, 2006; RIBEIRO et al., 2018), o que facilita a absorção destes hormônios e, conseqüentemente, o risco de condições patogênicas, comprometendo o funcionamento do sistema circulatório (BRITO; NOBRE; VIEIRA, 2011).

2.2 Condições tromboembólicas

Um dos principais efeitos adversos do uso de contraceptivos hormonais é o desenvolvimento de condições tromboembólicas, decorrente do desequilíbrio hemostático proveniente do efeito dos hormônios sintéticos na hemostasia, principalmente, da criação de um microambiente pró-coagulante. A coagulação é um importante mecanismo do organismo para manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. É realizada por um grupo de proteínas plasmáticas (fatores de coagulação) que, em reação cascata, convertem moléculas de fibrinogênio plasmático em fibrina, formando assim um trombo. A cascata de coagulação pode ocorrer pela via intrínseca, iniciada por elementos já presentes no sangue, e a via extrínseca, que se inicia por conta de uma lesão tecidual (MELO et al., 2006).

A cascata de coagulação por via intrínseca ocorre quando não há uma lesão endotelial. Ocorre contato entre o colágeno presente no tecido conjuntivo da camada subendotelial da parede do vaso com os fatores de coagulação presentes no plasma. Já a cascata de coagulação por via extrínseca se dá quando ocorre extravasamento sanguíneo em virtude da lesão endotelial e também a ativação do fator tecidual, presente nos tecidos extravasculares. Ocorre a interseção entre as vias, iniciando assim a via comum, com uma sequência de ativações de fatores de coagulação em cascata na presença de Ca^{2+} , gerando fibrina que adere às plaquetas ativadas, também ativando mais plaquetas (FRANCO, 2001; GUERRA; ROSENFELD, 2002; MELO et al., 2006).

Após a agregação, as plaquetas liberam grânulos com fatores ativos que promovem viscosidade, aderindo-se ao colágeno dos tecidos (GUYTON A. C., 2011), também secretam

outros produtos pró-agregantes, como ATP e ADP, que interagem com outras plaquetas no plasma, aumentando assim o agregado plaquetário. Dessa forma, o agregado plaquetário com a fibrina integrada formam um tampão hemostático sólido, que impede o extravasamento sanguíneo (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A condição trombótica consiste na formação de um trombo por conta do processo de coagulação exacerbado, no interior dos vasos sanguíneos, que acaba por causar a oclusão total ou parcial de um vaso. Essa condição pode causar inchaço, dor e rigidez da musculatura, além da elevação da temperatura local. Pode acontecer em todo o organismo, contudo são mais comuns em membros inferiores (BARUZZI et al., 1996; SOUSA; ÁLVARES, 2018; VEIGA et al., 2013). A condição de trombose venosa profunda (TVP) ocorre quando os trombos formados no sistema circulatório atingem o sistema venoso profundo (PADOVAN; FREITAS, 2015). A TVP associada à embolia pulmonar denomina-se tromboembolismo venoso (TEV), que se dá quando ocorre o desprendimento do trombo no vaso sanguíneo, que circula pelo organismo até se alojar no pulmão (BELICOVÁ et al., 2003). Trombose pode ocorrer também nas veias cerebrais, caracterizando trombose venosa cerebral (TVC) (CALLAI et al., 2017). A trombose no cérebro é uma condição rara, intensificada pelo prejuízo da drenagem venosa cerebral por conta da pressão intracraniana, podendo muitas vezes causar consequências fatais (ROCHA; VIEIRA; DOMINATO, 2021).

Ainda, a coagulação é regulada por uma série de fatores anticoagulantes, como o fator tecidual (TFPI), antitrombina, PC e proteína S (PS) (GUERRA; ROSENFELD, 2002; MELO et al., 2006), que agem em diferentes pontos da cascata para impedir um possível estado pró-coagulante no microambiente vascular. O desenvolvimento de coágulos pode ocorrer de forma assintomática e temporária (BELICOVÁ et al., 2003) em períodos transitórios, como hospitalizações e pós-operatórios ou fatores de risco como idade, tabagismo e obesidade (BRAGA; VIEIRA, 2013; CALLAI et al., 2017). Também, existe um sistema fibrinolítico com proteínas que degradam a fibrina já integrada, formando produtos de degradação de fibrina (PDF), como o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), α 1-antiplasmina e α 2-macroglobulina (LIMA et al., 2017).

Doenças do sistema circulatório estão associadas ao uso de contraceptivos hormonais orais. Na literatura consta que o uso de contraceptivos orais combinados pode aumentar em até 4 vezes o risco do desenvolvimento de trombose. Contudo, a estimativa ainda é de que 7 a cada 10.000 mulheres por ano desenvolvem a condição em decorrência do uso de contraceptivos hormonais (HEIT et al., 2004; SITRUK-WARE, 2016).

2.3 Contraceptivos orais e condições tromboembólicas

Os progestágenos são relatados como um componente para equilibrar os efeitos trombóticos promovidos pelo estrogênio, principalmente em relação à síntese de proteínas hepáticas, ou na inibição da proteína C ativada (APC) causada pelo estrogênio (MARTÍNEZ et al., 2012; ROSING; TANS, 1999). Os efeitos causados pelo etinilestradiol na hemostasia podem ser atenuados ou acentuados pelo progestágeno da composição. Em virtude disto, diferentes formulações de contraceptivos combinados podem ter diferentes efeitos, favorecendo a atividade coagulante ou fibrinolítica, de diferentes formas (KUHL, 1996). Também, um dos mecanismos relacionados ao aumento do risco de TEV está ligado ao desenvolvimento de resistência à APC (TCHAIKOVSKI et al., 2007), além da redução dos níveis de atividade da PS (DOUXFILS et al., 2020). A redução da sensibilidade plasmática à APC é uma tendência em decorrência do uso de contraceptivos hormonais combinados. A APC na presença do cofator PS, impede a cascata de coagulação inibindo os fatores coagulantes V e VIII de forma que o efeito da trombina é regulado negativamente (DIELIS et al., 2008; MOHAMED et al., 2018).

Também há evidências de que os contraceptivos orais induzem aumento do plasminogênio, do t-PA, além de complexos plasmina-antiplasmina e de produtos de degradação da fibrina, com efeito antitrombótico, embora isto não esteja associado à atividade de fibrinólise (DOUXFILS et al., 2020; KLUFT; LANSINK, 1997). Também é confirmado que contraceptivos que levam como progestágeno levonorgestrel (segunda geração) ou o desogestrel (terceira geração) aumentam os níveis do fragmento de protrombina 1+2, um marcador de formação de trombina (DOUXFILS et al., 2020; MIDDELDORP, 2013; WIEGRATZ; KUHL, 2006).

Na presença de etinilestradiol, progestágenos de terceira geração são menos eficazes na neutralização do efeito pró-trombótico (KEMMEREN et al., 2002). Embora o fator VII não tenha uma relação elucidada com a condição de TEV, é um marcador para o infarto agudo do miocárdio (KOSTER et al., 1994). O efeito das diferentes gerações de progestágenos no nível do fator VII pode estar relacionado com a coagulação pela via extrínseca, evidenciando um maior risco de desenvolvimento de TEV (KEMMEREN et al., 2002). Os progestágenos de terceira geração, quando comparados com os de segunda geração, possuem um efeito mais pronunciado na redução do fator V. Este fator possui propriedades anticoagulantes, pois é

cofator da PC ativada que atua na inativação do fator VIIIa (KEMMEREN et al., 2002; MIDDELDORP, 2013).

Os progestágenos orais de terceira geração gestodeno e desogestrel possuem maior risco associado ao desenvolvimento de TEV quando comparados com o levonorgestrel (MARTÍNEZ et al., 2012). Em virtude disto, considera-se contraceptivos combinados contendo levonorgestrel, um progestágeno de segunda geração, mais indicado para usuárias com fatores de risco e histórico de doenças tromboembólicas (BLONDON, 2020).

Desde os primeiros contraceptivos orais, o estrogênio foi considerado o principal fator responsável pelos eventos tromboembólicos (BELICOVÁ et al., 2003). A associação da trombose com o uso de contraceptivos está ligada principalmente ao uso do etinilestradiol, um estrógeno que tem efeito positivo em uma série de fatores pró-coagulantes tais como a trombina; os fatores VII, VIII, X, XI, XII e XIII; e o fibrinogênio. Ainda, o etinilestradiol pode diminuir os fatores anticoagulantes PS e antitrombina, o que causa um efeito pró-trombótico ainda maior (DOUXFILS et al., 2020).

Também já foi descrita a atuação do etinilestradiol na redução dos inibidores naturais da coagulação. O etinilestradiol prejudica a ativação da PC, o que causa resistência adquirida à APC. Em contraponto, há evidências de que os contraceptivos podem causar um ligeiro aumento na atividade e concentração da PC. Contudo, este aumento é suprimido pela indução de atividade dos inibidores α 1-antitripsina e α 2-macroglobulina, juntamente com o decréscimo do cofator PS (DOUXFILS et al., 2020; HORNE et al., 1971; KHIALANI; ROSENDAAL; VLIEG, 2020; TCHAIKOVSKI et al., 2007). A PS possui atividade anticoagulante dependente da vitamina K, sendo inibida pelos fatores de coagulação Va, VIIa e Va, e funcionando como cofator da PC (CASTOLDI; HACKENG, 2008). A antitrombina, inibidor primário da trombina e fatores IIa, IXa, Xa, XIa e XIIa, impede a associação do fator VIIa com o fator tecidual, e tem seus níveis diminuídos pelos contraceptivos (MAZHAR et al., 2021).

O etinilestradiol ainda pode aumentar a atividade fibrinolítica do plasma sanguíneo. Há evidências de que o etinilestradiol induz aumento do plasminogênio, também do ativador tecidual do plasminogênio, além de complexos plasmina-antiplasmina e de produtos de degradação da fibrina, com efeito antitrombótico, embora isto não esteja associado a atividade de fibrinólise (KHIALANI; ROSENDAAL; VLIEG, 2020; KLUFT; LANSINK, 1997; TCHAIKOVSKI et al., 2007). Todos os efeitos pró-coagulantes associados ao etinilestradiol podem estar associados ao forte efeito estrogênico causado pelo mesmo na função hepática e

endotélio-vascular, podendo esta ser a base do risco aumentado de desenvolvimento de condições tromboembólicas associadas a este estrogênio (KLUFT et al., 2017).

A ação pró-coagulante do etinilestradiol motivou pesquisas para o desenvolvimento de novos estrogênios sintéticos, sendo assim desenvolvidos o estradiol valerato (E2V) e o 17- β estradiol (17 β -E2), usando estradiol (estrogênio natural) na sua composição no lugar do etinilestradiol (ÅGREN et al., 2011; GAUSSEM et al., 2011). Há estudos que sugerem que essas formulações carregam o mesmo risco ao desenvolvimento de TEV que o etinilestradiol, causando alterações nos mesmos parâmetros hemostáticos observados pelo estrogênio tradicional (DINGER; DO MINH; HEINEMANN, 2016; KHALANI; ROSENDAAL; VLIEG, 2020; RAPS et al., 2013).

Outro estrogênio desenvolvido recentemente é o esteroide sintético (E4), que apresenta efeitos reduzidos nos padrões de hemostasia (KLUFT et al., 2017). Embora existam evidências de sua relação com o aumento do plasminogênio e fragmento 1 + 2 da protrombina (DOUXFILS et al., 2020), ele ainda representa um impacto muito fraco nos marcadores de fibrinólise. A mínima interferência desse estrogênio na maioria dos parâmetros hemostáticos está relacionada principalmente a sua menor ação no fígado, onde ocorre a síntese dos fatores de coagulação e anticoagulantes (ABOT et al., 2014; DOUXFILS et al., 2020).

2.4 Sistema purinérgico

A causa principal do desenvolvimento de condições tromboembólicas associadas ao uso de contraceptivos hormonais é a mudança nos parâmetros hemostáticos. Sabe-se da importância da hemostasia para a estabilidade dos vasos sanguíneos, que realiza a manutenção de algumas funções fundamentais para o funcionamento do organismo (LIMA et al., 2017). O sangue é constituído por duas partes, sendo o plasma (parte líquida, constituída por diversas proteínas) e glóbulos sanguíneos (células suspensas). A população de glóbulos do sangue é formada por plaquetas, eritrócitos e diferentes tipos de leucócitos. A função linfocitária é fornecer a primeira linha de defesa do organismo contra corpos invasores e extravasamento sanguíneo, por meio dos leucócitos que atravessam a parede de capilares e vasos sanguíneos por diapedese para se concentrarem em tecidos atacados ou lesionados (VIEIRA; OLIVEIRA; SÁ, 2007).

O recrutamento plaquetário, além da divisão e ativação de leucócitos, é dependente de moléculas purinérgicas como ATP, ADP, AMP e adenosina, responsáveis pela manutenção de diversas outras funções celulares. O ATP, um nucleotídeo derivado de uma base nitrogenada

púrica, é encontrado em todos os sistemas e órgãos de animais, responsável pela manutenção de mecanismos tanto no meio intracelular quanto extracelular. No meio extracelular, portanto, o ATP exerce um importante papel como molécula sinalizadora do sistema purinérgico (YEGUTKIN, 2008). Essa sinalização, denominada sinalização purinérgica (Figura 1), é composta por nucleosídeos e nucleotídeos (atuam como mediadores extracelulares), diferentes receptores são ativados por estes mediadores, e também ectoenzimas responsáveis por regular os níveis extracelulares das moléculas mediadoras (YEGUTKIN, 2008). A hidrólise de nucleotídeos no meio extracelular é importante para a manutenção de sua concentração ideal, de acordo com a condição do microambiente respectivo. A sensibilização de receptores é dependente da concentração de moléculas mediadoras presentes no meio extracelular, desencadeando as respectivas cascatas, visando o estabelecimento da homeostasia ou de alguma condição patogênica (BURNSTOCK, 2018).

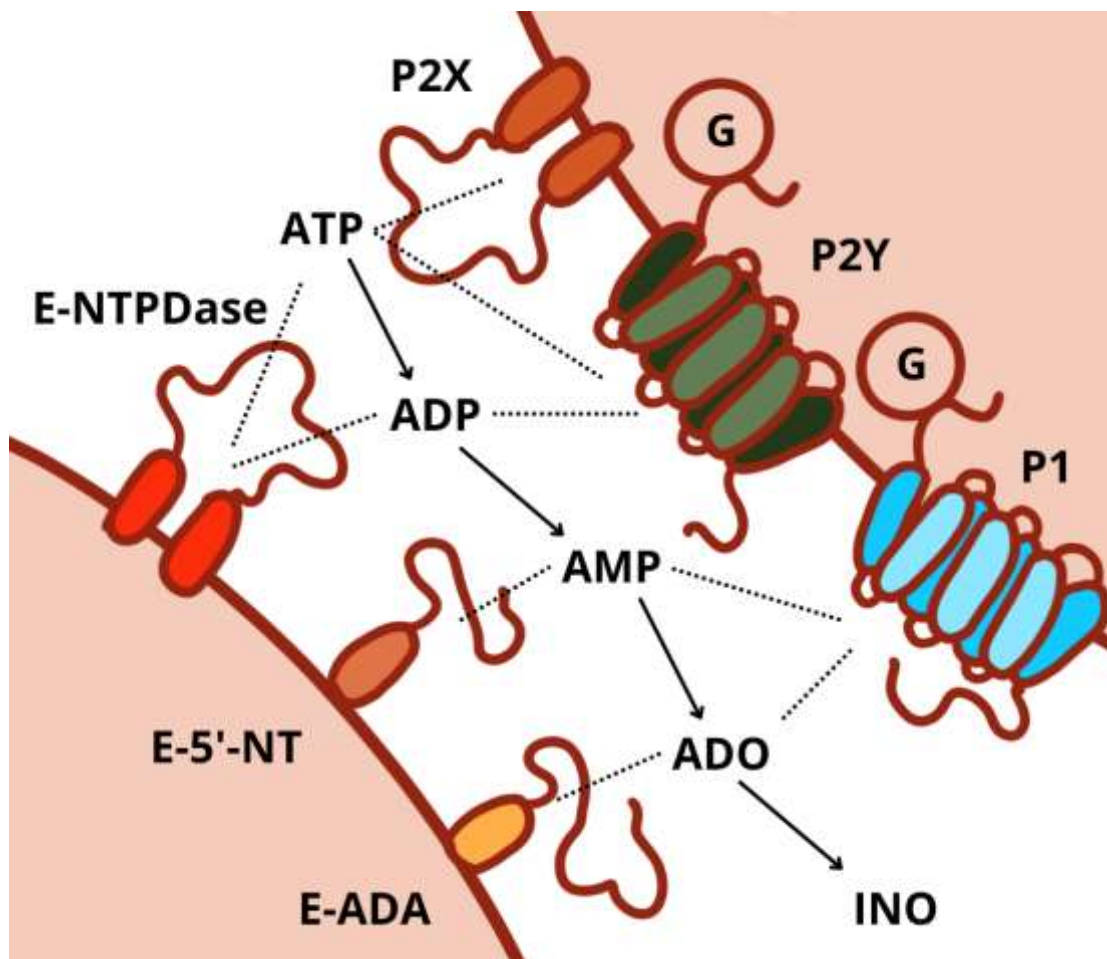


Figura 1. Principais enzimas e famílias de receptores do sistema purinérgico. E-NTPDase: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; E-5'-NT: ecto-5' nucleotidase; E-ADA: (ecto-adenosina desaminase); ATP (adenosina trifosfato); ADP (adenosina difosfato); AMP (adenosina monofosfato); ADO (adenosina) INO (inosina). Fonte: Bruna Pache Moreschi.

No meio extracelular, o ATP e o ADP são hidrolisados em AMP por enzimas de superfície de membrana plasmática, denominadas ectonucleotidasas. Dentre essas ectoenzimas, a ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase/CD39; E.C. 3.6.1.5), a fosfatase alcalina (ALP) e a ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs) possuem função de hidrólise de trifosfatos e difosfatos de nucleotídeos em monofosfatos de nucleotídeos, com a liberação de fosfato inorgânico (Pi) no meio. O AMP, um monofosfato de nucleotídeo purínico, é decomposto em adenosina (ADO) pela ação hidrolítica da ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT/CD7; E.C 3.1.3.5), também liberando Pi. Por fim, a ação hidrolítica da ecto adenosina desaminase (E-ADA; E.C 3.5.4.4) decompõe a ADO, liberando inosina (INO) e amônia (NH₃) no meio (Figura 1) (ZIMMERMANN, 2000).

O sistema purinérgico é importante para a manutenção da homeostasia, visto que os receptores purinérgicos estão envolvidos em diversas funções celulares. Receptores P2X estão

envolvidos na mobilização e proliferação celular, enquanto receptores P2Y promovem a agregação celular. No geral, o metabolismo de receptores P2X e P2Y, ativados por ATP e ADP, estão ligados a uma resposta pró-inflamatória e pró-agregante. Por sua vez, os receptores P1, ativados por ADO, estão relacionados a um metabolismo anti-inflamatório e anti-agregante (CEKIC; LINDEN, 2016).

2.4.1 Enzimas

O sistema purinérgico é responsável pela cascata de biossinalização em resposta à concentração de nucleotídeos e nucleosídeos de purinas e pirimidinas no meio extracelular. Essa hidrólise é feita por enzimas de membrana, organelares e solúveis, responsáveis pelo controle da concentração desses sinalizadores, por meio da hidrólise de trifosfatos, difosfatos e monofosfatos de nucleotídeos em nucleosídeos e seus derivados (Quadro 1) (CARDOSO et al., 2021).

Quadro 1. Principais famílias de enzimas do sistema purinérgico, localização, isoformas, substratos e produtos.

Família	Localização	Isoformas	Substratos	Produtos
NTPD	Transmembranar	ecto-nucleotídeo trifosfato difosfatase 1/E-NTPDase 1	NTP, NDP	NDP, NMP, Pi
		ecto-nucleotídeo trifosfato difosfatase 2/E-NTPDase 2	NTP	NDP, NMP, Pi
		ecto-nucleotídeo trifosfato difosfatase 3/E-NTPDase 3	NTP, NDP	NDP, NMP, Pi
		ecto-nucleotídeo trifosfato difosfatase 8/E-NTPDase 8	NTP	NDP, NMP, Pi
	Organelar	nucleotídeo trifosfato difosfatase 4/NTPDase 4	NTP, NDP	NDP, NMP, Pi
		nucleotídeo trifosfato difosfatase 5/NTPDase 5	ATP, NDP	ADP, NMP, Pi
	Citosólica	nucleotídeo trifosfato difosfatase 6/NTPDase 6	NDP	NMP, Pi
		nucleotídeo trifosfato difosfatase 7/NTPDase 7	NTP	NDP, NMP, Pi
5'NT	Transmembranar	ecto-5'-nucleotidase/eN	AMP	ADO, Pi
	Organelar	5'(3')-deoxiribonucleotidase mitocondrial/mdN	dTMP5', dUMP5', dTMP3', UMP3'	Timina, Uracila, Pi
	Citosólica	5'-nucleotidase citosólica IA/cN-IA	NMP	Nucleosídeo, Pi
		5'-nucleotidase citosólica IB/cN-IB	NMP	
		5'-nucleotidase citosólica II/cN-II	NMP	
		5'-nucleotidase citosólica III/cN-III	NMP	
5'(3')-deoxiribonucleotidase citosólica /cdN	NMP			
ADA	Transmembranar	adenosina desaminase transmembranar 1/E-ADA	ADO	INO, NH ₃
	Citosólica	adenosina desaminase citosólica 1/ ADA1	ADO	INO, NH ₃
		adenosina desaminase citosólica 2/ ADA2	ADO	INO, NH ₃

AMP (adenosina monofosfato); ADO (adenosina); INO (inosina); NTP (nucleotídeo trifosfato), NDP (nucleotídeo difosfato); NMP (nucleotídeo monofosfato) dTMP5' (timina 5'-monofosfato); dUMP5' (desoxiuridina 5'-monofosfato); dTMP3' (timina 3'-monofosfato); UMP3 (uridina 3'-monofosfato); NH₃ (amônia). Referências: ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; SCHETINGER et al., 2007; GIUSTI, 1974; VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1976; CRISTALLI et al., 2001.

