

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Thaiane Alcarde Robeldo

**Influência da Citroterapia na Produção de Prostaglandinas
e Citocinas por Mulheres Durante a Menstruação**

São Carlos

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Influência da Citroterapia na Produção de Prostaglandinas
e Citocinas por Mulheres Durante a Menstruação**

Thaiane Alcarde Robeldo

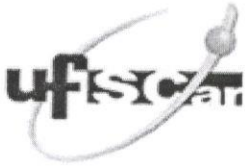
Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Imunologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

Co-Orientadora: Profa. Dra. Priscila Maria de Andrade Borra

São Carlos

2017

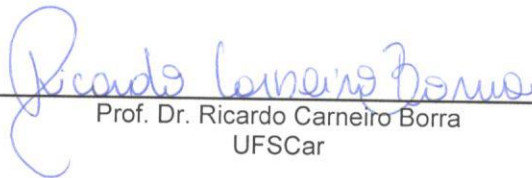


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

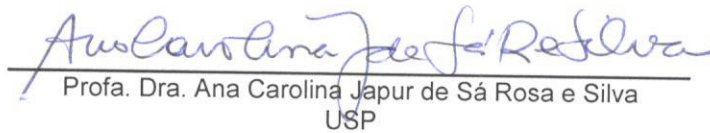
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Thaiane Alcarde Robeldo, realizada em 22/02/2017:


Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra
UFSCar


Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar


Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva
USP

Dedico essa dissertação à meu avô (*in memoriam*) e às
pessoas que sempre acreditaram em mim.

Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.

Anatole France

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Pedro e Edna e irmão Thiago, que sempre acreditaram no meu sonho e nunca me deixaram desistir dos meus objetivos. Esse título mais que tudo também é de vocês. Nada seria possível sem o alicerce que, durante toda a minha vida, vocês me deram.

A minha família, que sempre estiveram assistindo e incentivando cada passo que eu dava dessa longa jornada.

Ao meu namorado Vinicius, que esteve o tempo todo me apoiando e vivenciando cada dura etapa. Obrigada pelos conselhos e por me ajudar a todas as mais difíceis decisões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra, que me recebeu em seu laboratório e me possibilitou vivenciar e aprender o que, hoje, eu quero seguir para a minha vida profissional.

A minha Co-orientadora Profa. Dra. Priscila Maria de Andrade Borra, pela oportunidade em poder participar desse projeto.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes, que me proporcionou momentos de grandes aprendizagens durante minha iniciação científica e me deu todo o suporte no início desse trabalho. Sou muito grata por tudo.

A Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, que disponibilizou seu laboratório sempre com muita gentileza. Também a todos os seus companheiros de laboratórios que, com muita paciência, me ajudaram e tornaram possíveis cada etapa desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório (LIA), pela convivência, paciência e aprendizado durante todo o tempo.

As minhas amigas Natália, Layane, Anna Carolina e Camila por me acompanharem durante essa fase sempre me dando muito apoio, carinhos nos momentos difíceis e risadas nos momentos mais oportunos.

As amigas de longa data Danielle e Kelly, que mesmo distante nunca deixaram de estar presente na minha vida. Vocês são parte desse trabalho.

As voluntárias que, sem elas, esse trabalho não seria possível.

A empresa Kevosai® por ter nos disponibilizado os coletores menstruais utilizados como fonte de coleta nesse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular que me proporcionaram tamanho aprendizado e a obtenção desse Título. A nossa querida secretária Ivanildes, que sempre muito nos auxilia da melhor forma possível.

A Capes pelo apoio financeiro da bolsa de Mestrado.

A Fapesp pelo apoio financeiro do projeto de Mestrado.

Resumo

Desequilíbrios na produção de prostaglandinas (PGs) secretadas durante os ciclos menstruais, principalmente as do tipo F2 α e E2, têm sido associados à ocorrência de dismenorrea e sangramento uterino excessivo. Dependendo da magnitude dessas disfunções, o uso de anti-inflamatórios não hormonais continua sendo indicado para bloquear a síntese de PGs e controlar o quadro clínico. Entretanto, como esse tipo de opção terapêutica apresenta resultados variáveis e pode produzir efeitos colaterais que restringem sua utilização, o emprego da fitoterapia vem sendo proposto como alternativa terapêutica. Trabalhos e relatos têm mostrado que o limão Taiti (*Citrus latifolia*) atua de forma eficaz no controle da menorragia não estrutural e da dismenorrea. Embora as formas de atuação não sejam conhecidas, a inibição da cascata de produção dos ácidos araquidônicos é uma das possibilidades que merece ser investigada. Deste modo, para contribuir com a elucidação dos mecanismos de ação, propomos estudar o efeito do suco do limão Taiti na produção de PGs e de citocinas envolvidas nas vias de síntese das PGs em mulheres saudáveis durante a menstruação. Para isso, voluntárias na fase do menacme foram divididas de forma aleatória em três grupos e tratadas a partir do início da menstruação por dois dias consecutivos com Limão (G1, n=15) ou Meloxicam (G2, n=14) e comparadas com grupo Controle (G3, n=13) formado por participantes que não sofreram qualquer tipo de intervenção. Para isso, amostras de fluído menstrual e sangue periférico foram coletadas no segundo dia da menstruação para dosagem de PGE2, PGF2 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6 com o propósito de avaliar o efeito uterino e sistêmico da citoterapia. Além disso, foram realizadas cultura de células a partir de sangue total, estimuladas (24h) ou não com LPS, para medir os efeitos do limão Taiti na resposta inflamatória *in vitro* (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Os resultados mostraram uma maior concentração de PGF2 α no fluído menstrual do grupo que consumiu o suco do limão Taiti e uma concentração menor de PGE2 e PGF2 α no grupo tratado com Meloxicam. Em relação às citocinas inflamatórias, observou-se que somente a concentração de TNF- α no sangue menstrual foi menor no grupo Limão. Em relação à concentração de TNF- α no sangue periférico, não houve diferenças significativas entre os grupos, entretanto no sobrenadante da cultura celular, o limão Taiti foi capaz de induzir maior produção de TNF- α pelas células suplementadas pelo soro da própria paciente e estimuladas com LPS. Em conclusão: o limão Taiti possivelmente atua na cascata de produção de PGF2 α do útero, podendo favorecer os eventos associados com a contração uterina, de uma forma distinta em relação aos mecanismos de atividade associados ao Meloxicam.