2.4.1.1 NTPDase

As E-NTPDases hidrolisam nucleotídeos trifosfatos e difosfatos em nucleotídeos difosfatos e monofosfatos, respectivamente. Nesta família de enzimas, destacam-se a hidrólise de ATP em ADP e a hidrólise de ADP em AMP (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). As NTPDases compartilham as sequências de regiões em sua estrutura primária denominadas de regiões conservadas de apirase, sendo 4 delas proteínas transmembrana (E-NTPDase 1, 2, 3 e 8) e 4 com localização intracelular (NTPDase 4, 5, 6 e 7). Além disso, estas diferentes isoformas possuem afinidades distintas aos nucleotídeos e dependência de íons metálicos distintos (DWYER et al., 2007).

Dentre as isoformas, as NTPDases de superfície de membrana (ecto-NTPDases/E-NTPDases) são as mais estudadas, em especial a E-NTPDase 1 (CD39) (ZIMMERMANN, 2000). A E-NTPDase 1 humana apresenta em sua estrutura 510 aminoácidos, dentre eles 11 resíduos de cisteína e 7 sítios de N-glicosilação. Estruturalmente, a enzima apresenta uma região voltada para o meio extracelular, duas regiões transmembranares e uma região voltada para o citoplasma (ALLARD et al., 2016; ZHAO et al., 2022).

As propriedades catalíticas podem variar entre as isoformas de acordo com os sais de Mg^{2+} e Ca^{2+} do substrato, em concentração milimolar. Também, é necessário pH extracelular entre 7,0 e 8,0. Elas hidrolisam nucleotídeos trifosfatos, enquanto a capacidade de hidrólise de nucleotídeos difosfato varia de acordo com as isoformas (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Em se tratando de nucleotídeos purínicos, a isoforma E-NTPDase 1 possui afinidade semelhante para ATP e ADP, enquanto as E-NTPDases 3 e 8 possuem maior afinidade por ATP. Por fim, a E-NTPDase2 é considerada E-ATPase por possuir afinidade apenas por ATP (DWYER et al., 2007).

2.4.1.2 5'-NT

As ações NTPásica e NDPásica da E-NTPDase aumentam a concentração de NMP no meio extracelular. As 5'-NT hidrolisam os desoxirribonucleosídeos 5'-monofosfatos, clivando seu único grupo fosfato e liberando o respectivo nucleosídeo no microambiente extracelular. A família das 5'-NT é composta por enzimas homodiméricas, dependente de Zn^{2+} e Mg^{2+} com 7 diferentes isoformas isoladas e caracterizadas em humanos, sendo 1 transmembranar com seu

sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ecto-5'-nucleotidase/eN), uma localizada na matriz mitocondrial (5'(3')-deoxiribonucleotidase mitocondrial/mdN) e 5 solúveis no citoplasma (5'-nucleotidase citosólica IA/cN-IA; 5'-nucleotidase citosólica IB/cN-IB; 5'-nucleotidase citosólica II/cN-II; 5'-nucleotidase citosólica III/cN-III; 5'(3')-deoxiribonucleotidase citosólica/cdN). Estas isoformas apresentam massa molecular de 60 a 80 kDa, sendo as transmembranares ancoradas na membrana por um glicofosfatidilinositol (GPI) com suas subunidades glicoproteicas unidas por ligações dissulfeto (HUNSUCKER; MITCHELL; SPYCHALA, 2005).

A E-5'-NT possui maior afinidade pelo AMP, sendo a principal fonte de ADO extracelular (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Ainda, sabe-se que o ATP e o ADP exercem inibição competitiva com o AMP pelo sítio catalítico da E-5'-NT. Essa ligação não promove ação catalítica, porém pode afetar a manutenção dos níveis de ADO no microambiente (JAMES; RICHARDSON, 1993).

2.4.1.3 ADA

A ADO também é importante para a manutenção de diversas funções fisiológicas e patológicas. As enzimas inativadoras deste nucleosídeo são conjuntamente designadas de adenosina desaminase (ADA), que têm pelo menos 3 isoformas descritas em humanos: ADA 1, ADA 2 e ADA - complexo proteico (ADAcp) (CORDERO et al., 2001). Enquanto as 5'NT são as principais fornecedoras de ADO (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012), as ADA são as principais reguladoras dos níveis deste nucleosídeo no meio extracelular (KALJAS et al., 2017). A ADA catalisa a desaminação da ADO em inosina (INO) e amônia (NH₃), e da 2'-desoxiadensina (dADO) em desoxiinosina (dINO) e NH₃. A isoforma ADA 1, monomérica com massa de 41 kDa, foi constatada inicialmente imersa no citoplasma, contudo, posteriormente foi descoberta uma enzima ADA 1 ancorada na membrana por um dímero da ADAcp, nomeada ecto-adenosina desaminase (E-ADA) (CORDERO et al., 2001).

2.4.2 Receptores purinérgicos

Enquanto as enzimas purinérgicas controlam a concentração de nucleotídeos e nucleosídeos nos meios extra e intracelular (CARDOSO et al., 2021), os receptores purinérgicos desencadeiam cascatas biológicas após serem sensibilizados por essas moléculas (BURNSTOCK, 2018). Os receptores purinérgicos são responsáveis pela manutenção de diversas funções celulares, tais como proliferação, diferenciação e morte celular (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2010). Consequentemente estão envolvidos nas mais variadas funções biológicas, tais como respostas imunes, inflamação, secreção endócrina e exócrina, dor, agregação plaquetária e vasodilatação (BURNSTOCK, 2006). Ademais, esses receptores também estão envolvidos no funcionamento de diversas doenças vasculares, cardíacas e imunes (HUANG et al., 2021), sendo de forma parácrina ou autócrina.

Atualmente a classificação dos receptores purinérgicos é feita pela distribuição em duas grandes famílias: P1 e P2. Na família P1 estão os receptores de adenosina, que são receptores acoplados à proteína G (GPCR) (Quadro 2) e são divididos nas subfamílias A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. A família P2 é dividida em duas subfamílias: P2X, que são receptores ionotrópicos, se subdivide em receptores P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ e P2X₇, que são ativados exclusivamente pelo ATP; e a subfamília P2Y, com os receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄, os quais também são receptores do tipo GPCR e são ativados principalmente pelos nucleotídeos ATP, ADP, UTP e UDP (BURNSTOCK, 2018).

Quadro 2. Receptores purinérgicos acoplados à proteína G, ligante e resposta respectiva.

Família	Receptor	Proteína G	Resposta	Ligante
P1	A ₁	G _i	↑[Ca ²⁺] _i	ADO
	A _{2B}	G _s	↓[Ca ²⁺] _i	ADO
	A _{2B}	G _s ; G _q	↓[Ca ²⁺] _i ; ↑[Ca ²⁺] _i	ADO
	A ₃	G _i	↑[Ca ²⁺] _i	ADO
P2Y	P2Y ₁	G _q	↑[Ca ²⁺] _i	ADP
	P2Y ₂	G _q	↑[Ca ²⁺] _i	ATP, UTP
	P2Y ₄	G _q	↑[Ca ²⁺] _i	UTP
	P2Y ₆	G _q	↑[Ca ²⁺] _i	UDP
	P2Y ₁₁	G _q	↑[Ca ²⁺] _i	ATP
	P2Y ₁₂	G _i	↑[Ca ²⁺] _i	ADP
	P2Y ₁₃	G _i	↑[Ca ²⁺] _i	ADP
	P2Y ₁₄	G _i	↑[Ca ²⁺] _i	UDP-glicose; UDP

[Ca²⁺]_i: concentração de cálcio intracelular; ADO (adenosina); ATP (adenosina trifosfato); UTP (uracila trifosfato); ADP (adenosina difosfato); UDP (uracila difosfato); UDP-glicose (uracila difosfato-glicose).



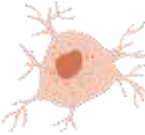


As famílias de receptores purinérgicos P1 e P2Y possuem estrutura transmembranar com sete domínios, com sua região N-terminal para o meio extracelular e C-terminal para o meio intracelular, com uma alça sustentando a ligação à proteína G. Já a família P2X são canais iônicos controlados por ATP. São responsáveis pela despolarização da membrana plasmática, promovendo a entrada de íons Ca²⁺ e Na⁺ e saída do íon K⁺, além de estimular outros canais de Ca²⁺ (BURNSTOCK, 2018).

2.5 Sistema imune e sinalização purinérgica

O sistema imune e suas células desempenham a função de proteção contra mecanismos infecciosos, porém, essa proteção se estende a agentes não infecciosos e outras células do organismo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2023; PRZYBYLA; SAKOWICZ-BURKIEWICZ; PAWELCZYK, 2018). O nome dado à proteção promovida pelo sistema imune é a imunidade. A imunidade de um organismo contra uma doença infecciosa é dada pelo conjunto de células com funções específicas e vias de sinalização capazes de identificar e neutralizar uma possível ameaça às demais vias do organismo. A neutralização de possíveis agentes infecciosos é feita por uma resposta sequencial e/ou coordenada, iniciada pela entrada de substâncias estranhas, denominada resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2023).

Denomina-se imunidade inata a defesa promovida pelo sistema imune nas primeiras horas ou dias após a exposição do organismo ao agente infeccioso, ou seja, é a primeira via de defesa. Esta ocorre por meio de mecanismos que agem de forma rápida, por isso já são existentes antes da infecção. Participam da imunidade inata células fagocitárias como macrófagos e neutrófilos, as células dendríticas, células *natural killer* e mastócitos (Quadro 3). A imunidade inata apresenta diversidade baixa, faz o reconhecimento de agentes infecciosos com base em genes herdados, o que lhe confere memória celular limitada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2023).

Quadro 3. Células participantes da imunidade inata, origem, função e receptores purinérgicos expressos.

Célula participante da imunidade inata	Origem	Função	Receptores purinérgicos expressos
Macrófagos 	Linhagem célula tronco mieloide	Função fagocitária de agentes estranhos e células, apresentação de antígeno	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃ (DESAI; LEITINGER, 2014), P2X ₄ , P2Y ₅ , P2X ₇ (MERZ et al., 2021), P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , P2Y ₁₄ (KLAVER; THURNHER, 2021)
Neutrófilos 	Linhagem célula tronco mieloide	Função fagocitária de agentes estranhos	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₄ , P2X ₁ , P2X ₅ , P2X ₇ (WANG; CHEN, 2018)
Células dendríticas 	Linhagem célula tronco mieloide	Função de apresentação de antígeno para o linfócito	A ₁ (LI et al., 2012), A _{2B} (NOVITSKIY et al., 2008), P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₇ , P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₅ , P2Y ₁₁ (FERRARI et al., 2000)
<i>Natural killer</i> 	Linhagem célula tronco linfoide	Função de reconhecimento e destruição de células com alterações	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃ (WANG; MATOSEVIC, 2018), P2X ₃ , P2X ₆ , P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₁₄ (BELDI et al., 2010)
Mastócitos 	Linhagem célula tronco mieloide	Função de liberação de grânulos após exposição ao antígeno	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃ (NISHI; PELLEG; SCHULMAN, 2016), P2X ₁ , P2X ₄ , P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , (BULANOVA; BULFONE-PAUS, 2010)

Imagens: Bruna Pache Moreschi.

Quando ocorre falha na eliminação de agentes infecciosos nas primeiras barreiras de defesa da imunidade inata, surge a necessidade de uma barreira imunológica que se adapte ao tipo de infecção em desenvolvimento no organismo. A resposta imune adaptativa é ativada por antígenos que resistem às barreiras da imunidade inata. As principais células responsáveis pela manutenção da resposta adaptativa são os linfócitos. Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade adaptativa humoral (Quadro 4) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2023).

Outra função importante do sistema imune é a ativação, manutenção e finalização e processos inflamatórios. A inflamação é composta por uma interação entre mediadores solúveis e células imunes, por meio de um processo de biossinalização. Esse sistema age protegendo o organismo de estímulos nocivos, de modo a fazer a manutenção da segurança contra infecções, células danificadas, etc. (PASQUINI et al., 2021).

Quadro 4. Linhagens de linfócitos, local de maturação e função.

Linhagem de linfócito	Local de maturação	Função
Linfócito B	Medula óssea (maturação parcial) e tecido linfóide periférico (maturação final)	Apresentação de antígeno
Linfócito Th0 CD4+	Timo	Recrutamento e ativação de fagócitos, diferenciação em Th1, Th2 e Th17
Linfócito Th1	Timo	Proteção contra patógenos intracelulares
Linfócito Th2	Timo	Proteção contra patógenos extracelulares
Linfócito Th17	Timo	Proteção nas mucosas, contra patógenos extracelulares e contribui na inflamação
Linfócito Tc CD8+	Timo	Eliminação de células infecciosas
Linfócito T _{REG}	Timo	Supressão à resposta imune, modulando a expansão e funções de linfócitos B e T

Ademais, a sinalização purinérgica é essencial para a manutenção das respostas imunes respectivas. Cekic & Linden (2016) destacaram resposta imune desencadeada após lesão tecidual em três estágios ditados pela sinalização purinérgica, com o tipo e quantidade de nucleotídeos e nucleosídeos que medeiam o processo. Nela, há a liberação massiva de ATP pelas células lesionadas no primeiro estágio, caracterizado pelos primeiros minutos após dano tecidual, aumentando a relação ATP/ADO. O ATP extracelular promove a ativação de receptores P2, que promovem o recrutamento e ativação das células imunes por quimiotaxia. Após este primeiro estágio, ocorre a redução da relação ATP/ADO por conta da ação das ectonucleotidases, que degradam o ATP a seus nucleotídeos derivados horas após o dano tecidual. Essa redução de ATP ativa receptores P1 em células imunes ativadas, pela alta concentração de ADO extracelular, que promove efeitos anti-inflamatórios, assim limitando a extensão e duração da inflamação local. Por fim, o terceiro estágio da resposta imune entre os próximos dias e semanas se dá pela ativação de células parenquimatosas do tecido conjuntivo e macrófagos, por meio dos receptores A_{2B}, que produz uma inflamação tecidual persistente de baixo grau, angiogênese e fibrose.

Alberto e col. (2022) resumiram o papel de receptores purinérgicos P2 em leucócitos e a importância de nucleotídeos de purina para o funcionamento do sistema imune, principalmente nas funções básicas de maturação, migração e ativação dessas células. Ainda,

destacou-se o importante papel dos nucleotídeos purinérgicos na produção de citocinas, na regulação da resposta imune inata e adaptativa, em doenças infecciosas e na dor.

2.5.1 Linfócitos

Conforme mencionado anteriormente, os linfócitos constituem uma importante classe de células responsáveis pela defesa imune do organismo. Apesar de existir uma vasta diversidade de linfócitos, todos se originam de células tronco pluripotentes da medula óssea. Essas células dão origem à linhagem mieloide, tais como os granulócitos e demais leucócitos, e à linhagem linfoide, tais como os linfócitos B, T e células *natural killer* (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

As células da linhagem linfoide possuem locais diferentes de maturação, de acordo com sua diferenciação e função. As células da linhagem de linfócitos B expressam o receptor de antígeno B (BCR, do inglês *B cell receptor*) na membrana e maturam parcialmente na medula óssea, onde são originados, e posteriormente no tecido linfóide periférico (CHAPLIN, 2010). O receptor BCR reconhece conformações tridimensionais, como proteínas e polissacarídeos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023). Após sua maturação, caem na corrente sanguínea e migram para órgãos linfoides secundários. Os linfócitos B têm a função principal de reconhecimento e apresentação de antígenos, por meio das imunoglobulinas (Ig) de membrana *IgM* e *IgD*. (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Após o reconhecimento do antígeno, os linfócitos B se proliferam e se diferenciam em plasmócitos e células B de memória (CHAPLIN, 2010).

Além do linfócito B, existe uma grande variedade de linfócitos T, tais como os linfócitos T auxiliares ou T *helper* (Th0; TCD4⁺) e os linfócitos T citotóxicos (TCD8⁺). As células T auxiliares diferenciam-se a partir de células Th0 nos fenótipos Th1, Th2, Th17 e células T regulatórias (T_{REG}). A principal função do linfócito T é o de reconhecimento e destruição do antígeno apresentado por uma célula apresentadora de antígeno como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas. Dada essa função característica, os linfócitos T apresentam em sua superfície o receptor de antígeno T $\alpha\beta$ (TCR, do inglês *T cell receptor*), que lhe conferem essa capacidade (CHAPLIN, 2010). O receptor TCR, ao contrário do receptor BCR, reconhece polipeptídeos lineares ancorados na membrana celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

Os diferentes tipos de linfócitos T são característicos por suas funções distintas (Quadro 4). Destacam-se na produção de citocinas, importantes para a sinalização do sistema imune no processo inflamatório, quimiotaxia, reconhecimento e eliminação de antígenos. A diferenciação

dessas células é feita de acordo com seus estágios de maturação. Células tronco hematopoiéticas comprometidas como a maturação em células T fazem a migração da medula óssea para o córtex do timo, onde ocorre a expressão dos marcadores CD3, CD4 e CD8 na superfície celular. A partir deste momento, as células T são separadas de acordo com a sua capacidade de reconhecimento de proteínas HLA (antígeno leucocitário humano) de classe I ou II. Se a célula apresenta capacidade de reconhecimento de proteínas de classe I, ela expressa CD8, mas se apresenta capacidade de reconhecimento de proteínas de classe II, expressa CD4. Após essa seleção, as células migram para a medula do timo, onde são selecionadas e removidas de acordo com a sua afinidade excessiva às proteínas HLA. Por fim, as células que passaram pela seleção e maturação são exportadas para o organismo para cumprirem suas funções de Th ou Tc (CHAPLIN, 2010).

Diferente dos linfócitos B e T, as células *natural killer* não possuem BCR ou TCR. Isso limita sua capacidade de reconhecimento de padrões moleculares e, conseqüentemente, elas não desenvolvem memória imunológica como os linfócitos B (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

2.5.2 Sinalização purinérgica linfocitária

Os linfócitos expressam uma quantidade considerável de receptores purinérgicos em sua superfície (Figura 3), e boa parte de suas funções básicas são iniciadas pela sua ativação. Os linfócitos B expressam os receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (PRZYBYLA; SAKOWICZ-BURKIEWICZ; PAWELCZYK, 2018), $P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_4$, $P2X_7$ (LEE et al., 2006), $P2Y_2$, $P2Y_4$ e $P2Y_{12}$ (WANG et al., 2018). O metabolismo celular dos linfócitos B libera ATP por vesículas endossomais para o meio extracelular, que é degradado pelas ectonucleotidases em sua superfície. O mecanismo de liberação de ATP é dependente de Ca^{2+} , semelhante ao das plaquetas. Já os linfócitos T expressam os receptores A_{2A} , $P2X_1$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_7$, $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$ e $P2Y_{13}$ (ALBERTO et al., 2022).

Linfócitos T e B expressam receptores $P2X$, que são canais iônicos (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). Após a ligação do ligante a receptor, ocorre a mudança conformacional que permite a entrada de Ca^{2+} e Na^+ . Dessa forma, ocorre a despolarização da membrana plasmática e desencadeia a sinalização para mobilização citoplasmática. O influxo de Ca^{2+} intracelular incrementa o efluxo de Ca^{2+} de organelas citoplasmáticas, o que causa a mobilização de Ca^{2+} intracelular. Por fim, essa mobilização de Ca^{2+} induz mudanças no citoplasma como a degranulação, projeção citoplasmática e ativação de linfócitos (TOLDI, 2013). Os receptores

P2X também estão associados a respostas inflamatórias. P2X₇ está associado à maturação e liberação das citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1 β (IL-1 β) (FERRARI et al., 2006), IL-18 (MEHTA; HART; WEWERS, 2001) e IL-1 α (PELEGRIN; BARROSO-GUTIERREZ; SURPRENANT, 2008), além de que P2X₁ está associado à síntese de IL-2 (YIP et al., 2009).

O ATP liberado pelo tecido lesionado pode ativar receptores P2X, ou pode ser usado e degradado a outros nucleotídeos visando atrair células imunes (CEKIC; LINDEN, 2016). Prybyla et al. (2018) resumiram a co-atuação de sinalizadores purinérgicos entre linfócitos B e T. Há evidências de que linfócitos B fazem sua regulação autócrina e regulação de linfócitos T de forma parácrina por meio de receptores A₃. Ainda, quando ativos, linfócitos B diminuem a expressão da E-5'-NT, o que acaba aumentando a concentração extracelular de AMP. Como resultado, esse AMP supostamente teria o efeito de induzir a proliferação de linfócitos B, via receptores A₁, enquanto inibiria a proliferação em linfócitos T (SAZE et al., 2013). Os receptores P2Y estão mais envolvidos com a quimiotaxia, que é uma função importante dessa classe de células. A sinalização purinérgica também está presente na migração de linfócitos. Em linfócitos T, receptores P2X₄ aumentam o metabolismo mitocondrial por meio do influxo de Ca²⁺, o que aumenta a fosforilação oxidativa para a produção de ATP. Ainda, auxiliam na polarização e migração celular (LEDDEROSE et al., 2018, 2020).

Os receptores P2Y também estão presentes na regulação da função linfocitária. Sinais *find-me* para atração de linfócitos para apoptose são emitidos pela liberação extracelular de ATP e UTP, que ativam receptores P2Y na superfície de linfócitos T (ELLIOTT et al., 2009). Os receptores P2Y e P1 estão relacionados com o fluxo de Ca²⁺ e de AMPc intracelular, por meio do metabolismo da proteína G respectivamente acoplada (CONIGRAVE et al., 2001). O AMPc está relacionado com o controle da proliferação, apoptose e diferenciação linfocitária (GANTNER et al., 1998). Os receptores P1 estão associados ao metabolismo anti-inflamatório de ADO. Abbracchio e Ceruti (2007) descrevem uma cascata de eventos pós lesão mediada pelo metabolismo da ADO. Nela, a ADO proveniente do ATP liberado na hipóxia do tecido lesionado, decomposto pelas ectonucleotidases e pela inibição da E-ADA, ativa receptores A_{2A} e A_{2B}. O metabolismo da proteína G_i acoplada a esses receptores aumentam a concentração de APMc intracelular, que promove um efeito imunossupressor. Por sua vez, também ocorre a ativação de receptores A₁ e A₃, que inibem a formação de AMPc. Essa regulação supostamente poderia fornecer tempo suficiente para a destruição do patógeno sem que haja grande dano tecidual.

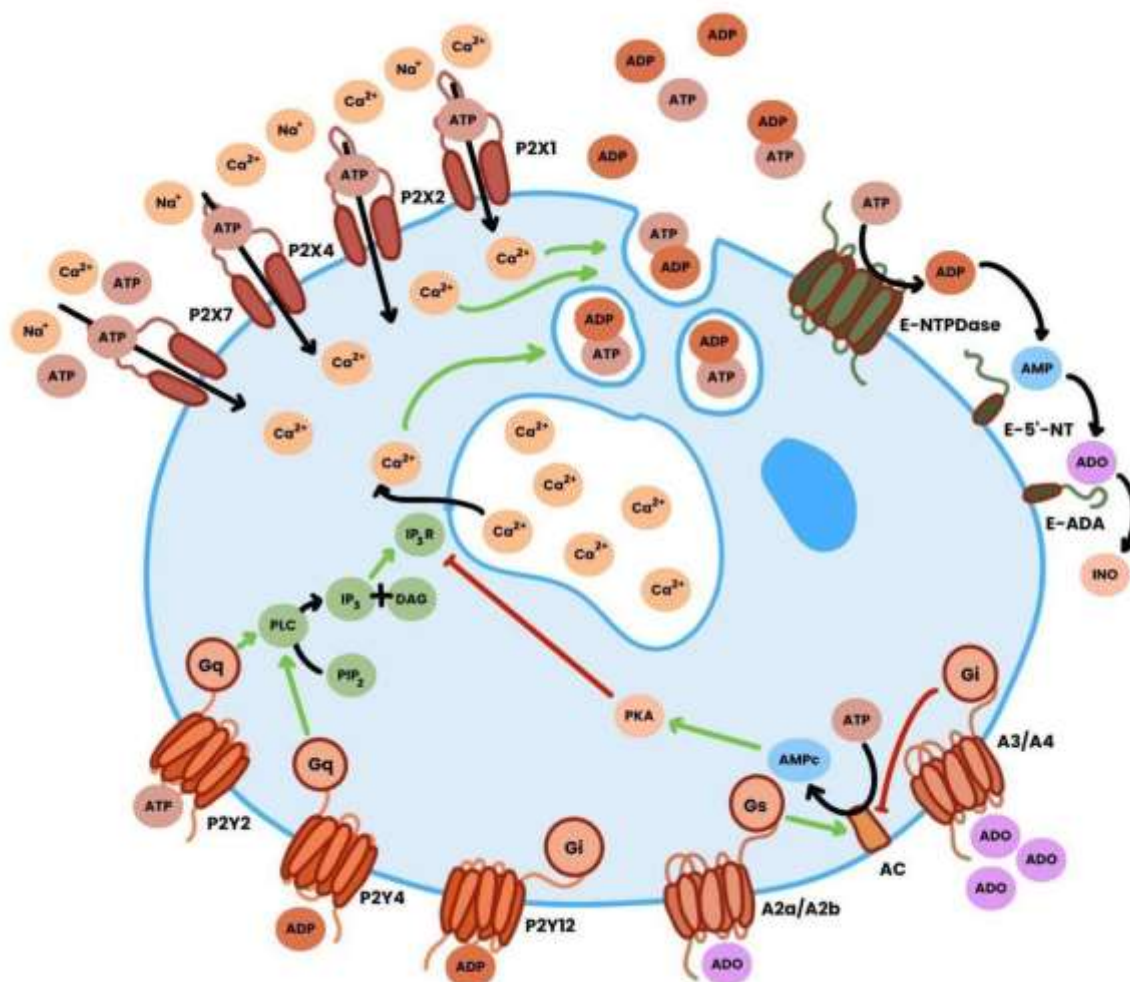


Figura 2. Representação esquemática da sinalização purinérgica linfocitária. E-NTPDase (ecto-NTPDase); E-5'-NT (ecto-5'nucleotidase); E-ADA (ecto-adenosina desaminase); ATP (adenosina trifosfato); ADP (adenosina difosfato); AMP (adenosina monofosfato); ADO (adenosina) INO (inosina). Fonte: Bruna Pache Moreschi.

2.6 Plaquetas

Os leucócitos em geral são células diferenciadas, em gerações, provenientes de uma célula tronco hematopoiética pluripotente. Ao longo do processo de hematopoiese, outras células são criadas, como os megacariócitos. Os megacariócitos são células grandes, das quais derivam-se fragmentos, descritos como corpúsculos anucleados discoides, as plaquetas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

As plaquetas possuem um sistema de canais com invaginações na sua estrutura, que permite que haja comunicação entre o interior e a superfície da plaqueta. Esse sistema otimiza a liberação do conteúdo presente nos grânulos plaquetários. O conteúdo granular das plaquetas é diverso. Os grânulos δ armazenam ADP, ATP, serotonina e histamina. Os grânulos α possuem fibrinogênio e outros fatores de coagulação, fator de crescimento plaquetário e plasminogênio. Por fim, os grânulos λ são lisossomos que armazenam proteases e glicohidrolases, que serão, ocasionalmente, utilizadas pelas plaquetas para a ativação, mobilização e agregação plaquetária (KAUSKOT; HOYLAERTS, 2012; RENDU; BROHARD-BOHN, 2001).

Como citado anteriormente, as plaquetas possuem uma função importante na manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Quando ativadas por agonistas específicos, desempenham protagonismo na agregação plaquetária, que promove o estancamento de lesões nos vasos e evita o extravasamento sanguíneo. As plaquetas apresentam uma diversidade de receptores em sua superfície, que controlam suas funções de ativação, adesão e agregação plaquetária. Na membrana, as plaquetas apresentam receptores para a trombina (receptores PAR-1 e PAR-4), para o tromboxano A₂ (receptores TP α /TP β), para o fator de ativação de plaquetas (receptor PAF_R), para o colágeno (receptores GPVI e α 2 β 1) (KAUSKOT; HOYLAERTS, 2012), para o ATP (P2X₁), para o ADP (P2Y₁ e P2Y₁₂) e para A ADO (A_{2A} e A_{2B}). Sabe-se também que as plaquetas constituem uma população heterogênea, o que resulta em uma distribuição diferencial de receptores em comparação umas com as outras, com base no tamanho e na função de cada plaqueta e receptor (KROUPENOVA; RAVID, 2018).

2.6.1 Sinalização purinérgica plaquetária

Sabe-se que o ATP e o ADP são importantes agonistas da agregação plaquetária. As plaquetas expressam os receptores purinérgicos P1 A_{2A} e A_{2B}, ativados por ADO; P2X₁, ativado

por ATP e inibido por ADP; P2Y₁ e P2Y₁₂, ativados por ADP e inibidos por ATP (KROUPENOVA; RAVID, 2018).

A ADO é uma molécula conhecida por exercer um papel regulatório na hemostasia, principalmente por conta da cascata da proteína G_s acoplada aos receptores A_{2A} e A_{2B}. A proteína G_s, presente na porção C-terminal intracelular, se desloca após a ativação destes receptores pela ADO. A proteína G_s ativa a enzima adenilil-ciclase (AC) que converte ATP intracelular em AMP cíclico (AMPC). A molécula de AMPC ativa a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, fosforila e bloqueia a liberação de Ca²⁺ intracelular por meio da inibição do receptor do IP₃ (IP₃R) no canal do retículo endoplasmático (YANG et al., 2010) (Figura 2). Como demonstrado na Quadro 2, os receptores A_{2B} também recrutam a proteína que, diferente da proteína G_s, apresenta efeito pró-agregante. Quando ocorre a ativação da proteína G_q na porção C-terminal intracelular do receptor, ocorre a ativação da fosfolipase C (PLC). A PLC cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). O IP₃ se desloca até o receptor canal de cálcio do retículo endoplasmático, ativando o IP₃R, que aberto permite o efluxo do íon Ca²⁺ armazenado na organela (Figura 2). Esta mobilização de Ca²⁺ intracelular resulta na mudança conformacional plaquetária, liberação de outros nucleotídeos pró-agregantes para o meio extracelular, recrutamento plaquetário e agregação (JONES; EVANS; MAHAUT-SMITH, 2014).

O ATP extracelular ativa os receptores purinérgicos P2X₁, que são canais iônicos e promovem o influxo de Ca²⁺ e Na⁺ para o meio intracelular. Esse influxo de íons resulta em uma alteração na morfologia plaquetária, o que causa a ativação, formação de pseudópodes e degranulação dos grânulos δ. Essa série de mudanças conformacionais, principalmente a degranulação, libera mais ATP e ADP para o meio extracelular (Figura 2). O ATP liberado pode ativa outros receptores P2X de plaquetas e outras células, por meio de sinalização parácrina, ou ser hidrolisado por ATPases de membrana presentes no microambiente vascular. A degranulação plaquetária aumenta a concentração de nucleotídeos purínicos no microambiente vascular, o que promove a reação em cascata para ativação e recrutamento de outras plaquetas, resultando em uma agregação plaquetária eficiente (Figura 2) (KROUPENOVA; RAVID, 2018; OURY; WÉRA, 2021).

O ADP liberado pela degranulação ou proveniente da hidrólise do ATP extracelular pode ativar receptores P2Y das plaquetas e outras células. Os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ presentes na superfície das plaquetas também podem promover um aumento na agregação plaquetária, porém por vias distintas, relacionadas às proteínas G acopladas a cada

receptor (Figura 2). Receptores P2Y₁ recrutam a proteína G_Q que, por meio da cascata da PLC, promove o efluxo de Ca²⁺ presente no retículo endoplasmático. Como explicado anteriormente, essa mobilização de Ca²⁺ intracelular resulta na mudança conformacional interna e externalização do conteúdo de mais grânulos δ , aumentando a concentração de nucleotídeos, que possuem função pró-agregante no meio extracelular, e intensificando o recrutamento e agregação plaquetária. Já os receptores P2Y₁₂ ativam a proteína G_I que, por sua vez, inibe a enzima AC, resultando assim em um efeito pró-agregante (Figura 2) (JONES; EVANS; MAHAUT-SMITH, 2014).

As plaquetas também apresentam em sua superfície as enzimas ectonucleotidases, tais como a E-NTPDase e a E-5'-NT, que regulam a concentração desses nucleotídeos de adenina no microambiente vascular (CASTILHOS et al., 2016; MORELLO et al., 2021). A função da enzima E-NTPDase em plaquetas já foi investigada em condições adversas do sistema cardiovascular e sanguíneo. Morello e col. (2021) reuniram informações sobre o papel da E-NTPDase na tromboinflamação geral e condições como hipertensão, aterosclerose e trombose, concluindo que se pode acreditar na sua participação no controle do processo inflamatório, além de exercer papel importante nos mecanismos antitrombóticos do ambiente microvascular. Zeng e col. (2020) e Pulte e col. (2007) reafirmam a importância das NTPDases para a hemostasia, caracterizando-a como a responsável pela manutenção da concentração de nucleotídeos pró-agregantes, podendo diminuir ou até abolir a agregação.

Além das ectonucleotidases citadas, as plaquetas também apresentam a enzima purinérgica E-ADA em sua superfície, que catalisa a desaminação irreversível de ADO em INO. A atividade dessa enzima é fundamental para a manutenção da hemostasia, por conta de exercer o controle da concentração de ADO no microambiente vascular, que exerce um efeito inibitório da agregação plaquetária por meio dos receptores A_{2A} e A_{2B} (YANG et al., 2010).

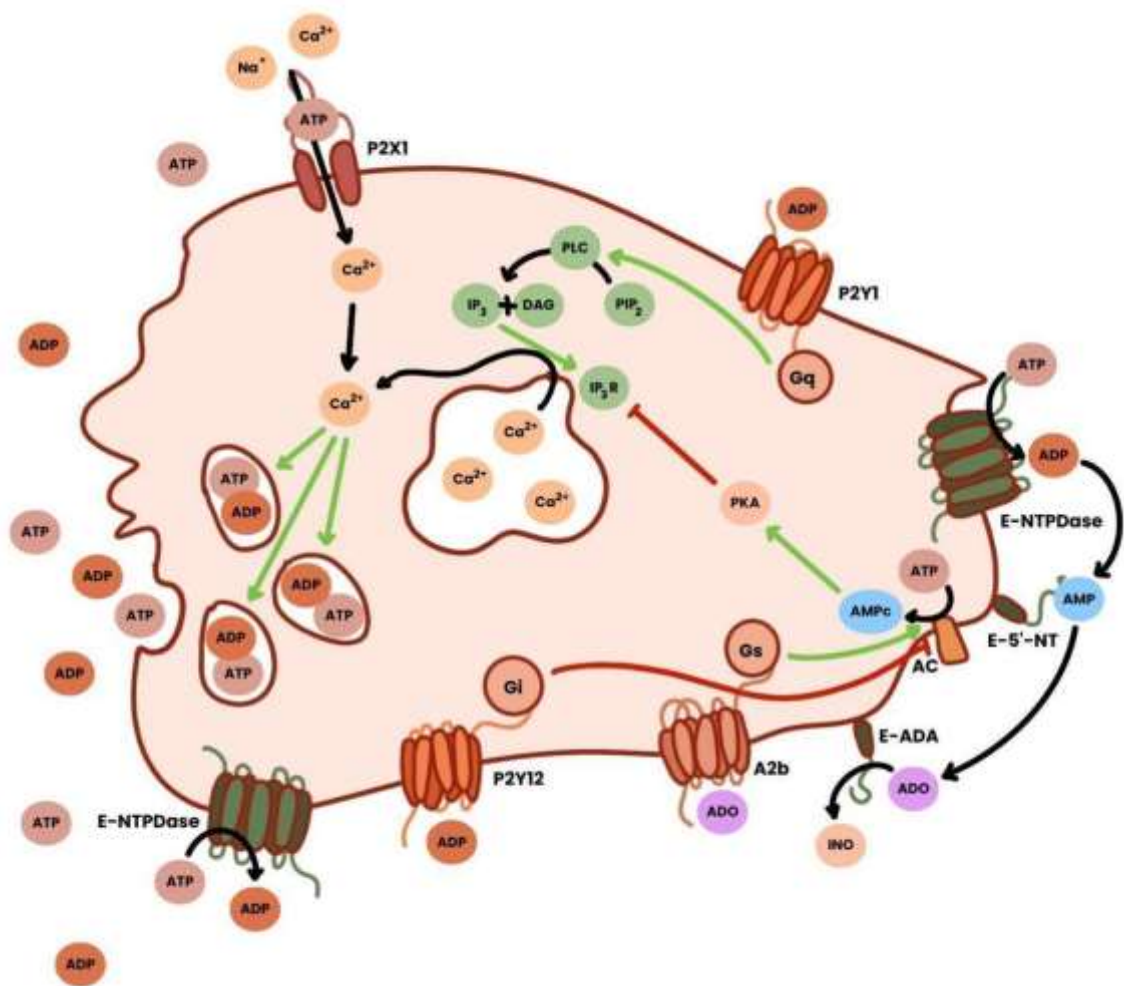


Figura 3. Representação esquemática da sinalização purinérgica plaquetária. E-NTPDase (ecto-NTPDase); E-5'-NT (ecto-5'nucleotidase); E-ADA (ecto-adenosina desaminase); ATP (adenosina trifosfato); ADP (adenosina difosfato); ADO (adenosina) INO (inosina). Fonte: Bruna Pache Moreschi.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Investigar a atividade de enzimas do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas de usuárias de contraceptivos hormonais orais combinados.

3.2 Objetivos específicos

Realizar o levantamento de dados disponíveis na literatura científica referente à associação entre contraceptivos hormonais orais e o desenvolvimento de condições tromboembólicas em usuárias.

Quantificar a atividade da enzima E-NTPDase em linfócitos e plaquetas de usuárias de contraceptivos orais e de não usuárias de contracepção hormonal.

Quantificar a atividade da enzima E-5'-NT em plaquetas de usuárias de contraceptivos orais e de não usuárias de contracepção hormonal.

Quantificar a atividade da enzima E-ADA em linfócitos e plaquetas de usuárias de contraceptivos orais e de não usuárias de contracepção hormonal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, SHIV. **Imunologia Celular e Molecular**. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019
- ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S. **P1 receptors and cytokine secretion. Purinergic Signalling**, 2007.
- ABOT, A. et al. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor α modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 10, 2014.
- ACHILLES, S. L. et al. Zim CHIC: A cohort study of immune changes in the female genital tract associated with initiation and use of contraceptives. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 3, 2020.
- ÅGREN, U. M. et al. **Effects of a monophasic combined oral contraceptive containing norgestrel acetate and 17 β -oestradiol compared with one containing levonorgestrel and ethinylestradiol on haemostasis, lipids and carbohydrate metabolism**. European Journal of Contraception and Reproductive Health Care. **Anais...**2011.
- AL KHALIFAH, R. A. et al. Efficacy of Treatments for Polycystic Ovarian Syndrome Management in Adolescents. **Journal of the Endocrine Society**, v. 5, n. 1, 2021.
- ALBERTO, A. V. P. et al. **Physiologic roles of P2 receptors in leukocytes**. **Journal of Leukocyte Biology**, 2022.
- ALLARD, B. et al. **Immunosuppressive activities of adenosine in cancer**. **Current Opinion in Pharmacology**, 2016.
- BARUZZI, A. C. DO A. et al. Trombose Venosa Profunda. Profilaxia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** , v. 67, n. 3, 1996.
- BELDI, G. et al. Deletion of CD39 on natural killer cells attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. **Hepatology**, v. 51, n. 5, 2010.
- BELICOVÁ, M. et al. Thromboembolic disease and present oral contraception. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 9, n. 1, 2003.
- BLONDON, M. Update On Oral Contraception And Venous Thromboembolism. **HemaSphere**, v. 4, p. 1–3, 2020.
- BRAGA, G. C.; VIEIRA, C. S. Contraceção hormonal e tromboembolismo. **BSB Médica**, 2013.
- BRITO, M. B.; NOBRE, F.; VIEIRA, C. S. Contraceção hormonal e sistema cardiovascular TT - Hormonal contraception and cardiovascular system TT - Contracepción hormonal y sistema cardiovascular. **Arq. bras. cardiol**, v. 96, n. 4, 2011.
- BULANOVA, E.; BULFONE-PAUS, S. **P2 receptor-mediated signaling in mast cell biology**. **Purinergic Signalling**, 2010.

BURNSTOCK, G. **Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. Pharmacological Reviews**, 2006.

BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, 2018.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: Purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. **Cell Death and Disease**, v. 1, n. 1, 2010.

CAGNOLATI, D. et al. Hemostasia e distúrbios da coagulação, 2007. Disponível em: <<https://document.onl/documents/hemostasia-e-disturbios-da-coagulacao-hemostasia-e-disturbios-da-coagulacao.html?page=1>>. Acesso em 14 de Fevereiro de 2024.

CALLAI, T. et al. **Tabagismo e uso de anticoncepcionais orais relacionados a fenômenos tromboembólicos: relato de caso e revisão de literatura. Reproducao e Climaterio**, 2017.

CARDOSO, A. M. et al. Sinalização purinérgica e suas implicações fisiológicas. Em: **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas**. [s.l: s.n.].

CASTILHOS, L. G. et al. Altered E-NTPDase/E-ADA activities and CD39 expression in platelets of sickle cell anemia patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 79, 2016.

CASTOLDI, E.; HACKENG, T. M. **Regulation of coagulation by protein S. Current Opinion in Hematology**, 2008.

CEKIC, C.; LINDEN, J. **Purinergic regulation of the immune system. Nature Reviews Immunology**, 2016.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, 2010.

CONIGRAVE, A. D. et al. P2Y11 receptor expression by human lymphocytes: Evidence for two cAMP-linked purinoceptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 426, n. 3, 2001.

CORDERO, O. J. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 6, 2001.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

CREININ, M. D.; JENSEN, J. T. Oral contraceptive generations – Time to stop using a marketing myth to define nomenclature. **Contraception**, v. 102, n. 3, 2020.

CRISTALLI, Gloria et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. **Medicinal research reviews**, v. 21, n. 2, p. 105-128, 2001.

DESAI, B. N.; LEITINGER, N. Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, 2014.

DHONT, M. **History of oral contraception. European Journal of Contraception and Reproductive Health Care**, 2010.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. **Purinergic signaling in the immune system. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 2015.

- DIELIS, A. W. J. H. et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, n. 1, 2008.
- DINGER, J.; DO MINH, T.; HEINEMANN, K. Impact of estrogen type on cardiovascular safety of combined oral contraceptives. **Contraception**, v. 94, n. 4, 2016.
- DOUXFILS, J. et al. Evaluation of the effect of a new oral contraceptive containing estetrol and drospirenone on hemostasis parameters. **Contraception**, v. 102, n. 6, 2020.
- DRAGOMAN, M. V. The combined oral contraceptive pill- recent developments, risks and benefits. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 28, n. 6, 2014.
- DWYER, K. M. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1–2, 2007.
- ELLIOTT, M. R. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature**, v. 461, n. 7261, 2009.
- FERRARI, D. et al. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 15, 2000.
- FERRARI, D. et al. The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, 2006.
- FRANCO, R. F. FISILOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 34, n. 3/4, 2001.
- FRUZZETTI, F.; CAGNACCI, A. Venous thrombosis and hormonal contraception: what's new with estradiol-based hormonal contraceptives? **Open Access Journal of Contraception**, v. Volume 9, 2018.
- FUENTES, E.; PALOMO, I. **Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. Vascular Pharmacology**, 2015.
- GANTNER, F. et al. Phosphodiesterase profile of human B lymphocytes from normal and atopic donors and the effects of PDE inhibition on B cell proliferation. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, n. 6, 1998.
- GAUSSEM, P. et al. Haemostatic effects of a new combined oral contraceptive, nomegestrol acetate/17 β -estradiol, compared with those of levonorgestrel/ethinyl estradiol: A double-blind, randomised study. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 105, n. 3, 2011.
- GIUSTI, G. Adenosine deaminase. In: Methods of enzymatic analysis. **Academic Press**, p. 1092-1099, 1974.
- GOLOBOF, A.; KILEY, J. The Current Status of Oral Contraceptives: Progress and Recent Innovations. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 34, n. 3, 2016.
- GUERRA, C. C. C.; ROSENFELD, L. G. M. Fisiologia da Coagulação. **Mafei FHA. Doenças Vasculares Periféricas**, v. 3, p. 233–238, 2002.

GUPTA, D. R.; PRABHAKAR, B.; WAIRKAR, S. **Non-oral routes, novel formulations and devices of contraceptives: An update.** *Journal of Controlled Release*, 2022.

GUYTON A. C. **Tratado de Fisiología Médica.** [s.l: s.n.]. v. 12

HEIT, J. A. et al. Familial segregation of venous thromboembolism. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 2, n. 5, 2004.

HORNE, C. H. W. et al. Effects of oestrogen and progestogen on serum levels of 2-macroglobulin, transferrin, albumin, and IgG. **Journal of Clinical Pathology**, v. 24, n. 5, 1971.

HUANG, Z. et al. **From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021.

HUNSUCKER, S. A.; MITCHELL, B. S.; SPYCHALA, J. **The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism.** *Pharmacology and Therapeutics*, 2005.

JAMES, S.; RICHARDSON, P. J. Production of Adenosine from Extracellular ATP at the Striatal Cholinergic Synapse. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 1, 1993.

JONES, S.; EVANS, R. J.; MAHAUT-SMITH, M. P. Ca²⁺ influx through P2X1 receptors amplifies P2Y1 receptor-evoked Ca²⁺ signaling and ADP-evoked platelet aggregation. **Molecular Pharmacology**, v. 86, n. 3, 2014.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas.** 14. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

KALJAS, Y. et al. Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 3, 2017.

KAUSKOT, A.; HOYLAERTS, M. F. Platelet receptors. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 210, 2012.

KEMMEREN, J. M. et al. Effects of second and third generation oral contraceptives and their respective progestagens on the coagulation system in the absence or presence of the factor V Leiden mutation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 87, n. 2, 2002.

KHIALANI, D.; ROSENDAAL, F.; VLIEG, A. V. H. Hormonal Contraceptives and the Risk of Venous Thrombosis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 46, n. 8, 2020.

KLAVER, D.; THURNHER, M. **Control of macrophage inflammation by P2Y purinergic receptors.** *Cells*, 2021.

KLUFT, C. et al. Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. **Contraception**, v. 95, n. 2, 2017.

KLUFT, C.; LANSINK, M. **Effect of oral contraceptives on haemostasis variables.** *Thrombosis and Haemostasis.* **Anais...**1997.

KOSTER, T. et al. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 71, n. 6, 1994.

KOUPENOVA, M.; RAVID, K. **Biology of platelet purinergic receptors and implications for platelet heterogeneity.** *Frontiers in Pharmacology*, 2018.

- KUHL, H. Effects of progestogens on haemostasis. **Maturitas**, v. 24, n. 1–2, 1996.
- LEDDEROSE, C. et al. Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 8, 2018.
- LEDDEROSE, C. et al. The purinergic receptor P2Y11 choreographs the polarization, mitochondrial metabolism, and migration of T lymphocytes. **Science Signaling**, v. 13, n. 651, 2020.
- LEE, D. H. et al. Expression of P2 receptors in human B cells and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. **BMC Immunology**, v. 7, 2006.
- LI, L. et al. Dendritic cells tolerized with adenosine A2AR agonist attenuate acute kidney injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 11, 2012.
- LIMA, A. C. S. et al. **Influence of hormonal contraceptives and the occurrence of stroke: integrative review**. **Revista brasileira de enfermagem**, 2017.
- LOBO, R. A.; ROMÃO, F. Hormonas sexuais femininas e trombose venosa profunda. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v. 7, n. 4, p. 208–214, 2011.
- MARTÍNEZ, F. et al. **Venous and pulmonary thromboembolism and combined hormonal contraceptives. Systematic review and meta-analysis**. **European Journal of Contraception and Reproductive Health Care**, 2012.
- MAZHAR, N. et al. Effect of Hormonal Contraceptives on Fibrinogen and Plasma Antithrombin. **Contraception**, v. 4, p. 1, 2021.
- MEHTA, V. B.; HART, J.; WEWERS, M. D. ATP-stimulated Release of Interleukin (IL)-1 β and IL-18 Requires Priming by Lipopolysaccharide and Is Independent of Caspase-1 Cleavage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, 2001.
- MELO, R. E. V. A. et al. Trombose Venosa Profunda. **International journal of dentistry**, v. 2, n. 1, p. 73–79, 2006.
- MERZ, J. et al. Pro- and anti-inflammatory macrophages express a sub-type specific purinergic receptor profile. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 3, 2021.
- MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, 2010.
- MIDDELDORP, S. **Thrombosis in women: What are the knowledge gaps in 2013?** **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Assistência em planejamento farmacêutico - anticoncepção hormonal oral, 2017. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0102assistencia2.pdf>> . Acesso em 28 de Setembro de 2023.
- MOHAMED, A. B. O. et al. The effects of oral contraceptive usage on thrombin generation and activated protein C resistance in Saudi women, with a possible impact of the body mass index. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 2018.

- MORELLO, S. et al. **Thrombo-inflammation: A focus on ntpdase1/cd39**. *Cells*, 2021.
- MORIARTY, K.; KIM, K. H.; BENDER, J. R. **Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling**. *Endocrinology*, 2006.
- NISHI, H.; PELLEGG, A.; SCHULMAN, E. S. IgE receptor-mediated histamine release in human lung mast cells: Modulation by purinergic receptor ligands. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, v. 46, n. 5, 2016.
- NOVITSKIY, S. V. et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood*, v. 112, n. 5, 2008.
- OURY, C.; WÉRA, O. P2X1: a unique platelet receptor with a key role in thromboinflammation. *Platelets*, v. 32, n. 7, 2021.
- PADOVAN, F. T.; FREITAS, G. Anticoncepcional oral associado ao risco de trombose venosa profunda. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v. 9, n. 1, p. 73–77, 2015.
- PASQUINI, S. et al. **Adenosine and inflammation: Here, there and everywhere**. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.
- PELEGRIN, P.; BARROSO-GUTIERREZ, C.; SURPRENANT, A. P2X7 Receptor Differentially Couples to Distinct Release Pathways for IL-1 β in Mouse Macrophage. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 11, 2008.
- PLU-BUREAU, G. et al. **Hormonal contraceptives and venous thromboembolism: An epidemiological update**. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013.
- PRZYBYLA, T.; SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M.; PAWELCZYK, T. **Purinergic signaling in B cells**. *Acta Biochimica Polonica*, 2018.
- PULTE, D. et al. CD39 activity correlates with stage and inhibits platelet reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Translational Medicine*, v. 5, 2007.
- RAPS, M. et al. Resistance to APC and SHBG levels during use of a four-phasic oral contraceptive containing dienogest and estradiol valerate: A randomized controlled trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 11, n. 5, 2013.
- RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. **The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions**. *Platelets*, 2001.
- REZENDE, S. M. Distúrbios da Hemostasia: doenças hemorrágicas. *Rev Med Minas Gerais*, v. 20, n. 4, 2010.
- RIBEIRO, C. C. M. et al. **Effects of different hormonal contraceptives in women's blood pressure values**. *Revista brasileira de enfermagem*, 2018.
- RIVERA, R.; YACOBSON, I.; GRIMES, D. **The mechanism of action of hormonal contraceptives and intrauterine contraceptive devices**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. *Anais...*1999.

- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic signalling**, v. 2, p. 409-430, 2006.
- ROCHA, L. S. R. A. DA; VIEIRA, M. E. B.; DOMINATO, A. A. G. Trombose venosa cerebral e o uso de anticoncepcionais orais: Uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.
- ROSING, J.; TANS, G. **Effects of oral contraceptives on hemostasis and thrombosis. American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 1999.
- SALLES, I. I. et al. Inherited traits affecting platelet function. **Blood Reviews**, v. 22, n. 3, 2008.
- SAZE, Z. et al. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. **Blood**, v. 122, n. 1, 2013.
- SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007.
- SHOUBE, D.; MISHEL JR, D. **Current Clinical Practice: The Handbook of Contraception: A Guide for Practical Management**. New Jersey: [s.n.].
- SITRUK-WARE, R. **Hormonal contraception and thrombosis. Fertility and Sterility**, 2016.
- SOUSA, I. C. DE A. DE; ÁLVARES, A. DA C. M. A trombose venosa profunda como reação adversa do uso contínuo de anticoncepcionais orais. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 1, n. 7, p. 45-65, 2018.
- TCHAIKOVSKI, S. N. et al. Effect of oral contraceptives on thrombin generation measured via calibrated automated thrombography. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 98, n. 6, 2007.
- TOLDI, G. **The regulation of calcium homeostasis in T lymphocytes. Frontiers in Immunology**, 2013.
- TRUSSELL, J. **Contraceptive failure in the United States. Contraception**, 2011.
- VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 18, p. 5448-5456, 1976.
- VEIGA, A. G. M. et al. Tromboembolismo venoso. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 70, n. 10, p. 335-341, 2013.
- VIEIRA, C. S.; OLIVEIRA, L. C. O. DE; SÁ, M. F. S. DE. Hormônios femininos e hemostasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 10, 2007.
- VRBÍKOVÁ, J.; CIBULA, D. **Combined oral contraceptives in the treatment of polycystic ovary syndrome. Human Reproduction Update**, 2005.
- WANG, J.; MATOSEVIC, S. Adenosinergic signaling as a target for natural killer cell immunotherapy. **Journal of Molecular Medicine**, 2018.

WANG, Q. et al. Platelets enhance the ability of bone-marrow mesenchymal stem cells to promote cancer metastasis. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, 2018.

WANG, X.; CHEN, D. **Purinergic regulation of neutrophil function. *Frontiers in Immunology***, 2018.

WIEGRATZ, I.; KUHL, H. **Metabolic and clinical effects of progestogens. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care***, 2006.

YANG, D. et al. A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. ***Journal of Thrombosis and Haemostasis***, v. 8, n. 4, 2010.

YEGUTKIN, G. G. **Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research***, 2008.

YIP, L. et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X 7 receptors . ***The FASEB Journal***, v. 23, n. 6, 2009.

ZENG, J. et al. **Implications of CD39 in immune-related diseases. *International Immunopharmacology***, 2020.

ZHAO, Y. et al. Identification of Novel CD39 Inhibitors Based on Virtual Screening and Enzymatic Assays. ***Journal of Chemical Information and Modeling***, v. 62, n. 21, 2022.

ZIMMERMANN, H. **Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology***, 2000.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. ***Purinergic Signalling***, v. 8, n. 3, 2012.

CAPÍTULO II

Manuscrito I

THE IMPLICIT RISK OF ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVES: DISTURBANCE IN HEMOSTASIS AND THROMBOEMBOLIC EVENTS

**Bruna Pache Moreschi^{1,2}, Marina Trevizan Guerra³, Eduardo Benedetti Parisotto⁴,
Jeandre Augusto Otsubo Jaques^{1,2,5}**

1 Setor de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

2 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

3 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus de Três Lagoas (CPTL), Três Lagoas, 79613-000, Mato Grosso do Sul, Brazil.

4 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

5 Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

* Correspondence: J.A.S.J. jeandreaugusto@hotmail.com or jeandre.jaques@ufms.br.

ABSTRACT

Since 1950, the production of synthetic sex hormones has become one of the most popular contraceptive methods in the world, due to its feasibility of use and efficiency. A narrative review of the literature was carried out with the aim of evaluating a possible association between the use of oral hormonal contraceptives by women of reproductive age and the development of thromboembolic conditions. There is evidence that the use of these medications increases blood clotting factors (mainly factors VII, VIII, IX and X), in addition to decreasing and generating resistance to proteins that negatively regulate the coagulation cascade (proteins S and C). A state of hypercoagulability is created, which increases the risk of developing venous and cerebral thromboembolism and pulmonary embolism, worsened with third-generation oral contraceptives. Therefore, it is possible to state that oral contraceptives cause changes in hemostatic parameters related to thromboembolic events.

Keywords: Oral Contraceptives, Thrombosis, Hemostasis, Blood, Coagulation, Oral Hormonal Contraception.

1. INTRODUCTION

The production of synthetic female sex hormones with the aim of inhibiting ovulation in women began in the 1950's, and in 1960's it was approved the first contraceptive pill marketed in the United States. In the 1970's it was popularized. The first compositions had very high doses, which consequently caused serious adverse effects such as increased blood pressure and venous thrombosis. It led to a reformulation of these drugs, which in the 1980's presented lower doses of hormones, thus reducing their more serious adverse effects [1,2]. Hormonal contraception is still used as a way to treat hormonal imbalances such as dermatological problems (acne) and also in cases of colic [3] in the treatment of polycystic ovary syndrome [4,5], to standardize the menstrual cycle and treat menstrual disorders [6,7].

Contraceptive methods are categorized by different mechanisms to prevent ovulation, fertilization or implantation of embryo in uterine mucosa [1,8]. There is wide variation in composition and route of administration among hormonal contraceptives, in addition to drug pharmacokinetic and pharmacodynamic differences. Furthermore, the possibility of frequent exchanges between these contraceptive methods arouses curiosity of the scientific community regarding possible consequences on users [9].

In general, there are two types of oral contraceptive drugs: the non-combined ones, which are composed only of progestogens (mini-pills), and the combined ones, which have varied formulations associating estrogen with progestogens. The progestogen component has the main function of preventing ovulation, while estrogen has the main function of regularizing the menstrual cycle due to the stabilization of hormone dose [10].

Contraceptive pills are even classified by generations, correspondingly with the progestogen component and the dosage of the estrogenic component. First generation pills contain a high dose of estrogen (greater than or equal to 50 μg), usually ethinylestradiol (EE) [11] or mestranol, and norethynodrel, norethindrone or ethynediol diacetate as a progestogen

[10]. Second generation pills have a lower dose of estrogenic component compared to the first generation (from 50 to 35 µg) [10,11], and in these, EE is established as the main estrogenic component, along with levonorgestrel or norethisterone as progestogen components. The third-generation pills have gestodene, desogestrel [10] or norgestimate [11] as a progestogen component, which may or may not be associated with EE. Finally, there are more modern pills that contain drospirenone, nomegestrol acetate or dienogest as a progestogen component, associated or not with an estrogen [10]. There is still controversy regarding the existence of a fourth generation of pills. Considering that the hormone dosage needed to prevent ovulation must be constant, the progestogen component underwent changes only at level of chemical composition [10]

Combined oral hormonal contraceptives act similarly to hormones naturally produced by ovaries, and are used to prevent ovulation, and consequently also cause significant changes in cervical mucus and endometrium [1,8]. This method is considered very effective, with a failure rate of up to 0.3% of cases, which can reach 9% in habitual continuous use [12,13]. However, the effectiveness of a method depends on its correct use and may have its action interrupted by drug interaction due to the use of other drugs [2].

Desirable or adverse effects of oral hormonal contraceptives depend on their composition and dose. Regarding estrogen, its excessive dose can cause dysmenorrhea, high menstrual flow, breast tenderness, breast enlargement, weight gain, nausea and vomiting, suppression of lactation, headaches, chloasma, irritability and decreased libido, while its deficit can cause a decrease in menstrual flow and spotting. Progestogen in high doses can cause effects on the skin, such as acne or excessive oil production by sebaceous glands, irritability, short menstruation, nervousness and cholestatic jaundice. The progestogen deficit, in turn, can result in prolonged bleeding, spotting, increased menstrual flow, dysmenorrhea and delay in the onset of the menstrual cycle [14].

It is possible to find in the literature a substantial volume of research demonstrating relationship between use of oral contraceptives and thromboembolic diseases [9,10,15–26]. The objective of this manuscript was to carry out a narrative review exploring possible effects of oral hormonal contraceptives of different generations on hemostasis and, consequently, on thromboembolic conditions in users of reproductive age.

2. HEMOSTATIC SYSTEM

2.1. Oral hormonal contraceptives and the hemostatic system

Hemostasis is a set of mechanisms responsible for maintaining blood flow inside vessels, preventing thrombotic and hemorrhagic events [27]. Its operation is dependent on several factors that are responsible for keeping the blood in its fluid state, within the network of blood vessels that form the cardiovascular system. Hemostatic system is formed by blood vessels, endothelial cells, platelets, von Willebrand factor, coagulation factors, anticoagulant factors and fibrinolytic system [28]. For hemostasis to be established, is important to maintain the integrity of blood vessels, presence of procoagulant plasma proteins, anticoagulants and fibrinolytic system, even if platelets are in ideal numbers and able to perform their function. An efficient platelet aggregation in response to vascular damage is part of hemostasis, where coagulation promotes blood loss interruption, and fibrinolysis removes fibrin formed in excess, causing blood to flow again in the vessel, in a dynamic equilibrium [29].

Relationship between use of oral contraceptives and cardiovascular disease has been discussed for a while and, possibly, the existence of estrogen and progesterone receptors in blood vessels is related to these events [30]. This fact associates these drugs with a higher risk of developing diseases of the circulatory system [16]. The use of hormonal contraceptives can increase the risk of developing thrombosis by up to 4-fold. However, it is still estimated that 7 out of 10.000 women per year develop the condition due to hormonal contraceptives [31,32].