Palavras-chaves: prostaglandinas, dismenorrea, fluxo menstrual, limão Taiti, inflamação.

Abstract:

Imbalances in the production of prostaglandins (PGs) secreted during menstrual cycles, especially PGE₂ and PGF₂α, have been associated with the occurrence of dysmenorrhea and excessive uterine bleeding. Depending on the magnitude of these dysfunctions, the use of non-hormonal anti-inflammatories continues to be indicated to block the synthesis of PGs and to control the clinical outcome. However, since this type of therapeutic option produces side effects that may restrict its use for long periods, the use of herbal products has been proposed as an alternative treatment. Studies and reports have shown that Tahitian lemon (*Citrus latifolia*) acts controlling the menorrhagia and dysmenorrhea. Although the forms of action are not known, the inhibition of the cascade of arachidonic acid production is one of the possibilities that deserve to be investigated. Thus, to contribute to the elucidation of the mechanisms of action, we propose to study the effect of Tahitian lemon juice on the production of PGs and cytokines involved in the synthesis pathways of PGs in healthy women during menstruation. To that aim, normal volunteers during the menarche period were randomly divided into three groups and treated for two consecutive days from the beginning of menstruation, with Lemon (G1, n = 15), Meloxicam (G2, n = 14) and compared with a Control group (G3, n = 13) formed by volunteers who did not undergo any type of intervention. On the second day of menstruation, menstrual and peripheral blood samples were collected for the determination of PGE₂, PGF₂α, IL-1β, TNFα and IL-6 in order to analyze the uterine and systemic effects of cytotherapy. In addition, cells from whole blood were cultured, whether or not stimulated with LPS, to evaluate the effects of Tahitian lemon on the production of PGs (PGF₂α and PGE₂), and the in vitro inflammatory response (IL-1β, IL-6, TNF-α). The results showed a higher concentration of PGF₂α in the menstrual blood of the Tahitian lemon group and a lower concentration of PGE₂ and PGF₂α in the Meloxicam group. Regarding the inflammatory cytokines, it was observed that only the concentration of TNFα in menstrual blood was lower in the Lemon group. However, in the supernatant of the cell culture, the Tahitian lemon was able to induce the higher production of TNFα by the cells supplemented by the patient's own serum and treated with LPS for 24 hours. Conclusion: Tahitian lemon appears to act in the cascade of production of the PGF₂α from uterus, that may favor events associated with vascular contraction, in a distinct way in relation to Meloxicam activity.

Keywords: prostaglandin, menstrual disorders, Tahiti lemon, inflammation.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da relação entre os ciclo menstrual, ciclo endometrial e a maturação da célula folicular.

Figura 2: Síntese de COX-2 a partir da ativação do fator de transcrição NF- κ B.

Figura 3: Esquematização da síntese de prostaglandina a partir da diminuição da produção de progesterona durante o ciclo menstrual.

Figura 4: Coletores individuais recebidos pela empresa Kevosai®

Figura 5: Desenho experimental das coletas de sangue menstrual e periférico dos grupos G1, G2 e G3.

Figura 6: Concentração de prostaglandina E2 (ng/mL) presente no soro menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão coletados no segundo dia da menstruação. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 7: Concentração de prostaglandina F2 α (ng/mL) presente no soro menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletados no segundo dia da menstruação. Testes estatísticos: ANOVA e Newman-Keuls para comparações múltiplas

Figura 8: Curva de regressão PGF2 α x PGE2 no soro menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletados no segundo dia da menstruação. Testes estatísticos: ANOVA e Newman-Keuls para comparações múltiplas

Figura 9: Concentração de citocina TNF- α (pg/mL) presente no soro menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletados no segundo dia da menstruação. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 10: Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no soro menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletados no segundo dia da menstruação. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 11: Concentração de citocina IL-6 (pg/mL) presente no soro menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletados no segundo dia da menstruação. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas

Figura 12: Concentração de citocina TNF- α (pg/mL) presente no soro de sangue periférico das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletados no segundo dia da menstruação. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 13: Proporção das populações celulares de linfócitos, monócitos e granulócitos provenientes das culturas celulares estimuladas ou não com LPS (10ng/ml) após 24h dos grupos Controle, Meloxicam e Limão. Análise Estatística: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas. Os dados das culturas com 10% de SFB e 10% de soro autólogo por serem semelhantes foram agrupados no mesmo gráfico para facilidade de visualização.

Figura 14: Proporções das concentrações da citocina TNF- α entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão, produzidas durante a cultura de sangue total contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, em relação a cultura não estimulada. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 15: Proporções das concentrações da citocina IL-1 β entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão, produzidas durante a cultura de sangue total contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, em relação a cultura não estimulada. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 16: Comparação das concentrações da citocina IL-6 (pg/ml) entre os grupos Controle, Meloxicame Limão, produzidas durante a cultura de sangue total contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) e estimulada por LPS (10 ng/ml) por 24h. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 17: Proporções das concentrações da citocina TNF- α entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão, produzidas durante a cultura de sangue total contendo 10% de autólogo e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, em relação a cultura não estimulada. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 18: Proporções das concentrações da citocina IL-1 β entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão, produzidas durante a cultura de sangue total contendo 10% de autólogo e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, em relação a cultura não estimulada. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 19: Proporções das concentrações da citocina IL-6 entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão, produzidas durante a cultura de sangue total contendo 10% de autólogo e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, em relação a cultura não estimulada. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados coletas através de questionário das voluntárias relativos ao ciclo menstrual: regularidade do ciclo, quantidades de dias de sangramento, presença de cólicas e eliminação de coágulos.

Tabela 2. Análise descritiva das concentração de prostaglandinas E2 e F2 α presentes no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Limão, Meloxicam e Controle.

Tabela 3: Análise descritiva das concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 presentes no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Limão, Meloxicam e Controle.

Tabela 4: Análise descritiva das concentração das citocinas TNF- α , presentes no *soro* de sangue periférico das voluntárias dos grupos Limão, Meloxicam e Controle.

Tabela 5: Proporção das populações celulares de linfócitos, monócitos e granulócitos após 24h de cultura em relação ao grupo, ao tipo de estimulação e ao tipo de *soro* de sangue periférico utilizado na suplementação.

Tabela 6: Relação entre as concentrações de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) presentes nas culturas celulares suplementadas com SFB e estimuladas com LPS, e as produzidas pelas culturas não estimuladas, nos grupos Limão, Meloxicam e Controle: $\log_2(\text{LPS}^+/\text{LPS}^-)$.

Tabela 7: Relação entre as concentrações de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) presentes nas culturas celulares suplementadas com *soro* autólogo e estimuladas com LPS, e as produzidas pelas culturas não estimuladas, nos grupos Limão, Meloxicam e Controle: $\log_2(\text{LPS}^+/\text{LPS}^-)$.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AINES - Anti-inflamatórios não-esteroidais

AKR - Aldoceto redutase

AKR1B1 - Aldoceto redutase B1

AKR1C3 - Aldoceto redutase C3

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

COX - Ciclooxigenase

FSH - Hormônio folículo estimulante

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

I κ B- Proteína inibidora

I κ K - Proteína cinase

LH - Hormônio luteinizante

LPS- Lipopolissacarídeo

MMP - Metaloproteinase de matriz

MPC-1 - proteína quimiostática de monócitos

NF- κ B - Fator de transcrição NF- κ B

NK - Células *Natural Killers*

PGs - Prostaglandinas

PGD₂- Prostaglandina D₂

PGE₂- Prostaglandina E₂

PGF₂ α - Prostaglandina 2 α

PGI₂ - Prostaglandina I₂

PGG₂ - Prostaglandina G₂

PLA₂ - Fosfolipase- A₂

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SFB - Soro fetal bovino

SOD - Superóxido desmutase

SP - Soro paciente

SUD – Sangramento Uterino Disfuncional

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

Tregs - Linfócitos T reguladores

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivos Específicos	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 O Endométrio e o Ciclo Menstrual.....	7
3.2 Papel das Prostaglandina no Ciclo Menstrual	10
3.3 Distúrbios do Ciclo Menstrual.....	13
3.4 A Resposta Inflamatória no Ciclo Menstrual.....	16
3.5 Terapêutica Anti-inflamatória: Mecanismos de Ação e Desvantagens.....	19
3.6 Citrus- Tratamento Fitoterápico	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Seleção das Participantes	24
4.1.1 Critérios de Inclusão.....	24
4.1.2 Critérios de Exclusão.....	24
4.2 Desenho experimental.....	25
4.3. Cultura de Células Totais do Sangue Periférico	27
4.4 Obtenção do Soro Periférico	28
4.5. Obtenção do Soro Menstrual.....	28
4.6 Quantificação de Prostaglandinas.....	29
4.7 Quantificação de Citocinas.....	29
4.8 Obtenção dos Leucócitos da Cultura de Células Totais	29
4.9 Análise de Leucócitos por Citometria de Fluxo	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Voluntárias	
5.2 Soro de Fluido Menstrual	33
5.2.1 Prostaglandinas PGF2 α e PGE2.....	33

5.2.2 Citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6	36
5.3 Soro do Sangue Periférico	38
5.4 Cultura.....	40
5.4.1 Contagem Relativa das Populações Celulares após 24h de cultura	40
5.4.2 Influência do limão e do Meloxicam na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, pelas células de sangue total suplementadas com SFB e induzidas por LPS.....	42
5.4.3 Influência do limão e do Meloxicam na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, pelas células de sangue total suplementadas com soro autólogo e induzidas por LPS.	45
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

A fisiologia do aparelho reprodutor feminino é responsável pela preparação do organismo para a reprodução. A partir da puberdade, o útero e os ovários passam por mudanças fisiológicas cíclicas, as quais são coordenadas pelo eixo-hipotálamo-hipófise-ovariano. A coordenação de todo o sistema que envolve o ciclo menstrual é considerada um dos eventos biológicos mais notáveis. A mulher experimenta, em média, 400 menstruações durante a sua vida. A mulher moderna experimenta mais ciclos menstruais quando comparada às suas antecessoras, que vivenciavam a menarca tardiamente, passavam por múltiplas gestações e longos períodos de amamentação, que suprimem a menstruação. Para algumas mulheres, essa natural, mas complexa ação pode representar sério problema quando o sangramento é excessivo, prolongado e acompanhado de cólicas, levando ao comprometimento da qualidade de vida.