2.2. Thromboembolic conditions

Coagulation is an important mechanism for maintaining blood vessel integrity. It is performed by a group of plasma proteins that, in a cascade, convert plasma fibrinogen molecules into fibrin, thus forming the thrombus. Coagulation cascade can occur by the intrinsic

pathway, initiated by elements already present in blood; and by the extrinsic pathway, which starts due to tissue injury [33].

The intrinsic coagulation cascade (Fig. 1) occurs when there is no endothelial lesion. Pre-kallikrein is converted into kallikrein by factor XIIa, promoting cascade activation of factors XII, XI and IX in presence of high molecular weight kininogen (HK). In cascade, factor XI is activated by factor XIIa and converted into XIa. Factor XIa activates more factor IX, and in calcium ion presence and factor XIIIa on the surface of platelets, the activation of factor X into factor Xa occurs [33,34].

The extrinsic coagulation cascade takes place when blood extravasation occurs due to endothelial injury, which causes contact between collagen present in connective tissue of subendothelial layer of vessel wall with plasma proteins in blood. There is also activation of tissue factor or tissue thromboplastin (factor III), present in extravascular tissues. Factor VII is activated by factor III in calcium presence, promoting activation of factor X into Xa. The conversion of factor X into Xa is the intersection between pathways, thus initiating the common pathway. Factor Xa, adhering to platelets and in ionized calcium presence and factor Va, converts factor II into IIa (thrombin). Factor IIa converts factor I into Ia (fibrin) and converts factor XIII into XIIIa, also activating platelets. Factor XIIIa provides stability to connections between fibrins [33–35].

The thrombotic condition consists in the thrombus formation due to exacerbated coagulation process, within blood vessels, which causes its whole or partial occlusion. This condition can cause swelling, pain and muscle stiffness, in addition to raising local temperature. Although it can happen in any region of the body, they are more common in the lower limbs [36–38]. The condition of deep vein thrombosis (DVT) occurs when the thrombi formed in circulatory system reach deep venous system [39]. Even with treatment, 50% of patients with proximal DVT and 30% of patients with distal DVT develop post-thrombotic syndrome, and

pulmonary embolism may also occur in about 5% of these patients [40]. In general, use of combined contraceptives is considered a risk factor associated with thrombosis, in addition to other factors such as hereditary thrombophilias, pregnancy or puerperium, primary antiphospholipid syndrome and para-meningeal infections [41].

DVT associated with pulmonary embolism is called venous thromboembolism (VTE), which occurs when the thrombus detaches from the blood vessel wall, and circulates throughout body until it lodges in the lung [40]. The suspicion of pulmonary embolism due to oral contraceptives was initially related to the progestogen, more specifically to cyproterone acetate [42].

Thrombosis can also occur in cerebral veins, characterizing cerebral venous thrombosis (CVT), being predominant in women (about 75% of cases) [43]. Brain thrombosis is a rare condition, intensified by impairment of cerebral venous drainage due to intracranial pressure, which can often be fatal [26]. The use of hormonal contraceptives represents an aggravation in development of CVT. The third-generation progestogens show a 2- to 3-fold increased risk in the development of CVT, when compared to the second-generation [22,44]. Recently reported cases describe CVT caused by a decrease in anticoagulant function, represented by a decrease in tissue plasminogen activator (t-PA). t-PA is a factor responsible for the conversion of plasminogen into plasmin, which binds to integrated fibrin promoting its degradation, and consequently affecting the fibrinolytic function [45]. Among CVT conditions, dural sinus thrombosis is one of the most commonly associated with oral hormonal contraceptives, with a 7- to 8-fold increased risk for users [46].

The development of clots can occur asymptotically and temporarily [40] in transitory periods such as hospitalizations and postoperative periods, hereditary thrombophilia or even associated with risk factors such as age, smoking and obesity [43]. These are conditions that can promote an intravascular hypercoagulable state, and for the fibrin clot to be dissolved, a

series of fibrinolytic factors are necessary. Through the mediation of t-PA, which is released by endothelial cells that have been disturbed due to the vessel injury, plasminogen is converted into plasmin, which binds to integrated fibrin, resulting in its degradation and the formation of fibrin degradation products (FDPs). Plasmin can be inactivated by α 1-antiplasmin or by α 2-macroglobulin [47]. Coagulation system also undergoes anticoagulant regulation, so that there is delimitation of reactions, avoiding exacerbated coagulation. This regulation is carried out by other thrombolytic substances that act on dissolution of clots, namely tissue factor pathway inhibitor (TFPI), antithrombin, protein C (PC), protein S (PS) and plasmin [33,34].

3. ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVES AND THROMBOEMBOLIC EVENTS

3.1. Conventional progestogens associated with thromboembolic conditions

Progestogens are reported as a component to balance thrombotic effects promoted by estrogen, mainly in relation to synthesis of hepatic proteins, or in the inactivation of activated protein C (APC) caused by estrogen [48,49]. Effects caused by EE on hemostasis can be attenuated or accentuated by the progestogen in the composition. Then, different formulations of combined contraceptives may have different results, favoring coagulant or fibrinolytic activity in different ways [50].

Reviews and experimental studies demonstrate that the composition of third-generation progestogens is more related with development of VTE compared to second-generation progestogens [22,26,27,51,52]. One of the mechanisms related to the increased risk of VTE is linked to use of drospirenone, which has the effect of increase the resistance to APC [53], in addition to a decrease the PS activity [18].

Decreased plasma sensitivity to APC is associated with the use of combined hormonal contraceptives. APC, in presence of cofactor PS, prevents coagulation cascade by inhibiting coagulation factors V and VIII, so the effect of thrombin is negatively regulated [54,55].

There is evidence that oral contraceptives induce an increase in plasminogen, t-PA, in addition to plasmin-antiplasmin complexes and fibrin degradation products, with an antithrombotic effect, although this is not associated with fibrinolysis activity [18,56]. It is also confirmed that contraceptives that take levonorgestrel or desogestrel as a progestogen increase levels of prothrombin fragment 1+2, a marker of thrombin formation [18,57,58].

Comparisons between generations of progestogens show that third generation is more related to an increase in factor VII levels, compared to changes promoted by second generation, in the absence of estrogens [18,52,57–59]. In the presence of EE, third-generation progestogens are less effective in neutralizing the prothrombotic effect [52]. Although factor VII does not

have a clear relationship with the condition of VTE, it is a marker for acute myocardial infarction [60]. The effect of different generations of progestogens on factor VII levels may be related to coagulation by the extrinsic pathway, showing a greater risk of developing VTE [52]. Third-generation progestogens, when compared to second-generation ones, have a more pronounced effect in reducing factor V. This factor has anticoagulant properties, as it is a cofactor of activated PC, which participates in the inactivation of factor VIIIa [52,57].

The oral progestins gestodene and desogestrel (third generation) have a higher risk to the development of VTE when compared to levonorgestrel (second generation) [48]. As a result, combined contraceptives containing levonorgestrel, a second-generation progestogen, are considered more suitable for users with risk factors and history of thromboembolic diseases [61].

It is known that platelet function may increase with use of contraceptives with higher antiandrogenic effect, usually those containing second-generation progestogens. This fact corroborates indication that effects of oral contraceptives on platelet function are dictated by progestogen component [62].

3.2 Conventional estrogens associated with thromboembolic conditions

Since the first oral contraceptives, estrogen has been considered the main component responsible for their thromboembolic events [40]. The association of thrombosis with the use of contraceptives is mainly linked to the use of EE, an estrogen that has an increase on a series of procoagulant factors, as like thrombin [63], factors VII, VIII, X, XI, XII [64] and XIII [65] and fibrinogen [66]. Furthermore, EE can decrease anticoagulant factors such as PS and antithrombin, which causes an even higher prothrombotic effect [18,65].

The role of EE in reducing natural coagulation inhibitors has also been described. The EE can cause a lower activation of CP, which generates an acquired resistance. Conversely,

there are evidences that contraceptives can cause a slight increase in CP activity and concentration. However, this increase is suppressed by inducing the inhibitors α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin, along with the decrease in PS cofactor [18,53,67,68]. PS has vitamin K-dependent anticoagulant activity, being inhibited by the coagulation factors VIIa and Va, [69]. Antithrombin, a primary inhibitor of thrombin and factors IIa, IXa, Xa, XIa and XIIa, prevents association of factor VIIa with tissue factor (TF), and its levels are also reduced by contraceptives [70].

EE can also increase the fibrinolytic activity of blood plasma. There are evidences that EE induces an increase in both plasminogen and tissue plasminogen activator (tPA), in addition to plasmin-antiplasmin complexes and fibrin degradation products, with antithrombotic effect, although it is not associated with fibrinolysis activity [53,56,68]. All the procoagulant effects associated with EE may be associated with its strong estrogenic effect caused by EE on liver and endothelial-vascular function, which may be the basis for the increased risk of developing thromboembolic conditions associated with this estrogen [23].

The pro-coagulant action of EE motivated research into the development of new synthetic estrogens, thus developing estradiol valerate (E2V) and 17- β estradiol (17 β -E2), using estradiol (natural estrogen) in their composition instead of EE [20,71]. Some studies suggest that these formulations carry the same risk of developing VTE as EE, causing changes in the same hemostatic parameters observed by traditional estrogen [17,68,72]. However, other studies indicate that compared to EE and associated with a current progestogen, impacts on hemostatic parameters are significantly smaller than those caused by conventional EE [20].

Another estrogen with a new composition is the synthetic sterol (E4), which has already shown reduced effects on hemostasis patterns [23]. Although there is evidence of a relationship with increased plasminogen and prothrombin fragment 1 + 2 [18], it still represents a very weak impact on fibrinolysis markers. The minimal interference of this estrogen in most hemostatic

parameters is mainly related to its lower action in the liver, where the synthesis of coagulation factors and anticoagulants occurs [18,73].

3.3 New formulations

Oral hormonal contraceptives alter hemostatic parameters due to their effects on clotting factors of coagulation cascade, on fibrinolytic system and on anticoagulant factors that promote regulation of the cascade. At the end of 1990's, it was believed that the agent responsible for increased thrombotic risk in combined contraceptives was the estrogen and not the progestogen. However, studies have shown a significant increase in incidence of thrombosis in users of contraceptives combined with low doses of estrogen and third-generation progestogens [18,52,57,58]. Such incidence was associated with estrogen effects, accentuated by low antiandrogenic effect of third-generation progestogens [40]. It corroborates that users of third-generation oral contraceptives are twice as likely to develop a thromboembolic condition compared to users of second-generation oral contraceptives [40,74]. It is currently argued that hemostatic changes caused by hormonal contraceptives can cause synergistic or antagonistic effects, which may affect both fibrinolysis and pathways of anticoagulant agents [75].

Combined oral contraceptives, containing EE associated with a progestogen, represent lower risks of developing a thromboembolic condition when compared to contraceptives composed only of progesterone. Progesterones have antiandrogenic effect, and pills containing EE associated with a progestogen such as levonorgestrel, with a greater antiandrogenic effect, are able to neutralize the stimulation caused by EE in hepatic proteins due to their liver metabolism. Thus, changes in procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic activities caused by estrogen are reduced. However, less antiandrogenic progestogens, such as drospirenone and desogestrel, promote an opposite action on the EE effect, thus resulting in an increased risk of developing VTE [58,68].

Regarding new formulations with alternative estrogens, there are few analyses available so far regarding interaction with progestogens compared to EE. There are evidences of a lower risk of developing VTE by users of oral contraceptives with E2V in formulation compared to EE [17,19]. A less pronounced effect on blood clotting was found in an association of 17 β -E2 with norgestrel acetate (NOMAC) as progestogen, in addition to stability in the other fibrinolysis parameters, when compared to EE associated with levonorgestrel, thus allowing to hypothesize that this new formulation show a lower risk of developing thromboembolic conditions [20,71]. An association of E4 with drospirenone also did not show any alteration on parameters of coagulation factors and anticoagulants, even at different concentrations [23,25], thus indicating that alternative estrogens might represent a good contraception approach to avoid thromboembolic events.

Comparative studies of second- and third-generation progestagen formulations emphasize differences in hemostasis parameters, consequently influencing the risk of developing VTE, when estrogenic component is EE [22,23,52]. However, studies that compare estrogen formulations point to low interference in hemostatic parameters related to new formulations. Including the second- and third-generation progestogens, thus indicating that estrogen is the main agent responsible for the procoagulant effect of oral contraceptives [18].

3.4 Factors associated with the development of VTE and oral hormonal contraceptives

Oral hormonal contraceptives are associated with the risk of developing VTE by inducing several changes in hemostatic parameters (Table 1), which can be increased in case of congenital and acquired predispositions [27]. Thromboembolic development conditions are often associated with hereditary thrombophilias. However, there are other risk factors such as age, obesity, and smoking that are related to development of VTE, as well as chronic and acute conditions such as limb immobilization, surgeries, and hospitalizations. However, the main etiopathogenic factors for the development of VTE are blood stasis and hypercoagulability [43].

Familial genetics is an important factor associated with development of VTE, accounting for 35 to 60% of cases, arising because of hemostatic imbalance between coagulant and anticoagulant proteins [76].

Table 1. Relationship between progestogen and estrogenic contraceptives and their effects on hemostatic coagulation, anticoagulant and fibrinolytic cascades.

Contraceptives	Reference	Hemostatic cascade effects
EE	[64,77]	Increased factors XII and XI (intrinsic coagulation cascade)
	[77]	Increased factors X and XIII (common coagulation cascade)
	[65,66]	Increased fibrinogen (common coagulation cascade)
	[18]	Increased plasminogen (fibrinolytic system)
	[53,56,68]	Increased t-PA (fibrinolytic system)
	[18,53,67,68]	Increased α 1-antiplasmin and α 2-macroglobulin (fibrinolytic system)
	[18,27,68]	Decreased protein C activity (negative regulation of coagulation cascade)
EE + third-generation progestogens	[18,52,56–58]	Increased factor VII (extrinsic coagulation cascade)
	[52,57]	Increased factor V (common coagulation cascade)
E4	[18,73]	Increased plasminogen (fibrinolytic system)

EE: Ethinylestradiol; E4: Esterol; APC: Active protein C.

In general, investigation for genetic thrombophilia in routine exams is not recommended only for the purpose of hormonal contraceptives prescription. However, users who have cases of thromboembolism due to family history before age of 45 need to be informed of the risk of hormonal contraceptive methods, and initially only progestogens are recommended [78].

4. CONCLUSIONS

The advent of contraception was part of numerous changes in women's lives that occurred in recent decades, enabling family planning and female sexual freedom. However, these drugs have serious adverse effects in short and long term that, when not followed up, can bring harmful consequences for health.

The compounds present in oral hormonal contraceptives are related to changes in proteins that promote blood clotting, both by increasing clotting factors and by decreasing anticoagulant factors, which can induce a hypercoagulable state in blood and consequently cause thromboembolic events in users of these drugs.

The studies cited in this review were essential for improving the medical practice in prescribing oral hormonal contraceptives. Variables such as generation and compound used, time of use and factors such as family history, age and genetic predisposition might influence a state of blood hypercoagulability. Women who have a thrombophilic condition should avoid contraceptives with third-generation progestogens, considering changes in hemostatic parameters promoted by them, causing a more intense hypercoagulable state.

More recent estrogen formulations such as sterol and new estradiol derivatives show milder changes in hemostatic parameters, presenting a significantly lower risk for developing VTE, combined with both second and third generation progestogens. This fact reinforces that the main component involved in the development of thromboembolic conditions is estrogen.

REFERENCES

- [1] Burrows LJ, Basha M, Goldstein AT. The Effects of Hormonal Contraceptives on Female Sexuality: A Review. *Journal of Sexual Medicine* 2012;9. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2012.02848.x>.
- [2] Dhont M. History of oral contraception. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care* 2010;15. <https://doi.org/10.3109/13625187.2010.513071>.
- [3] Gupta DR, Prabhakar B, Wairkar S. Non-oral routes, novel formulations and devices of contraceptives: An update. *Journal of Controlled Release* 2022;345. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.057>.
- [4] Al Khalifah RA, Florez ID, Zoratti MJ, Dennis B, Thabane L, Bassilious E. Efficacy of Treatments for Polycystic Ovarian Syndrome Management in Adolescents. *J Endocr Soc* 2021;5. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa155>.
- [5] Vrbíková J, Cibula D. Combined oral contraceptives in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2005;11. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi005>.
- [6] Gompel A. Progesterone, progestins and the endometrium in perimenopause and in menopausal hormone therapy. *Climacteric* 2018;21. <https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1446932>.
- [7] Jewson M, Purohit P, Lumsden MA. Progesterone and abnormal uterine bleeding/menstrual disorders. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2020;69. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.05.004>.
- [8] Rivera R, Yacobson I, Grimes D. The mechanism of action of hormonal contraceptives and intrauterine contraceptive devices. *Am J Obstet Gynecol*, vol. 181, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(99\)70120-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(99)70120-1).
- [9] Achilles SL, Meyn LA, Mhlanga FG, Matubu AT, Stoner KA, Beamer MA, et al. Zim CHIC: A cohort study of immune changes in the female genital tract associated with initiation and use of contraceptives. *American Journal of Reproductive Immunology* 2020;84. <https://doi.org/10.1111/aji.13287>.
- [10] Golobof A, Kiley J. The Current Status of Oral Contraceptives: Progress and Recent Innovations. *Semin Reprod Med* 2016;34. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1572546>.
- [11] Creinin MD, Jensen JT. Oral contraceptive generations – Time to stop using a marketing myth to define nomenclature. *Contraception* 2020;102. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2020.05.017>.
- [12] Dragoman M V. The combined oral contraceptive pill- recent developments, risks and benefits. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014;28. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.06.003>.
- [13] Trussell J. Contraceptive failure in the United States. *Contraception* 2011;83. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2011.01.021>.
- [14] Shoupe D, Mishel Jr D. *Courrent Clinical Practice: The Handbook of Contraception: A Guide for Pratical Management*. New Jersey: 2006.
- [15] AlSheef M, Abuzied Y, Alzahrani GR, AlAraj N, AlAqeel N, Aljishi H, et al. Combined Oral Contraceptives and Vascular Thrombosis: A Single-Center Experience. *Cureus* 2022. <https://doi.org/10.7759/cureus.25865>.

- [16] Brito MB, Nobre F, Vieira CS. Contraceção hormonal e sistema cardiovascular TT - Hormonal contraception and cardiovascular system TT - Contracepción hormonal y sistema cardiovascular. *Arq Bras Cardiol* 2011;96.
- [17] Dinger J, Do Minh T, Heinemann K. Impact of estrogen type on cardiovascular safety of combined oral contraceptives. *Contraception* 2016;94. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2016.06.010>.
- [18] Douxfils J, Klipping C, Duijkers I, Kinet V, Mawet M, Maillard C, et al. Evaluation of the effect of a new oral contraceptive containing estetrol and drospirenone on hemostasis parameters. *Contraception* 2020;102. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2020.08.015>.
- [19] Fruzzetti F, Cagnacci A. Venous thrombosis and hormonal contraception: what's new with estradiol-based hormonal contraceptives? *Open Access J Contracept* 2018;Volume 9. <https://doi.org/10.2147/oajc.s179673>.
- [20] Gaussem P, Alhenc-Gelas M, Thomas JL, Bachelot-Loza C, Remones V, Ali FD, et al. Haemostatic effects of a new combined oral contraceptive, nomegestrol acetate/17 β -estradiol, compared with those of levonorgestrel/ethinyl estradiol: A double-blind, randomised study. *Thromb Haemost* 2011;105. <https://doi.org/10.1160/TH10-05-0327>.
- [21] Holler JT, Halvorson RT, Salesky M, Ma CB, Feeley BT, Leavitt AD, et al. Incidence of Venous Thromboembolism After Hip Arthroscopy Is Low With or Without Prophylaxis but Risk Factors Include Oral Contraceptive Use, Obesity, and Malignancy. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2023;39. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2022.10.029>.
- [22] Jick SS, Hernandez RK. Risk of non-fatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives containing drospirenone compared with women using oral contraceptives containing levonorgestrel: Case-control study using United States claims data. *BMJ* 2011;342. <https://doi.org/10.1136/bmj.d2151>.
- [23] Kluff C, Zimmerman Y, Mawet M, Klipping C, Duijkers IJM, Neuteboom J, et al. Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. *Contraception* 2017;95. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2016.08.018>.
- [24] Morimont L, Jost M, Gaspard U, Foidart JM, Dogné JM, Douxfils J. Low Thrombin Generation in Users of a Contraceptive Containing Estetrol and Drospirenone. *J Clin Endocrinol Metab* 2022;108. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac511>.
- [25] Regidor PA, Colli E, Schindler AE. Drospirenone as estrogen-free pill and hemostasis: coagulatory study results comparing a novel 4 mg formulation in a 24 + 4 cycle with desogestrel 75 μ g per day. *Gynecological Endocrinology* 2016;32. <https://doi.org/10.3109/09513590.2016.1161743>.
- [26] Rocha LSRA da, Vieira MEB, Dominato AAG. Trombose venosa cerebral e o uso de anticoncepcionais orais: Uma revisão integrativa. *Research, Society and Development* 2021;10. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17428>.
- [27] Rosing J, Tans G. Effects of oral contraceptives on hemostasis and thrombosis. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(99\)70699-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70699-x).
- [28] Vieira CS, Oliveira LCO de, Sá MFS de. Hormônios femininos e hemostasia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2007;29. <https://doi.org/10.1590/s0100-72032007001000008>.