O endométrio é a mucosa derivada do epitélio celômico dos canais de Müller que reveste a cavidade uterina e apresenta uma espessura variável, conforme a idade e a fase do ciclo menstrual. Histologicamente, podem-se distinguir três camadas no endométrio: profunda ou basal, média ou esponjosa e superficial ou compacta. No endométrio humano adulto ocorrem alterações morfológicas ordenadas em média a cada 28 dias, como resposta à produção hormonal cíclica dos ovários. A menstruação é o processo final do ciclo menstrual, que acontece quando não ocorre a fecundação e a implantação do óvulo. E, constitui-se de sangramento com perdas entre 20 a 80 ml em volume, que se repetem a cada 24 a 38 dias e se prolongam por um período de até 8 dias. Um terço do conteúdo do fluxo menstrual é representado por sangue, sendo o restante composto por resíduos endometriais liquefeitos pela atividade fibrinolítica dos restos celulares.

Do ponto de vista histo-fisiológico, o ciclo reprodutivo divide-se em três fases: Proliferativa, Secretora e Menstrual. A Fase Proliferativa é caracterizada pelo aumento da concentração de estrógeno e pelo espessamento do tecido endometrial. Essa hiperplasia do endométrio ocorre em função da proliferação do estroma e das células epiteliais. A Fase Secretora inicia-se, após a ovulação,

com a produção de progesterona pelo corpo lúteo. Nesta fase, se não ocorrer a fecundação, o corpo lúteo atrofia e a produção de progesterona é interrompida. Caso contrário, a produção do hormônio continua para suportar a gestação. Na ausência de gestação, a diminuição da progesterona induz ao aumento da síntese de prostaglandinas (PGs), as quais causam contrações das fibras miométriais e vasos, levando a isquemia do endométrio. Sem irrigação sanguínea suficiente para sua manutenção, as camadas mais externas do endométrio (média e superficial), que atingiram seu espessamento máximo, sofrem descamação acompanhada por sangramento, originando o fluído menstrual. As PGs, também, estão envolvidas nos mecanismos teciduais que estimulam: a ruptura do folículo ovulatório, a involução do corpo lúteo e a expulsão dos produtos de concepção durante o parto ou abortamento.

A menstruação apresenta aspectos semelhantes às doenças inflamatórias, na medida em que ocorre a produção de mediadores que induzem o edema dos tecidos, o influxo de leucócitos e a presença de células decíduais que se assemelham aos fibroblastos granulosa. Neste sistema em particular, a influência dos hormônios sexuais, principalmente estrógeno e progesterona, têm um grande peso na modulação dos eventos imunológicos e inflamatórios que podem intensificar os sinais e sintomas que caracterizam o período menstrual.

Para algumas mulheres, a quantidade do fluxo e/ou a duração da menstruação são mais intensas, provocando um quadro de aumento de sangramento. A perda de sangue de forma excessiva por vários ciclos menstruais consecutivos (acima de 80 ml) pode levar a problemas médicos e afetar a qualidade de vida. Como exemplo, mais de 50% das mulheres com menorragia desenvolvem quadros de anemia ferropriva. Menstruações abundantes prejudicam a qualidade de vida da mulher, necessitando de trocas frequentes de absorventes, interferindo nas atividades do dia-a-dia, podendo causar alterações de humor, modificar negativamente seu convívio social, além da associação frequente com dolorosas cólicas menstruais, conhecidas como dismenorrea (MORTOLA, 1998; SANTIAGO *et al.*, 2002; WONG, 2011; GUMANGAR; KWAME-ARYEE, 2012).

A dismenorrea, dependendo da origem, é classificada como primária (intrínseca, essencial ou idiopática) se ocorrer em mulher sem doença pélvica; e secundária (extrínseca, adquirida) se estiver relacionada a uma afecção orgânica

pélvica como leiomioma uterino, doença inflamatória pélvica, ou presença de dispositivo contraceptivo intrauterino (Bastos & Borges, 2002; WALLACE; KEIGHTLEY; GIE, 2010).

Estudos mostram que tanto o sangramento menstrual excessivo quanto a dismenorrea estão relacionadas com alterações nas concentrações das prostaglandinas F2 α (PGF2 α) e E2 (PGE2) produzidas no útero (DEB; RAINE-FENNING, 2008). Além disso, em mulheres que apresentam anormalidades no período menstrual, a presença de citocinas pro-inflamatórias parece estar relacionada com a produção e liberação de PGs, contribuindo deste modo com as alterações fisiológicas relacionadas com os distúrbios de menstruação (MA *et al.*, 2013). Algumas destas citocinas já foram identificadas no endométrio durante o ciclo menstrual e estão vinculadas com a destruição e reparação do tecido endometrial, como por exemplo, as Interleucinas IL-1 β , IL-6 e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (ARICI *et al.*, 1993).

Em função das características inflamatórias dos distúrbios da menstruação e da atividade inibitória dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) sobre a síntese de PGs, a utilização desse tipo de fármaco continua sendo um dos tratamentos mais indicados para mulheres acometidas por sangramentos excessivos e dismenorreias. Os AINE parecem reduzir a síntese de prostaglandinas no útero, levando à vasoconstrição. O ácido mefenâmico reduz o fluxo menstrual de 20 a 46% em pacientes com menstruações cronicamente abundantes. Outros AINEs como: ibuprofeno, ácido meclofenâmico também reduzem o fluxo menstrual. Os AINEs ainda têm a vantagem de restringir as cólicas menstruais, principalmente quando utilizados no início da menstruação e mantidos por até 24 h, dependendo do perfil farmacocinético (NELSON & TEAL, 2007). Entretanto, o uso dos AINEs também podem causar efeitos colaterais graves como: danos renais, úlceras gástricas, doenças hepatotóxicas, e outros tipos de enfermidades, principalmente quando utilizados de forma crônica (KUMMER, COELHO, 2002).