- [29] Cagnolati D, Sankarankutty AK, Rocha JPS, Beer A, Silva OC e. Hemostasia e distúrbios da coagulação. https://sites.usp.br/dcdrp/wp-content/uploads/sites/273/2017/05/hemostasia_revisado.pdf . Accessed March 23, 2023.
- [30] Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 2006;147. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0729>.
- [31] Heit JA, Spencer FA, White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2016;41. <https://doi.org/10.1007/s11239-015-1311-6>.
- [32] Sitruk-Ware R. Hormonal contraception and thrombosis. *Fertil Steril* 2016;106. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.039>.
- [33] Melo R, Silva CO, Silva de O, Melo MMVA, Lins EM. Trombose Venosa Profunda. *Int J Dent* 2006;2:73–9.
- [34] Guerra CCC, Rosenfeld LGM. Fisiologia da Coagulação. *Mafei FHA Doenças Vasculares Periféricas* 2002;3:233–8.
- [35] Franco RF. Fisiologia da cogulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina (Ribeirao Preto Online)* 2001;34. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v34i3/4p229-237>.
- [36] Baruzzi AC do A, Nussbacher A, Lagudis S, Souza JAM. Trombose Venosa Profunda. *Profilaxia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 1996;67.
- [37] Sousa IC de A de, Álvares A da CM. A trombose venosa profunda como reação adversa do uso contínuo de anticoncepcionais orais. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires* 2018;1:45–65.
- [38] Veiga AGM, SantosIAT, Passeri CR, Papini SJ. Tromboembolismo venoso. *Rev Bras Med* 2013;70:335–41.
- [39] Padovan T, Freitas G. Anticoncepcional oral associado ao risco de trombose venosa profunda. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research* 2015;9:73–7.
- [40] Belicová M, Lukáč B, Dvorský J, Peter G, Mokáň M, Kubisz P. Thromboembolic disease and present oral contraception. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2003;9. <https://doi.org/10.1177/107602960300900106>.
- [41] Camargo ÉCS DE, Bacheschi LA. Trombose venosa cerebral: como identificá-la? *Rev Assoc Med Bras* 2001;47. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302001000400011>.
- [42] Girolami A, Prandoni P, Zanardi A, Girolami B, Zanon E. Isolated iliac vein thrombosis during oral contraceptive therapy in three “normal” women. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 1997;3. <https://doi.org/10.1177/107602969700300410>.
- [43] Callai T, Daronco F, Konrad NL, Wichmann JF, Costa F, Prezzi SH. Tabagismo e uso de anticoncepcionais orais relacionados a fenômenos tromboembólicos: relato de caso e revisão de literatura. *Reproducao e Climaterio* 2017;32. <https://doi.org/10.1016/j.recli.2016.11.004>.
- [44] Parkin L, Sharples K, Hernandez RK, Jick SS. Risk of venous thromboembolism in users of oral contraceptives containing drospirenone or levonorgestrel: Nested case-control study based on UK General Practice Research Database. *BMJ* 2011;342. <https://doi.org/10.1136/bmj.d2139>.

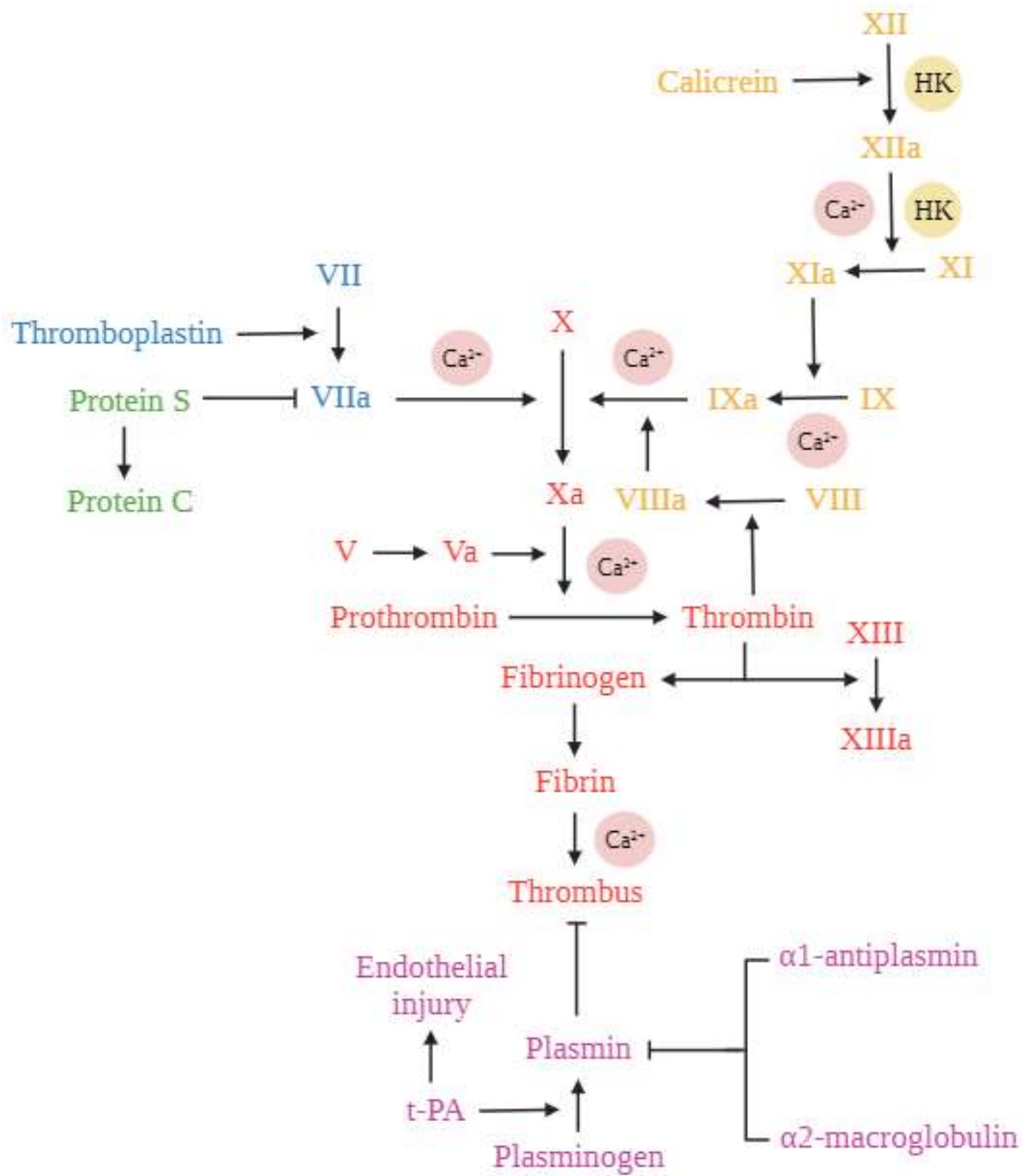
- [45] Saadat P, Mohseni-Ahangar R. Oral contraceptive-related transverse sinus thrombosis as an initial manifestation of antiphospholipid syndrome in the absence of systemic lupus erythematosus. *Caspian J Intern Med* 2017;8.
- [46] Ibrahim NMA, El-Shahawy A-SZ, Elshabacy A. Risco de trombose venosa cerebral em usuárias de pílulas anticoncepcionais orais. *O Jornal Egípcio de Radiologia e Medicina Nuclear* 2018;49:727–31.
- [47] Lima ACS, Martins LCG, Lopes MV de O, Araújo TL de, Lima FET, Aquino P de S, et al. Influence of hormonal contraceptives and the occurrence of stroke: integrative review. *Rev Bras Enferm* 2017;70. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2016-0056>.
- [48] Martínez F, Ramirez I, Pérez-Campos E, Latorre K, Lete I. Venous and pulmonary thromboembolism and combined hormonal contraceptives. Systematic review and meta-analysis. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care* 2012;17. <https://doi.org/10.3109/13625187.2011.643836>.
- [49] Tans G, Van Hylckama Vlieg A, Thomassen MCLGD, Curvers J, Bertina RM, Rosing J, et al. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women. *Br J Haematol* 2003;122. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04443.x>.
- [50] Kuhl H. Effects of progestogens on haemostasis. *Maturitas* 1996;24. [https://doi.org/10.1016/0378-5122\(96\)00994-2](https://doi.org/10.1016/0378-5122(96)00994-2).
- [51] Albricker ACL, Freire CMV, Dos Santos SN, De Alcantara ML, Saleh MH, Cantisano AL, et al. Joint Guideline on Venous Thromboembolism, 2022. *Arq Bras Cardiol* 2022;118. <https://doi.org/10.36660/abc.20220213>.
- [52] Kemmeren JM, Algra A, Meijers JCM, Bouma BN, Grobbee DE. Effects of second and third generation oral contraceptives and their respective progestagens on the coagulation system in the absence or presence of the factor V Leiden mutation. *Thromb Haemost* 2002;87. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1612973>.
- [53] Tchaikovski SN, van Vliet HAAM, Thomassen MCLGD, Bertina RM, Rosendaal FR, Sandset PM, et al. Effect of oral contraceptives on thrombin generation measured via calibrated automated thrombography. *Thromb Haemost* 2007;98. <https://doi.org/10.1160/TH07-07-0439>.
- [54] Dielis AWJH, Castoldi E, Spronk HMH, Van Oerle R, Hamulyák K, Ten Cate H, et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008;6. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02824.x>.
- [55] Mohamed ABO, Kelchtermans H, Konings J, Van Daal J, Marzouki A Al, Harakeh S, et al. The effects of oral contraceptive usage on thrombin generation and activated protein C resistance in Saudi women, with a possible impact of the body mass index. *PLoS One* 2018;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206376>.
- [56] Kluff C, Lansink M. Effect of oral contraceptives on haemostasis variables. *Thromb Haemost*, vol. 78, 1997. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1657546>.
- [57] Middeldorp S. Thrombosis in women: What are the knowledge gaps in 2013? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2013;11. <https://doi.org/10.1111/jth.12266>.

- [58] Wiegratz I, Kuhl H. Metabolic and clinical effects of progestogens. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care* 2006;11. <https://doi.org/10.1080/13625180600772741>.
- [59] Kluff C. Effects on Haemostasis Variables by Second and Third Generation Combined Oral Contraceptives A Review of Directly Comparative Studies. *Curr Med Chem* 2012;7. <https://doi.org/10.2174/0929867003374994>.
- [60] Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, Van der Velden PA, Briet E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1994;71. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1642511>.
- [61] Blondon M. Update On Oral Contraception And Venous Thromboembolism. *Hemasphere* 2020;4:1–3.
- [62] Roell A, Schueller P, Schultz A, Losel R, Wehling M, Christ M, et al. Effect of oral contraceptives and ovarian cycle on platelet function. *Platelets* 2007;18. <https://doi.org/10.1080/09537100600936224>.
- [63] Zia A, Callaghan MU, Callaghan JH, Sawni A, Bartlett H, Backos A, et al. Hypercoagulability in adolescent girls on oral contraceptives-global coagulation profile and estrogen receptor polymorphisms. *Am J Hematol* 2015;90. <https://doi.org/10.1002/ajh.24064>.
- [64] Citarella F, Misiti S, Felici A, Farsetti A, Pontecorvi A, Fantoni A. Estrogen induction and contact phase activation of human factor XII. *Steroids*, vol. 61, 1996. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(96\)00037-2](https://doi.org/10.1016/0039-128X(96)00037-2).
- [65] Farris M, Bastianelli C, Rosato E, Brosens I, Benagiano G. Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives: 2. effects on hemostasis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2017;10. <https://doi.org/10.1080/17512433.2017.1356718>.
- [66] Stocco B, Fumagalli HF, Franceschini SA, Martinez EZ, Marzocchi-Machado CM, De Sá MFS, et al. Comparative study of the effects of combined oral contraceptives in hemostatic variables: An observational preliminary study. *Medicine (United States)* 2015;94. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000385>.
- [67] Horne CHW, Mallinson AC, Ferguson J, Goudie RB. Effects of oestrogen and progestogen on serum levels of 2-macroglobulin, transferrin, albumin, and IgG. *J Clin Pathol* 1971;24. <https://doi.org/10.1136/jcp.24.5.464>.
- [68] Khialani D, Rosendaal F, Vlieg AVH. Hormonal Contraceptives and the Risk of Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2020;46. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715793>.
- [69] Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol* 2008;15. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328309ec97>.
- [70] Mazhar N, Khanum A, Archad S, Fatima J, Farhans S, Malik NA, et al. Effect of Hormonal Contraceptives on Fibrinogen and Plasma Antithrombin. *Contraception* 2021;4:1.
- [71] Ågren UM, Anttila M, Mäenpää-Liukko K, Rantala ML, Rautiainen H, Sommer WF, et al. Effects of a monophasic combined oral contraceptive containing nomegestrol acetate and 17 β -oestradiol compared with one containing levonorgestrel and ethinylestradiol on haemostasis, lipids and carbohydrate metabolism. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care*, vol. 16, 2011. <https://doi.org/10.3109/13625187.2011.604450>.

- [72] Raps M, Rosendaal F, Ballieux B, Rosing J, Thomassen S, Helmerhorst F, et al. Resistance to APC and SHBG levels during use of a four-phasic oral contraceptive containing dienogest and estradiol valerate: A randomized controlled trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2013;11. <https://doi.org/10.1111/jth.12172>.
- [73] Abot A, Fontaine C, Buscato M, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, et al. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor α modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol Med* 2014;6. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404112>.
- [74] Cohen MA, Edelman A, Paynter R, Henderson JT. Risk of thromboembolism in patients with COVID-19 who are using hormonal contraception. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2023;2023. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD014908.pub2>.
- [75] Gialeraki A, Valsami S, Pittaras T, Panayiotakopoulos G, Politou M. Oral Contraceptives and HRT Risk of Thrombosis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2018;24. <https://doi.org/10.1177/1076029616683802>.
- [76] Ten Kate MK, Van Der Meer J. Protein S deficiency: A clinical perspective. *Haemophilia* 2008;14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01775.x>.
- [77] Farris M, Bastianelli C, Rosato E, Brosens I, Benagiano G. Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives: 2. effects on hemostasis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2017;10:29–44.
- [78] Doyle NM, Monga M. Thromboembolic disease in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2020;31:319–44.

FIGURE

Figure 1



CAPÍTULO III

Manuscrito II

USE OF ORAL COMBINED CONTRACEPTIVES ALTERS ECTONUCLEOTIDASES AND ECTO ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY IN IMMUNE CELLS OF USERS

**Bruna Pache Moreschi^{1,2}, Romário da Silva Portilho^{1,2}, Andreza Negreli Santos^{1,3}, Igor
Leal Brito^{1,3}, Jeandre Augusto Otsubo Jaques^{1,2,3}**

1 Setor de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

2 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

3 Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

* Correspondence: J.A.O.J. jeandreaugusto@hotmail.com or jeandre.jaques@ufms.br.

Abstract

Hormonal contraceptives, which became one of the contraceptive methods with greater adherence, is associated with the development of thromboembolism. Purinergic mediators such as the soluble agonists, enzymes and receptors play a prominent role in regulating hemostasis. The objective of this study was to evaluate the activity of E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA in blood cells of women using combined oral contraceptives. Participants used third-generation combined oral contraceptives (G3), such as drospirenone or cyproterone acetate, or fourth-generation contraceptives (G4), including gestodene or desogestrel, both associated with ethinyl estradiol. Our findings indicate decreased ADO deamination in lymphocytes from G3 (66,5%; $p < 0.01$), and decreased AMP hydrolysis (69%; $p < 0.05$) and ADO deamination (65%; $p < 0.01$) in platelets from G3, compared to control. We also observed increased ADP hydrolysis (216%; $p < 0.01$) and decreased ADO deamination (50,7%; $p < 0.05$) in lymphocytes, and decreased ATP hydrolysis (34%; $p < 0.01$) and ADO deamination (63%; $p < 0.01$) in platelets from G4, compared to control. The observed AMP hydrolysis is compatible with the establishment of an ADO-poor vascular microenvironment. Analyzed together with E-5'-NT, the decrease in E-ADA activity may be associated with a lower concentration of ADO in the microenvironment, which has antiplatelet and anti-inflammatory effects. Our dataset shows that hormonal contraceptives alter the activity of purinergic system ectoenzymes, which might be related with their effects in hemostasis and predisposition of thromboembolic events.

Keywords - Ectonucleotidases; E-NTPDase; E-5'-nucleotidase; E-ADA; Combined oral contraceptives.

Introduction

Synthetic female hormones with the aim of inhibiting ovulation began in the 1950s [1]. The first hormonal contraceptive formulas had very high doses of hormones, which consequently caused serious adverse effects in users, such as increased blood pressure and venous thrombosis. This fact led to a reformulation, in the 1980s, of these medications, which now have much lower doses of hormones, thus reducing their adverse effects [2]. Combined hormonal contraceptives, composed of the association of a progesterone with an estrogen, are one of the best-known contraceptive methods due to their practicality of use, efficacy and safety (Almeida & Assis, 2017).

These medications are composed of the association of an estrogenic component, usually ethinylestradiol (EE), and a progestin component [4] and, according to the progestin, combined oral contraceptives are classified by generations [5]. It is known that combined oral contraceptives are responsible for interfering with hemostatic parameters, however, there is uncertainty about which component causes these alterations. Since the popularization of this contraceptive method, it is believed that estrogen is the main component responsible for the effects observed on hemostasis [6]. In the literature, there is evidence that oral contraceptives combined with third-generation progestins, such as desogestrel and gestodene, are more related to the occurrence of adverse conditions of the circulatory system [7].

Due to the interference of these hormones in hemostatic parameters such as the procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic cascades, they are associated with thromboembolism and other cardiovascular diseases [8, 9]. Furthermore, the estrogen EE is considered one of the main promoters of changes in hemostatic parameters [6, 10], and these changes are smaller when compared to contraceptives combined with estrogens other than EE [11, 12]

The maintenance of hemostasis is dependent on the activation of purinergic receptors by purines such as ATP, ADP, AMP and adenosine (ADO) present extracellularly and regulated by ectoenzymes [13]. Activation of blood cells involves sensitization of purinergic membrane receptors, such as ADO metabotropic P1 receptors, ATP and ADP metabotropic P2Y receptors and ATP ionotropic P2X receptors. Likewise, the involvement of purinergic signaling in inflammatory processes is well known [14]. The control of extracellular nucleotides are performed by purinergic ectoenzymes such as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), which hydrolyzes ATP and ADP into ADP and AMP, respectively; ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT), which hydrolyses AMP into ADO; and ecto-adenosine deaminase (E-ADA), which deaminates ADO into inosine [15]. Therefore, maintaining the extracellular concentration of purines is important for the regulation of blood cell functions in inflammatory and immunological processes [14].

In the literature, changes are observed in the ectonucleotidases activity in blood cells of individuals with different adverse blood conditions such as sickle cell anemia [16] and in platelet modulation [17]. Also, autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis [17], lupus erythematosus [18] and multiple sclerosis [19], all under treatment, demonstrated changes in the metabolism of nucleotides. Due to the evidence of the involvement of purinergic signaling

in diseases of the cardiovascular and immune systems and the increased risk of developing coagulopathies associated with the use of combined oral contraceptives, we designed this study to investigate the activity of the nucleotide-metabolizing enzymes E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA in lymphocytes and platelets from users of different combined oral contraceptives.

Methods

Reagents

Nucleotides, adenosine, Trizma Base, Ficoll-Hypaque, Coomassie brilliant blue G and HEPES buffer were obtained from Merck. All other reagents used in experiments were of analytical grade and were of the highest purity.

Individuals

Cisgender women enrolled in undergraduate courses at the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) Campus of Campo Grande/MS, Brazil participated in the study. We included 26 women, users of third and fourth generation combined oral contraceptives, containing ethinyl estradiol as estrogen, aged between 18 and 40 years, free of cardiovascular, circulatory, hepatic and renal diseases. Also, women who underwent surgery in the 6 months prior to participating in the research, who used anticoagulants, antiplatelet agents or antibiotics in the 30 days prior to participating in the study were excluded from the sample. Even so, 29 women were included in the control group, who were not using hormonal therapy or contraception. Group G3 was composed of users of third generation contraceptives containing gestodene 0.06 mg along with EE 0.015 mg, or gestodene 0.075 mg along with EE 0.02 mg, or desogestrel 0.015 mg along with EE 0.02 mg. Group G4 was composed of users of fourth generation contraceptives containing cyproterone acetate 2 mg along with EE 0.35 mg or drospirenone 3 mg along with EE 0.02 mg. The samples were presented by 29 participants using hormonal oral contraceptives (19-28 years old), of which 13 samples comprised group G3 with an average age of 22 years, and 16 samples comprised the group G4 with a mean age of 24 years. The average time of use of combined contraceptives was 2 years of recurrent use. Even so, 29 participants made up the control group (non-users of hormonal contraception, aged 18-38 years old).