Dessa forma, considerando os riscos envolvidos na utilização dessa classe de medicamentos, a busca por novos compostos alternativos mais seguros e eficientes, e que possam propiciar o controle dos sintomas provocados pela produção de mediadores inflamatórios durante a menstruação, tem se tornado de extrema importância. Nos últimos anos, a indicação da fitoterapia

como alternativa ao uso dos AINEs intensificou-se, principalmente em função das vantagens relacionadas quanto a sua utilização. Os fitoterápicos, normalmente, tem um potencial de atividade elevado porquanto são constituídos por diversidade de compostos que atuam de forma sinérgica ao interagirem em alvos diferentes. Além disso, os fitoterápicos normalmente apresentam riscos menores de efeitos colaterais e possuem custos de comercialização mais acessível aos pacientes (YUNES, 2001).

A utilização de produtos naturais no tratamento de distúrbios menstruais tem sido aplicada em diferentes povos, há séculos. Há registros que mostram que algumas culturas têm utilizado os óleos essenciais extraídos de plantas como, lima (*Citrus aurantiifolia*), alfavação (*Ocimum gratissimum*), gengibre (*Zingiber officinale*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) para o tratamento da dismenorreia, uma vez que exercem propriedades relaxantes sobre a musculatura lisa do endométrio. Já os compostos quercetina, estragole, bisabolol, limoneno e eugenol, presentes nestes fitoterápicos, agem sobre as vias das prostaglandinas (YASSIN, 2012).

Com base nestes estudos e no relato de que povos indígenas do Brasil utilizam o suco do limão para o controle do fluxo menstrual, nosso grupo de pesquisa realizou entre os anos de 2013 a 2014 um ensaio piloto para analisar quais os efeitos da citroterapia, baseada no uso do limão Taiti (*Citrus latifolia*), durante o período menstrual. Demonstrou-se que o uso deste citrus foi capaz de reduzir a duração e a intensidade da menstruação excessiva, a ocorrência de dismenorreia e a presença de coágulos (ANDRADE, 2015). A escolha do limão Taiti neste trabalho foi norteada pela obtenção de melhores resultados em testes empírico prévios, realizados durante a fase de definição do tipo de citrus, utilizando algumas espécies de limões e laranjas mais comuns encontradas na região.

Apesar de termos encontrado um efeito clínico significativo com o uso da citroterapia com limão Taiti no controle das disfunções menstruais, permaneceu ainda uma grande lacuna de conhecimento em relação aos mecanismos biológicos envolvidos neste processo. Embora as formas de atuação não sejam conhecidas, a modulação da cascata de produção dos ácidos araquidônicos é uma das possibilidades. Deste modo, para contribuir com a elucidação dos mecanismos envolvidos, propomos estudar o efeito do suco do limão Taiti na

produção de PGs e de citocinas pró-inflamatórias em mulheres sem alterações menstruais, no início da menstruação.

2. OBJETIVOS

Comparar os efeitos do suco do limão Taiti (*Citrus latifolia*) em relação ao anti-inflamatório Meloxicam na produção de mediadores inflamatórios (prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias) locais e sistêmicos no início da menstruação, por mulheres sem alterações de ciclo menstrual.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O estudo foi realizado de acordo com os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos do tratamento com limão ou Meloxicam nas concentrações de prostaglandinas F2 α e E2 do fluido menstrual em relação ao grupo sem intervenção.
- Comparar os efeitos do tratamento com limão ou Meloxicam nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α do soro e do fluido menstrual, em relação ao grupo sem intervenção.
- Comparar o efeito dos tratamentos na produção *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , utilizando cultivo celular de células totais do sangue periférico suplementadas com os soros de sangue periférico das próprias voluntárias.

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O ENDOMÉTRIO E O CICLO MENSTRUAL

O endométrio é a mucosa constituída por diversos tipos celulares, como células epiteliais, células mesenquimais, glândulas tubulares e fibroblastos entre outras, que reveste a cavidade uterina. De acordo com a sua fisiologia e características morfológicas, o endométrio pode ser dividido em duas regiões: uma inferior ou basal, de estrutura constante que contém glândulas pouco proliferativas, e uma superior ou funcional, onde ocorrem as alterações estruturais que permitem a implantação do óvulo fecundado e o desenvolvimento da placenta (revisado por HENRIET; CHEVRONNAY; MARBAIX, 2012).

A estrutura do endométrio humano sofre modificações teciduais durante o ciclo reprodutivo, as quais são atribuídas principalmente às alterações nas concentrações dos hormônios estrógeno e progesterona (SALAMONSEN; ZHANG; BRASTED, 2002). O ciclo menstrual humano tem duração média entre 24 a 38 dias e é dividido em três fases: Fase Proliferativa, Fase Secretora e Fase Menstrual, sendo esta última decorrente da ausência de gravidez.

No início da Fase Proliferativa, um pequeno pico da produção do hormônio folículo estimulante (FSH) na circulação induz a proliferação da camada de células granulosas dos ovários, estimulando a divisão celular, a esteroidogênese e a expressão de receptores do hormônio luteinizante (LH) no folículo em desenvolvimento (ANDERSEN; EZCURRA, 2014). Concomitantemente, ocorre o início da síntese de LH, que atua sobre as células da teca folicular, convertendo o colesterol em androstediona e posteriormente, através da atividade do sistema enzimático de aromatases, originando o estrógeno, (revisado por TARABORRELLI, 2015). O LH e o estrógeno atuam em sinergismo com o FSH na manutenção do crescimento e da maturação folicular, dando início ao fenômeno da ovulação (SULLIVAN *et al.*, 1999), Neste processo, o LH também é responsável por induzir o início da secreção de progesterona pelas células granulosas e tecais. O estrógeno, por sua vez, induz a proliferação do tecido endometrial estimulando a divisão das células epiteliais e estromais, resultando

no aumento de espessura em função do crescimento progressivo das glândulas e dos vasos sanguíneos.