Isolation of lymphocytes and platelets from whole blood

Lymphocyte-rich mononuclear cells were isolated from 4 mL peripheral blood collected in EDTA and separated using the method of Boyum (1968) [20] by density gradient with Ficoll-Hypaque and stored in saline. After isolation, cells were kept under refrigeration at 8° C for up to 20 h for enzymatic analysis [21]. Platelets were isolated from 4 mL peripheral blood collected

in citrate using the method of Heymann et al. (1984) [22] and Pilla et al. (1996) [23] and stored on HEPES buffer.

E-NTPDase assay for lymphocytes

ATPase and ADPase activities were performed according with Leal et al. (2005) [24]. The reaction medium consisted of 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 with a final volume of 200 µL. After pipetting the reaction system into 96-well flat-bottom microplates, 20 µL of lymphocytes were added to the reaction medium (2 to 4 µg of protein) and preincubated for 10 min at 37 °C. Reaction started with addition of 2.0 mM ATP or ADP and incubation time was 70 minutes at 37 °C. The reaction was stopped by transferring 20 µL of the reaction to another microplate containing 20 µL of 10% trifluoroacetic acid (TFA). Then, the inorganic phosphate (Pi) content was determined as described by Chan et al. (1986) [25], using malachite green as a colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. All samples were run in triplicates and specific activity was expressed as nmol of Pi released/min/mg protein.

E-ADA assay for lymphocytes

To quantify E-ADA activity in lymphocytes, it was used the method described by Giusti and Gakis (1971) [26] with modifications [21]. Briefly, the assay consisted of blank tubes (without sample) and test tubes (with sample). Blank tubes received 500 µL of the reaction medium (10 mM adenosine/50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0), and the test tubes received 500 µL of the reaction medium and 25 µL of lymphocytes suspension (approximately 12 µg of protein). After 120 minutes of incubation at 37° C, the reaction was stopped by adding 1500 µL of 106 mM phenol/0.17 mM nitroprusside and then 1500 µL of alkaline hypochlorite. After stopping the reaction, 25 µL of the cell suspension was added to the blank tubes and then all tubes were incubated for 30 minutes at 37° C to reveal the NH₄⁺ content. Enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 620 nm and expressed as nmol of NH₄⁺/min/mg of protein. Ammonium sulfate was used as standard.

E-NTPDase and E-5'-NT assay for platelets

E-NTPDase and E-5'-NT activities in platelets were determined according with methods previously described [22, 23]. The reaction medium for the quantification of E-NTPDase activity (ATP or ADP hydrolysis) contained 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) with a final volume of 200 µL. For the quantification of the activity of the E-5'-NT enzyme (AMP hydrolysis), the reaction medium was the same, with the exception that 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂. After pipetting the reaction system into 96-well flat-bottom microplates, 20 µL of the platelet preparation (8 to 12 µg of protein) were added, and incubated for 10 minutes at 37°C. The

reaction was started with the addition of 1.0 mM ATP or ADP, or 2 mM AMP. The incubation time was 60 minutes at 37 °C. The reaction was stopped by transferring 20 µL of the reaction to another microplate containing 20 µL of 10% trifluoroacetic acid (TFA). Then, inorganic phosphate (Pi) content was determined as described by Chan et al. (1986) [26], using malachite green as a colorimetric reagent and KH₂PO₄ as a standard. All samples were run in triplicates and specific activity expressed as nmol of Pi released/min/mg protein.

E-ADA assay for platelets

To quantify E-ADA activity in platelets, it was used the method previously described by Giusti and Gakis (1971) [26], with modifications. Briefly, the assay consists of blank tubes (without sample) and test tubes (with sample). Blank tubes received 500 µL of reaction medium (1 mM adenosine/50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0), and test tubes received 500 µL of reaction medium and 25 µL of platelets (7.5 to 20 µg of protein). After 105 minutes of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 1500 µL of 106 mM phenol/0.17 mM nitroprusside and then 1500 µL of alkaline hypochlorite. After stopping the reaction, 25 µL of the cell suspension was added to the blank tubes and then all tubes were incubated for 30 minutes at 37°C to reveal the NH₄⁺ content. Enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 620 nm and expressed as nmol of NH₄⁺/min/mg of protein. Ammonium sulfate was used as standard.

Protein determination

Protein was measured by Coomassie Blue method, according to Bradford (1995) [27] using serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data are expressed as mean and interquartile range. Data analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

1. General characteristics of the participants

The samples were presented by 29 participants using hormonal oral contraceptives (19-28 years old), of which 13 samples comprised group G3 with an average age of 22 years and 16 samples comprised the group G4 with a mean age of 24 years. The average time of use of combined contraceptives was 2 years of recurrent use. Even so, 29 participants made up the control group

(non-users of hormonal contraception, aged 18-32 years old). The general characteristics of participants were exposed in Table 1.

2. *E-NTPDase activity in lymphocytes*

Figure 1 shows the ATPase and ADPase activity of E-NTPDase in lymphocytes from users of G3 and G4 groups. There was no significant change in ATP hydrolysis ($p > 0,05$) by E-NTPDase from lymphocytes from oral contraceptive users (Figure 1A) and the control group. ADP hydrolysis activity by E-NTPDase of lymphocytes from users of G4 showed a 216% increase ($n = 15$; $p < 0.01$) in relation to the control group (Figure 1B).

3. *E-ADA activity in lymphocytes*

Figure 2 shows the ADO deamination activity by E-ADA in lymphocytes from G3 and G4 groups, which showed a decrease of 66,5% ($n = 8$; $p < 0.01$) and 50,7% ($n = 9$; $p < 0.05$), respectively, in relation to the control group.

4. *E-NTPDase activity in platelets*

Figure 3 shows ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by E-NTPDase in platelets from users of G3 and G4 groups. The activity of ATP hydrolysis by E-NTPDase in platelets from users of G3 did not show any difference compared with control ($p > 0.05$). However, fourth generation contraceptives decreased 34% ($n = 10$; $p < 0.01$) in relation to the control group (Figure 3A). There was no significant difference between ADP hydrolysis by E-NTPDase in platelets from oral contraceptive users ($p > 0.05$) compared to the control group (Figure 3B).

5. *E-5'-NT activity in platelets*

Figure 4 shows the activity of E-5'-NT in platelets from users of G3 and G4 groups. AMP hydrolysis activity by E-5'-NT in platelets from third-generation contraceptive users decreased 69% ($n = 8$; $p < 0.05$) in relation to the control group.

6. *E-ADA activity in platelets*

Figure 5 shows the ADO deamination activity by E-ADA from platelets of users of G3 and G4 groups. Adenosine deamination activity showed a decrease in both groups of users of combined oral contraceptives when compared to the control, being 65% and 63% for G3 ($n = 8$, $p < 0.01$) and G4 ($n = 8$, $p < 0.01$), respectively.

Discussion

Contraceptive pills are classified by generation, corresponding to the progestin component and the dose of the estrogen component. Drospirenone and cyproterone acetate, derived from testosterone, are considered the fourth generation of combined oral contraceptives and have a greater antiandrogenic effect compared to other progestins [5, 28]. Gestodene and desogestrel are third-generation progestins and are more involved in the development of adverse conditions of the circulatory and cardiovascular system [29, 30]. The use of oral contraceptives is associated with the development of these conditions mainly due to their effect on hemostatic parameters. Among the changes in hemostatic parameters related to combined oral contraceptives are the increase in factor VII of the coagulation cascade [31], in addition to the reduction in the activity of protein C and factor V, components in the anticoagulant cascade [32, 33]. In general, EE has a stimulating effect on coagulation factors and would be responsible for the pro-aggregation effect of combined contraceptives. The use of progesterone associated with EE can mediate these effects, so that more antiandrogenic progestones represent a lower risk of developing adverse conditions of the circulatory system [34]. The incidence of these conditions also varies according to the dose and type of estrogen, corroborating the hypothesis that the use of EE may represent a greater risk [28].

The regulatory function of signaling molecules of the purinergic system is well established and the pro-aggregant and pro-inflammatory profile of nucleotides such as ATP and ADP is recognized and, in contrast, the anti-aggregant and anti-inflammatory profile of molecules such as AMP and ADO [35]. A predisposition to the development of thrombopathies, heart diseases and inflammatory diseases caused by the use of hormonal contraceptives, identified in users, has already been predicted in the literature [10]. Considering this fact, this event may be related to a supposed increase in the concentration of ATP and ADP in the vascular microenvironment, which would result in the activation of P2X and P2Y receptors. Additionally, it can also be hypothesized a decrease in the concentration of nucleotides such as AMP and ADO in the vascular microenvironment of users of hormonal contraceptives.

The purinergic ectoenzymes are major players in the regulation of extracellular levels of nucleotides and ADO. Our findings indicate a decrease in E-5'-NT activity in platelets from users of third-generation combined oral contraceptives, compared to the control group. This result presumes a drop in the generation of ADO from AMP in the vascular microenvironment, consequently limiting the activity of P1 receptors. The activity of the E-5'-NT enzyme plays an important role in platelet aggregation mediated by agonists, already elucidated in the literature, related to the maintenance of ADO concentration in the vascular microenvironment [36]. Blood cells, such as lymphocytes, other leukocytes and platelets, in addition to endothelial cells, express the GPCR P1 receptors A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃. In platelets and lymphocytes, A_{2A} and A_{2B} receptors have an important antiaggregant and anti-inflammatory function by decreasing the mobilization of intracellular Ca²⁺ [37]. Considering this evidence, a reduction in the concentration of ADO in the vascular microenvironment can be assumed as a consequence of the decreased E-5'-NT activity, which corroborates a possible decrease in the anti-aggregant and anti-inflammatory effect promoted by ADO in users of combined oral contraceptives. We

underline that lymphocytes have a low expression of E-5'-NT [38, 39], thus its activity is very low and not detectable by the method we used to quantify ectonucleotidases activities.

In this study E-ADA activity was different from what was initially hypothesized. A decrease in enzyme activity was observed, both in lymphocytes and platelets of users of combined oral contraceptives from the two groups analyzed, compared to control. An increased activity would represent a tendency towards the reduction of extracellular ADO levels due to its hydrolysis. However, the decreased activity observed in this study can be seen from the perspective that the catalytic activity of an enzyme can also be shaped by the biological levels and the availability of its substrate [40], in this case also indicating low circulating ADO levels. This interpretation of low ADO levels is compatible with the characteristics of contraceptive users, which show an inflammatory and thrombotic profile [5, 41].

In the context of regulation of ADO levels, we also need to consider the role of transmembrane ADO transporters, which regulate extracellular ADO levels through the reuptake of the substrate into the cell. Human nucleoside transporters (hNTS) are transmembrane proteins that enable the passage of membrane-impermeable nucleosides to the intra or extracellular environment [42]. Adenosine transporters can be classified into subtypes: hCNT 2 and hCNT 3 (concentration-based transporters) - they take advantage of the gradient promoted by the Na²⁺ ion for the influx of ADO into the cell -, or hENT 1, hENT 2 and hENT 3 (equilibrium-dependent transporters) - are potentially bidirectional, they transport according to the concentration of nucleosides present in the intra and extracellular media [42, 43]. ADO transporters have already been described in blood cells such as erythrocytes [44], lymphocytes [45] and endothelial cells [46] and their functioning can affect the activity of E-ADA through the limitation of its substrate. The decrease in ADO in the vascular microenvironment, both due to the decrease in E-5'-NT activity and through reuptake by transporters, could be related with the decrease in E-ADA activity and the pro-agregant and pro-inflammatory profile observed in users of hormonal contraceptives. It is considerable that this strategy of removing ADO from the extracellular environment is an important factor in regulating the functions promoted by the nucleoside [43], for example, through downregulation of platelet aggregation by A_{2A} and A_{2B} receptors.

Furthermore, it is essential to highlight that in addition to the activity of E-5'-NT and E-ADA in the cells investigated, purinergic enzymes and receptors are also expressed in other cells of the vascular microenvironment, such as erythrocytes [47] and other leukocytes [15, 48]. Given the limitations of the study, it is worth considering that deeper analysis of the functioning of purinergic ectoenzymes in other cells could shed light on other parameters that corroborate or refute the results and hypotheses raised here.

The G4 group also showed changes in the activity of the E-NTPDase enzyme compared to the control group, with an increase in ADP hydrolysis in lymphocytes, and a decrease in ATP hydrolysis in platelets. E-NTPDase is an enzyme associated with hemostasis, as it maintains the concentration of pro-aggregating nucleotides ATP and ADP in the vascular microenvironment [35]. It is already predicted in the literature that the use of third-generation contraceptives has a greater impact on hemostatic parameters, compared to fourth-generation

contraceptives [29, 30]. The changes observed in E-NTPDase activity in G4, namely the increase in ADP hydrolysis in lymphocytes and the decrease in ATP hydrolysis in platelets, corroborate the creation of a vascular microenvironment poorer in ADP. Considering the pro-aggregating and pro-inflammatory effects triggered by ADP, its lower concentration in the vascular microenvironment may corroborate its less pronounced effect on hemostatic parameters observed in users of fourth generation contraceptives.

Conclusions

In this study we observed that the use of combined oral contraceptives with EE associated with a third or fourth generation progestin induces changes in the purinergic system ectoenzymes E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA expressed in lymphocytes and platelets, which might contribute to the pro-inflammatory and pro-aggregating vascular microenvironment characteristic of this population.

Acknowledgements

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Finance Code 001). This study was supported by the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC- Brazil, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM - SBBq), and Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARM).

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval

All protocols and experiments used in this study were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (CEP - UFMS / CAAE: 57842622.2.0000.0021).

REFERENCES

1. Bonan C, Teixeira LA, Nakano AR (2017) Absorção e metabolização dos hormônios sexuais e sua transformação em tecnologias contraceptivas: Percursos do pensamento médico no Brasil. *Ciencia e Saude Coletiva* 22:. <https://doi.org/10.1590/1413-81232017221.26532016>
2. Ribeiro CCM, Shimo AKK, Lopes MHB de M, Lamas JLT (2018) Effects of different hormonal contraceptives in women's blood pressure values. *Rev Bras Enferm* 71
3. Almeida APF, Assis MM (2017) Efeitos colaterais e alterações fisiológicas relacionadas ao uso contínuo de anticoncepcionais hormonais orais. *RevEletrônAtualiza Saúde* 5:
4. Golobof A, Kiley J (2016) The Current Status of Oral Contraceptives: Progress and Recent Innovations. *Semin Reprod Med* 34:. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1572546>
5. Plu-Bureau G, Maitrot-Mantelet L, Hugon-Rodin J, Canonico M (2013) Hormonal contraceptives and venous thromboembolism: An epidemiological update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27
6. Belicová M, Lukáč B, Dvorský J, et al (2003) Thromboembolic disease and present oral contraception. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 9:. <https://doi.org/10.1177/107602960300900106>
7. Martínez F, Ramrez I, Pérez-Campos E, et al (2012) Venous and pulmonary thromboembolism and combined hormonal contraceptives. Systematic review and meta-analysis. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care* 17
8. Aslan AN, Süygün H, Sivri S, Keleş T (2016) Low-dose oral contraceptive-induced acute myocardial infarction. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care* 21:. <https://doi.org/10.1080/13625187.2016.1225715>
9. Humaish HH, Alasadi A, Aldafae I (2020) Evaluation the relationship between oral contraceptives containing drospirenone with dyslipidemia and risk of cardiovascular diseases among women in Al-Kut City. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology* 14:. <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i4.11827>
10. Douxfils J, Klipping C, Duijkers I, et al (2020) Evaluation of the effect of a new oral contraceptive containing estetrol and drospirenone on hemostasis parameters. *Contraception* 102:. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2020.08.015>
11. Gaussem P, Alhenc-Gelas M, Thomas JL, et al (2011) Haemostatic effects of a new combined oral contraceptive, nomegestrol acetate/17 β -estradiol, compared with those of levonorgestrel/ethinyl estradiol: A double-blind, randomised study. *Thromb Haemost* 105:. <https://doi.org/10.1160/TH10-05-0327>
12. Klufft C, Zimmerman Y, Mawet M, et al (2017) Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. *Contraception* 95:. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2016.08.018>
13. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1783

14. Deaglio S, Robson SC (2011) Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. In: *Advances in Pharmacology*
15. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>
16. Castilhos LG, Doleski PH, Adefegha SA, et al (2016) Altered E-NTPDase/E-ADA activities and CD39 expression in platelets of sickle cell anemia patients. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 79:. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.009>
17. Jaques JA, Becker LV, Souza V do CG, et al (2013) Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 31:. <https://doi.org/10.1002/cbf.2910>
18. Becker LV, da Silva Pereira Saccol R, Morsch VM, et al (2019) Activity and expression of E-NTPDase is altered in peripheral lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients. *Clinica Chimica Acta* 488:. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.032>
19. Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, et al (2010) Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol* 257:. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5258-4>
20. Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, Supplement* 97:
21. Costa LR, de Souza AKY, Scholl JN, et al (2021) Biochemical characterization of adenosine deaminase (Cd26; ec 3.5.4.4) activity in human lymphocyte-rich peripheral blood mononuclear cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 54:. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2020E10850>
22. Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW (1984) Subcellular Localization of 5'-Nucleotidase in Rat Brain. *J Neurochem* 43:. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12832.x>
23. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, et al (1996) ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7:. <https://doi.org/10.3109/09537109609023582>
24. Leal DBR, Streher CA, Neu TN, et al (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase1; Ecto-apyrase; ecto- diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1721:. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.09.006>
25. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8)
26. Giusti G, Gakis C (1971) Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 12:. <https://doi.org/10.1159/000459567>

27. Bradford MM (1976) Determinación de proteínas: método de Bradford. *Anal Biochem* 254:
28. Sitruk-Ware R, Nath A (2010) The use of newer progestins for contraception. *Contraception* 82
29. Jick SS, Hernandez RK (2011) Risk of non-fatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives containing drospirenone compared with women using oral contraceptives containing levonorgestrel: Case-control study using United States claims data. *BMJ* 342:. <https://doi.org/10.1136/bmj.d2151>
30. Rocha LSRA da, Vieira MEB, Dominato AAG (2021) Trombose venosa cerebral e o uso de anticoncepcionais orais: Uma revisão integrativa. *Research, Society and Development* 10:. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17428>
31. Kluft C, Lansink M (1997) Effect of oral contraceptives on haemostasis variables. In: *Thrombosis and Haemostasis*
32. Middeldorp S (2013) Thrombosis in women: What are the knowledge gaps in 2013? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11
33. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JCM, et al (2002) Effects of second and third generation oral contraceptives and their respective progestagens on the coagulation system in the absence or presence of the factor V Leiden mutation. *Thromb Haemost* 87:. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1612973>
34. Sitruk-Ware R (2006) New progestagens for contraceptive use. *Hum Reprod Update* 12
35. Fuentes E, Palomo I (2015) Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. *Vascul Pharmacol* 75
36. Chaurasia SN, Kushwaha G, Pandey A, Dash D (2020) Human platelets express functional ectonucleotidases that restrict platelet activation signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 527:. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.065>
37. Yang D, Chen H, Koupenova M, et al (2010) A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8:. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03769.x>
38. Turner RJ, Geraghty NJ, Williams JG, et al (2020) Comparison of peripheral blood mononuclear cell isolation techniques and the impact of cryopreservation on human lymphocytes expressing CD39 and CD73. *Purinergic Signal* 16:. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09714-1>
39. Jiang X, Wu X, Xiao Y, et al (2023) The ectonucleotidases CD39 and CD73 on T cells: The new pillar of hematological malignancy. *Front Immunol* 14
40. Bar-Even A, Noor E, Savir Y, et al (2011) The moderately efficient enzyme: Evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry* 50:. <https://doi.org/10.1021/bi2002289>
41. Kangasniemi MH, Arffman RK, Joenvaara S, et al (2023) Ethinylestradiol in combined hormonal contraceptive has a broader effect on serum proteome compared with

estradiol valerate: A randomized controlled trial. *Human Reproduction* 38:.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deac250>

42. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S (2018) Emerging roles of nucleoside transporters. *Front Pharmacol* 9

43. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S (2018) Who is who in Adenosine transport. *Front Pharmacol* 9

44. Plagemann PGW, Wohlhueter RM, Kraupp M (1985) Adenosine uptake, transport, and metabolism in human erythrocytes. *J Cell Physiol* 125:.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1041250223>

45. Przybyla T, Sakowicz-Burkiewicz M, Pawelczyk T (2018) Purinergic signaling in B cells. *Acta Biochim Pol* 65

46. Löffler M, Morote-Garcia JC, Eltzschig SA, et al (2007) Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27

47. Bielat K, Tritsch GL (1989) ECTO-enzyme activity of human erythrocyte adenosine deaminase. *Mol Cell Biochem* 86:.
<https://doi.org/10.1007/BF00222613>

48. Di Virgilio F, Vuerich M (2015) Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci* 191

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. E-NTPDase activity in lymphocytes from oral hormonal contraceptive users. A) ATP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 23 (mean) \pm 18,4 (SD) nmol of Pi/min/mg of protein; B) ADP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 31 (mean) \pm 24.2 (SD) nmol of Pi/ min/ mg of protein. G3 ($n = 10$): group of users of third-generation oral contraceptives; G4 ($n = 16$): group of fourth-generation oral contraceptive users; control group ($n = 26$). The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. ** $p < 0.001$.

Figure 2. E-ADA activity in lymphocytes from oral hormonal contraceptive users. Absolute activity of the control group = 0.09 (mean) \pm 0.08 (SD) nmol of NH_4^+ /min/mg of protein. G3 ($n = 8$): group of users of third-generation oral contraceptives; G4 ($n = 9$): group of fourth-generation oral contraceptive users; control group ($n = 21$). The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$.

Figure 3. E-NTPDase activity in platelets from users of oral hormonal contraceptives. A) ATP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 11.7 (mean) \pm 6.6 (SD) nmol of Pi/ min/ mg of protein. B) ADP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 5 (mean) \pm 3.4 (SD) nmol of Pi/ min/ mg of protein. G3 ($n = 8$): group of users of third-generation oral contraceptives; G4 ($n = 10$): group of fourth-generation oral contraceptive users; control group ($n = 22$). The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. ** $p < 0.01$.

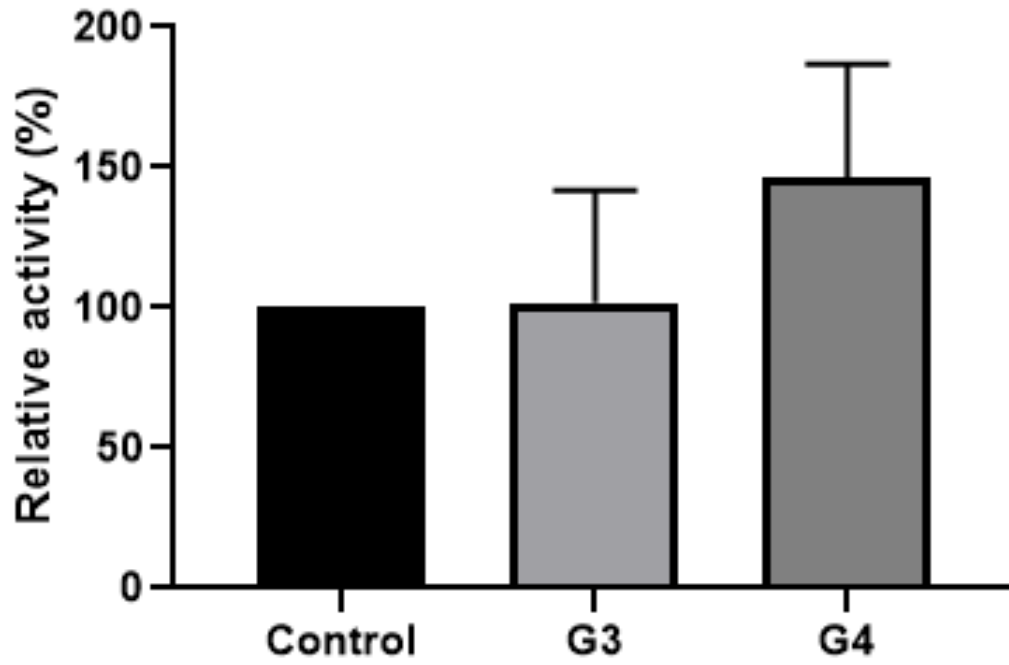
Figure 4. E-5'-NT activity in platelets from users of oral hormonal contraceptives. AMP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 4.7 (mean) \pm 2.1 (SD) nmol of Pi/min/mg of protein. G3 ($n = 8$): group of users of third-generation oral contraceptives; G4 ($n = 10$): group of fourth-generation oral contraceptive users; control group ($n = 18$). The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. * $p < 0.05$.

Figure 5. E-ADA activity in platelets from users of oral hormonal contraceptives. Relative activity of released NH_4^+ . Absolute activity of the control group = 0.092 (mean) \pm 0.02 (SD) nmol of NH_4^+ / min/ mg of protein. G3 ($n = 8$): group of users of third-generation oral contraceptives; G4 ($n = 8$): group of fourth-generation oral contraceptive users; control group ($n = 18$). The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. ** $p < 0.01$.

FIGURES

Figure 1

(A)



(B)

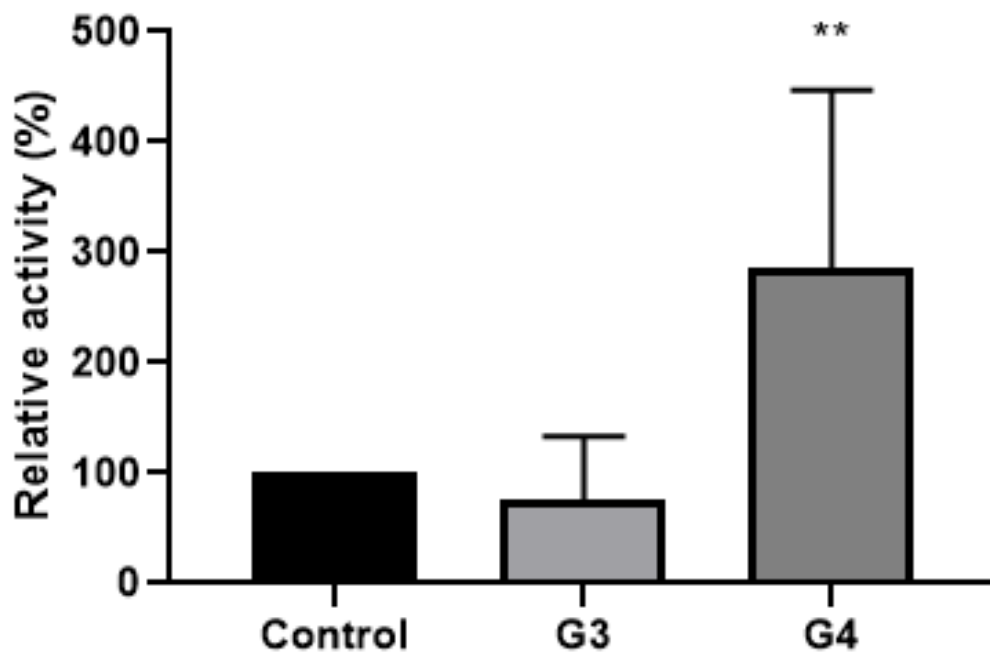


Figure 2

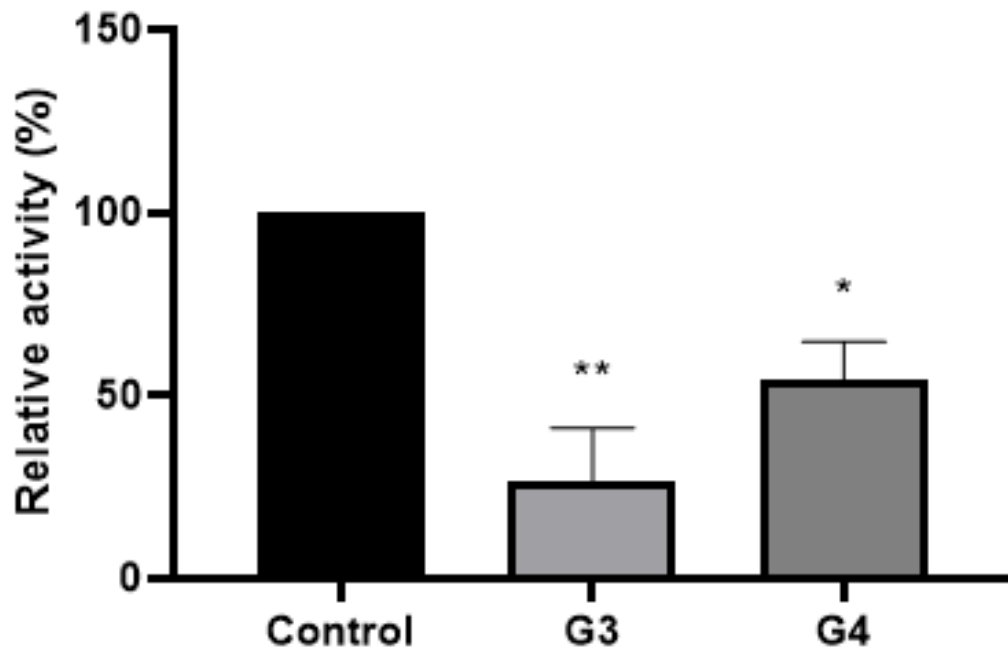
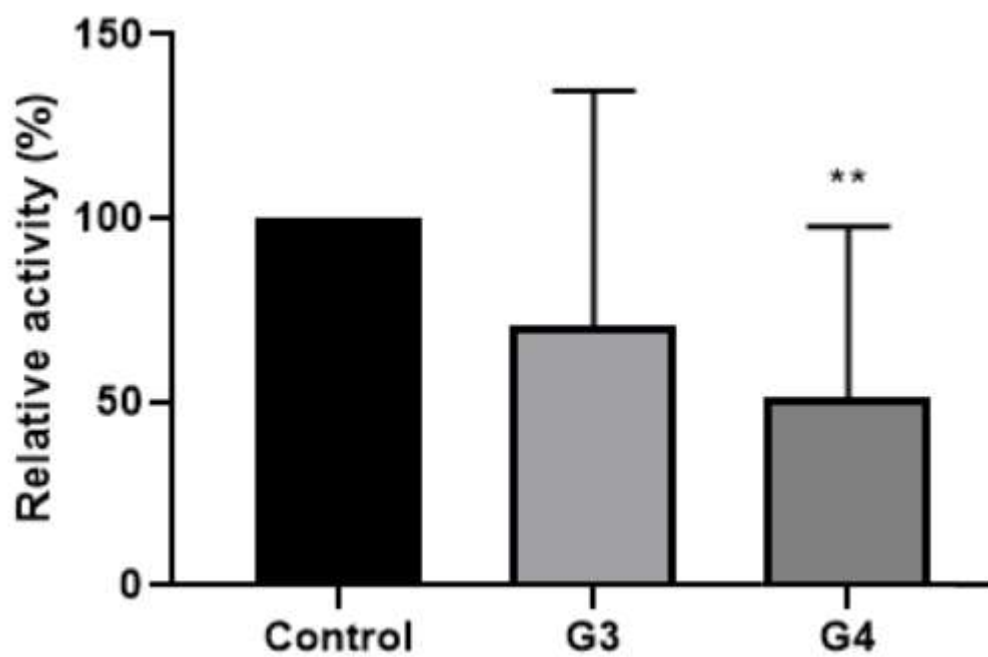


Figure 3

(A)



(B)

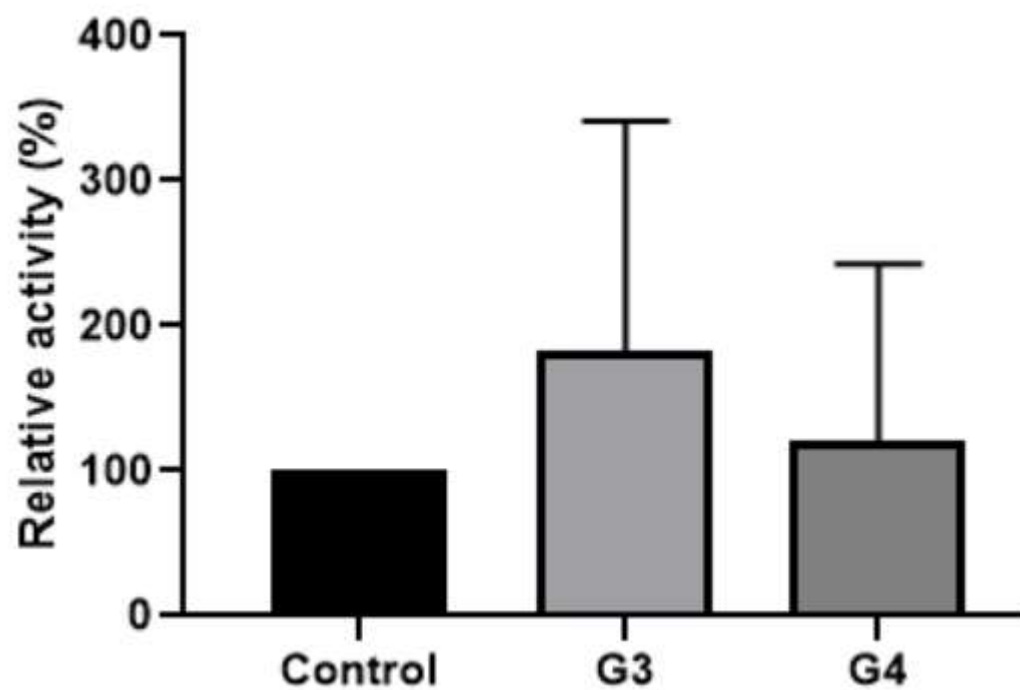


Figure 4

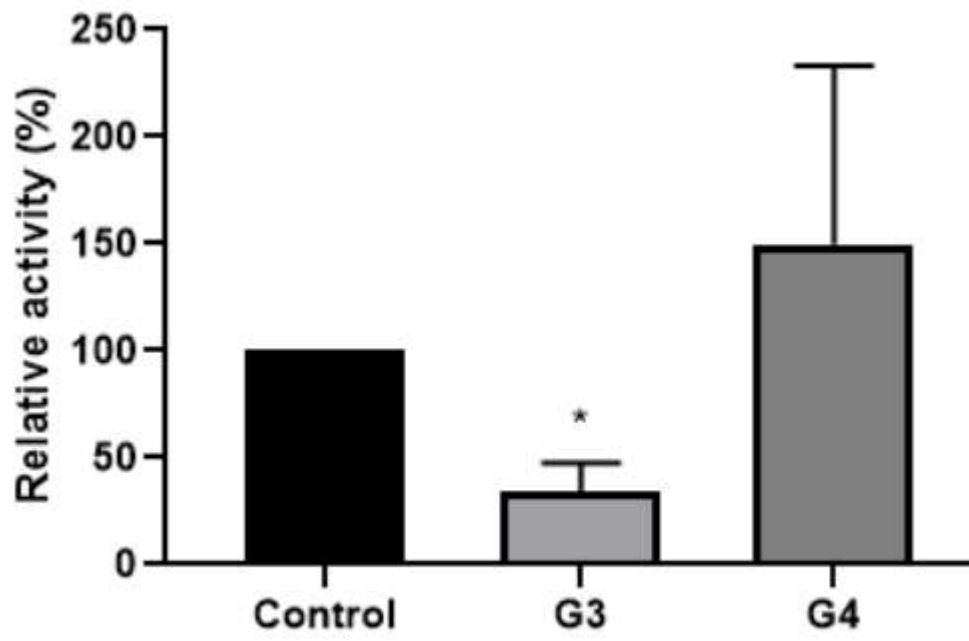
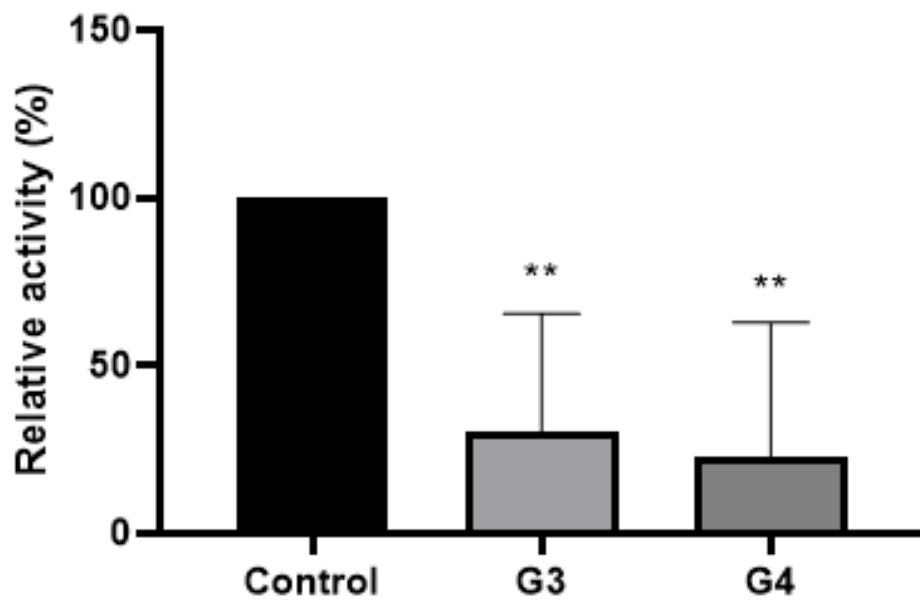


Figure 5



TABLE

Table 1. Sociodemographic data of participants belonging to groups G3, G4 and control group.

	Groups		
	Control	G3	G4
Total	29	13	16
Age of participants			
18 - 25 years old	21	10	10
26 - 30 years old	6	3	6
30 - 38 years old	2	0	0
Duration of combined oral contraceptive use			
6 months - 1 year	-	1	0
1 - 3 years	-	9	8
more than 3 years	-	3	8
Composition and dose of oral contraceptive			
Gestodene (0,06 mg/0,75 mg) + EE (0,015 mg/0,02 mg)	-	7	0
Desogestrel (0,015 mg) + EE (0,02 mg)	-	6	0
Cyproterone acetate (2 mg) + EE (0.35 mg)	-	0	7
Drospirenone (3 mg) + EE (0,02 mg)	-	0	9

EE: Ethinylestradiol

APÊNDICE I

Comprovante de submissão do manuscrito I

Denise Jung - denise@mc.manuscriptcentral.com Fri, Dec 22, 2023, 11:56 AM

22-Dec-2023

Dear Miss Morenchi

A manuscript entitled "THE IMPLICIT RISK OF ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVES: DISTURBANCE IN HEMOSTASIS AND THROMBOEMBOLIC EVENTS" with reference number FCP-FUND-RA-13-23-0560 has been submitted by Dr. Jeanette Dr. Jeanette Otávio Jaques to "Fundamental & Clinical Pharmacology".

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/fcp>
USER ID: gonzaga4@gmail.com
PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below:

https://mc.manuscriptcentral.com/fcp?URL_MASK=70ede1e43d674e71a6b8719a619c3a95

Please note that the single use link will expire on 25-Dec-2023 3:56:45 PM GMT / 25-Dec-2023 10:56:45 AM EST.
If the single use link has expired, you can generate a single use password by entering your email address into the Password Help function on your site log in page: <https://mc.manuscriptcentral.com/fcp>

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site (<https://mc.manuscriptcentral.com/fcp>) to update your account information via the "Edit Account" tab at the top right.

Thank you for your participation.

Sincerely,
"Fundamental & Clinical Pharmacology"
Editorial Office contact - Denise.Jung@journals.t

APÊNDICE II

Parecer Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos UFMS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da atividade de enzimas do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas de usuárias de contraceptivos hormonais orais

Pesquisador: BRUNA PACHE MORESCHI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57842622.2.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Projeto atualizado

Justificativa: Justifica-se pela necessidade de expandir o grupo de inclusão de participantes,

Data do Envio: 26/01/2023

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.943.930

Apresentação da Notificação:

Visando aumentar o número de participantes da pesquisa acima citada, gostaríamos de incluir participantes vinculados à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN/UFMS), sendo esta inclusão autorizada pela diretoria da unidade.

Objetivo da Notificação:

Informar a inclusão de novos participantes vinculados a outro instituto da Universidade (UFMS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos aos participantes

Identifica-se o risco de lesões e hematomas às participantes durante a coleta do material biológico (sangue, 16 mL), que será realizada por meio de punção intravenosa na região antecubital do braço ou na mão. Para evitar estes danos previsíveis, o procedimento de coleta de sangue será

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros, Prédio das Pró-Reitorias, Hércules Maymone, 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 5.943.930

Outros	BrunaMoreschi_TCLE_Atualizado_docx.pdf	26/01/2023 10:26:54	BRUNA PACHE MORESCHI	Postado
Outros	BrunaMoreschi_CartaResposta_Atualiza da_docx.pdf	26/01/2023 10:27:19	BRUNA PACHE MORESCHI	Postado
Outros	BrunaMoreschi_ProjetoPPGFARM_Atualizado_docx.pdf	26/01/2023 10:27:33	BRUNA PACHE MORESCHI	Postado
Outros	Outros.pdf	09/03/2023 16:55:12	Cláudia Du Bocage Santos Pinto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 14 de Março de 2023

Assinado por:
Juliana Dias Reis Pessalacia
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ¸ Prédio das Pró-Reitorias ¸ Hércules Maymone ¸ 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br

Página 07 de 07