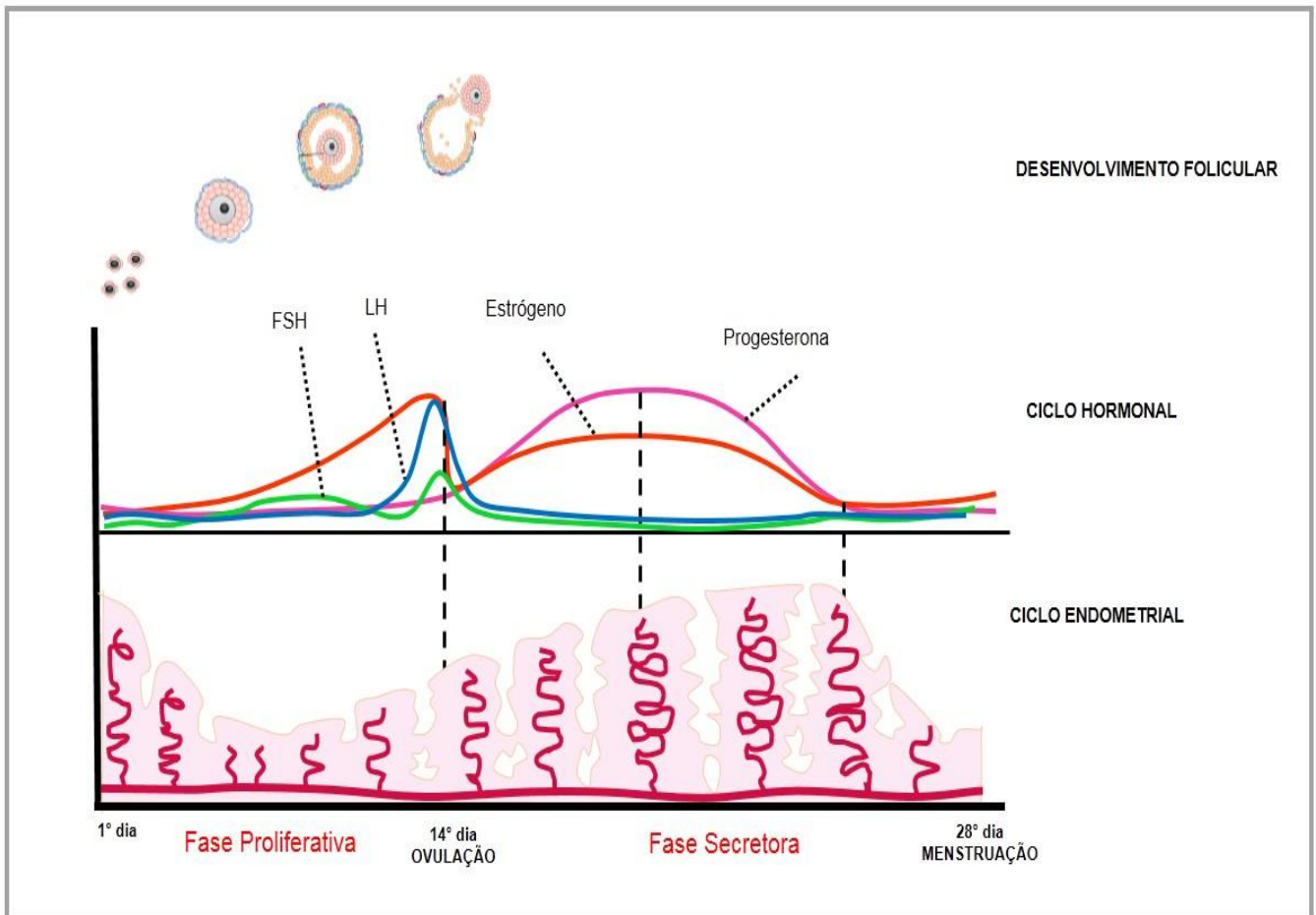
Em conta-partida, a Fase Secretora é caracterizada pela rápida queda na secreção de LH e FSH e pelo aumento abrupto da concentração de progesterona, o que torna o folículo altamente vascularizado (OWEN, 1975). O corpo lúteo, por ação de fatores angiogênicos contidos no fluido folicular, converte o colesterol em progesterona, já que na fase Proliferativa sua concentração é inicialmente baixa e pode variar de acordo com a secreção pulsátil de LH (revisor por TARABORRELLI, 2015). A progesterona tem seus receptores localizados nas células epiteliais do endométrio, sendo que muitas das funções do tecido são controladas pela concentração deste hormônio (JABBOUR *et al.*, 2006). Como consequência da alta concentração de progesterona, ocorre o aumento exponencial da proliferação e diferenciação tecidual do endométrio, o qual passa a apresentar glândulas cada vez mais tortuosas. Ao final desta fase, se estabelece a diferenciação das arteríolas do endotélio e a decidualização das células estromais das regiões perivascular e do epitélio superficial do endométrio. Em caso de ausência de implantação do embrião, há a regressão funcional, estrutural e morfológica do corpo lúteo (luteólise) e a redução do nível de progesterona, induzindo a necrose focal do endométrio e o início da menstruação (HENRIET; CHEVRONNAY; MARBAIX, 2012).

A fase de Luteólise parece ter evoluído em algumas espécies como mecanismo para aumentar a eficiência reprodutiva, pois em mamíferos com ciclos menstruais regulares, o corpo lúteo formado após a ovulação é removido do ovário por esse processo, permitindo, sucessivamente, a continuidade de novos ciclos (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999).

A Fase Menstrual é caracterizada pelo decréscimo nos níveis de progesterona, o que ocasiona alterações drásticas na estrutura endometrial. Tais alterações induzem a constricção de arteríolas que mantém o fluxo sanguíneo na camada funcional do endométrio que, uma vez interrompido, provoca a decomposição do tecido endometrial (Figura 1) (CHENG *et al.*, 2007). A diminuição da progesterona também está relacionada com a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas (PGs), fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF) e metaloproteinases (MMPs), os quais destroem a matriz intersticial do endométrio, ocasionando desse modo o sangramento característico da menstruação (HICKEY; FRASER, 2006).

Figura 1: Esquema do ciclo menstrual. Ação dos hormônios hipofisários (FSH e LH) e uterinos (Estrógeno e Progesterona) ao longo do ciclo menstrual, atuando no desenvolvimento da célula germinativa e na modulação da proliferação do tecido endometrial.



(Fonte: modificado de <http://creafampuebla.com/2015/09/23/ciclo-menstrual-y-ovulacion/>).

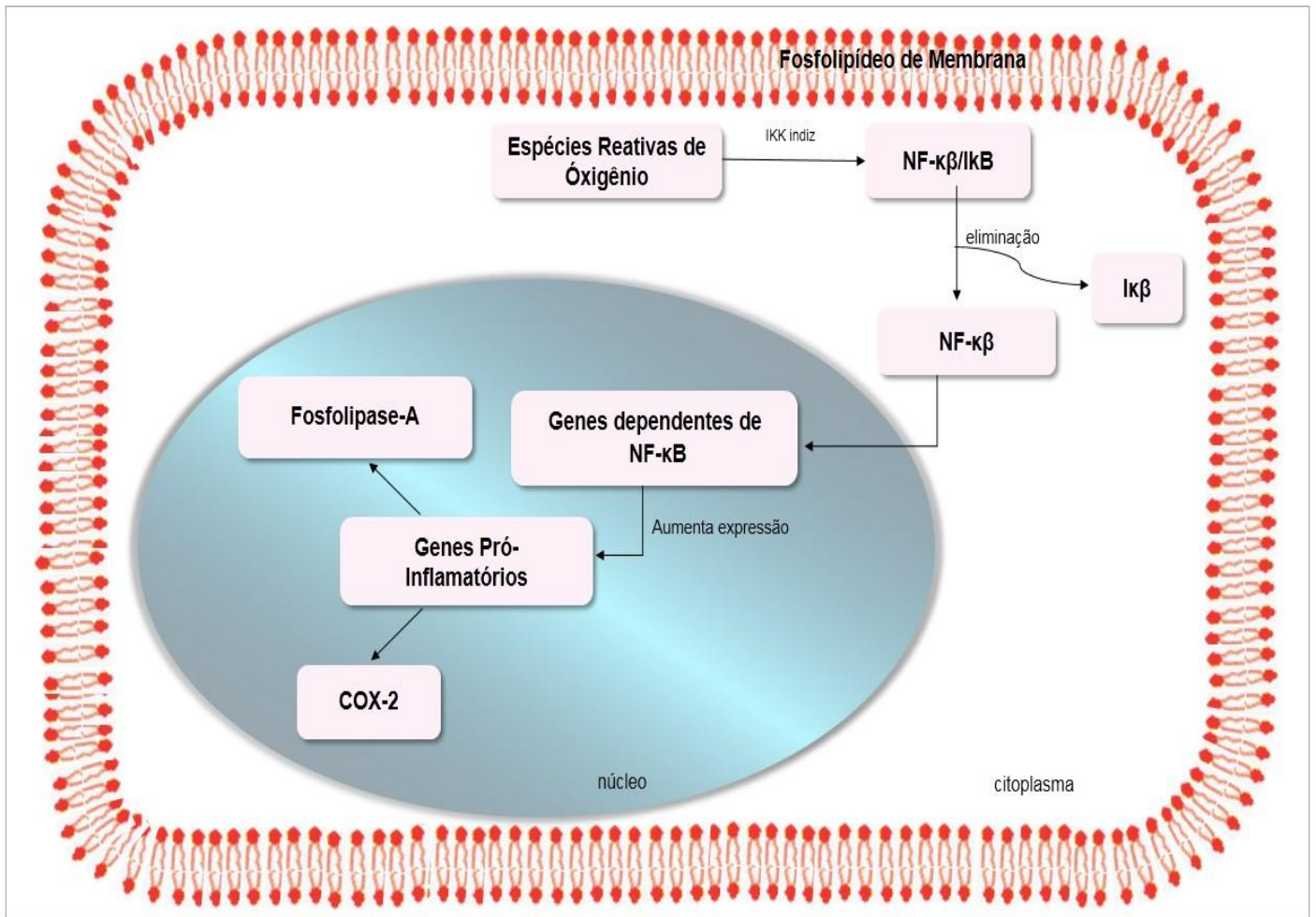
3.2 PAPEL DAS PROSTAGLANDINA NO CICLO MENSTRUAL

Na maioria das espécies de primatas, a regressão do corpo lúteo é iniciada pela síntese de prostaglandinas no útero, principalmente as do tipo F2 α e E2. Deste modo, as prostaglandinas medeiam mudanças que resultam na ruptura do folículo e no derramamento do endométrio na menstruação (FUCTTS, 1987). Um dos seus primeiros efeitos é inibir a esteroidogênese, que foi iniciada durante a fase Proliferativa e estimulada pelos hormônios ovarianos e hipofisários. Para isso, as prostaglandinas impedem o transporte de colesterol através da membrana da mitocôndria folicular, levando a consequente inibição da síntese de progesterona entre as fases Secretora e Menstrual (PATE; KEYES, 2001).

Ao final da fase Secretora, com a diminuição da concentração de progesterona, diminui a ação enzimática da Superóxido Desmutase (SOD), que por sua vez, atua na proteção do tecido contra os danos ocasionados pela produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (SUGINO *et al.*, 2004) (Figura 2). A alta concentração de ROS no endométrio ativa a via do Fator de Transcrição NF- κ B, que normalmente encontra-se presente no citoplasma na forma inativa, ligado a uma proteína chaperona inibidora (I κ B) (GLOIRE *et al.*, 2006).

A via de transcrição do fator NF- κ B regula as respostas inflamatórias em diversos tipos de células durante o ciclo menstrual (EVANS; SALAMONSEN, 2013). Estudos de Wissink *et al.* (1998) demonstram que a progesterona, quando ainda presente em altas concentrações, impede a ativação do NF- κ B através da estimulação da proteína inibidora I κ B (Figura 2). Dessa forma, quando a produção de progesterona é inibida, a ativação de NF- κ B acontece através da indução da enzima I κ B-cinase (I κ K), a qual fosforila I κ B na posição Serina32 e Serina36, que são subsequentemente degradadas (BONIZZI; KARIN, 2004). Sendo assim, o NF- κ B fica livre da interferência do inibidor I κ B e, uma vez ativo, transloca-se para o núcleo, e inicia a transcrição das enzimas ciclooxigenase (COX), fosfolipase-A2 (PLA₂), e citocinas pró-inflamatórias (revisado por BURG; SAAG, 1996), contribuindo assim para a inflamação intensa durante o período menstrual (BONIZZI; KARIN, 2004; SUGINO, *et al.* 2004).

Figura 2: Síntese de COX-2 e Fosfolipase-A2 a partir da ativação do fator de transcrição NF- κ B, através do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio.



(Fonte: Autor)

A COX-2, é a principal enzima da via de síntese de prostaglandinas no endométrio (BURG; SAAG, 1996; SUGINO *et al.*, 2004; EVANS; SALAMONSEN, 2012). Existem duas isoformas para a COX: COX-1, que é expressa constitutivamente em vários tecidos e a COX-2, cuja expressão é induzida. Ambas as isoformas catalisam as reações de oxigenação responsável pela transformação do ácido araquidônico formado a partir de fosfolípidios da membrana celular (KANG *et al.*, 2004). A COX-2 desempenha um papel central na inflamação, uma vez que sua expressão é induzida nos tecidos por ação de fatores físicos, químicos, inflamatórios, traumáticos e mutagênicos que estimulam a produção de hormônios (LH, FSH), citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) e fatores de crescimento (VEFG) (KUMMER, 2002).

Em decorrência do processo de necrose das células do endométrio pela diminuição da progesterona, a enzima PLA₂ se transloca para a membrana celular e libera o ácido aracdônico, o qual é o precursor para a produção de prostanóides (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011) (Figura 2). Através da ação da COX-2, o ácido aracdônico é metabolizado, resultando na formação da prostaglandina intermediárias G2 (PGG2) e H2 (PGH2), a qual é metabolizada por PG-sintetases para formar prostaglandinas ativas, como por exemplo, PGF2 α e PGE2 (FUNK, 2001; WYMAN; SCHNEITER, 2008). Em função da produção de COX-2 ser possivelmente dependente da diminuição de progesterona, sugere-se, que sua alta concentração, em conjunto com o estrógeno, constituem barreiras para a síntese de prostaglandina pelas células do endométrio (BAIRD *et al.*, 1996). Desta forma, as prostaglandinas, somente, são formadas no final da fase Secretora e início da fase Menstrual.

Além da via direta, as PGs podem ser sintetizadas por um grupo de aldoceto redutase (AKRs), as quais pertencem a uma família de proteínas monoméricas óxido redutase NADPH-dependente presentes em quase todos os organismos (PENNING, 2015). As subfamílias AKR1B1 e AKR1C3 possui função de PG-sintase, podendo eficientemente sintetizar PGF2 α , através da redução de PGH2 provindo da via de síntese da COX (Figura 3) e, a literatura relata que o estímulo tanto de AKR1B1 ou AKR1C3 no endométrio podem ser induzidas por IL-1 β (RIZNER, *et al.*, 2012; ANKO *et al.*, 2015). Além disso, a estimulação de AKR1B1 por IL-1 β pode potencializar a ativação de NF- κ B e, dessa forma, levar a um ciclo inflamatório vicioso. Ambas as enzimas, AKR1B1 e AKR1C3, estão presentes no endométrio durante o ciclo menstrual, sendo que AKR1B1 encontra-se facilmente localizada no epitélio glandular e nas células do estroma e, AKR1C3 está principalmente nas células epiteliais (BRESSON *et al.*, 2016). No estudo de Kang *et al.*, (2006), foi demonstrado que a expressão de AKR1B1 foi associada com a alta taxa de síntese de PGF2 α em mulheres que apresentam distúrbios como endometriose e por células estromais do tecido decidualizado.

Depois de formadas, as PGs são exportadas para fora da célula e podem se ligar e ativar seus receptores específicos de membrana associados à proteína G. Ao interagir com seus receptores, as PGs ativam uma variedade de vias de sinalização intracelular envolvidas na expressão de genes que codificam o fator

de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimulando a inflamação, proliferação e angiogênese (SINREIH *et al.*, 2015).

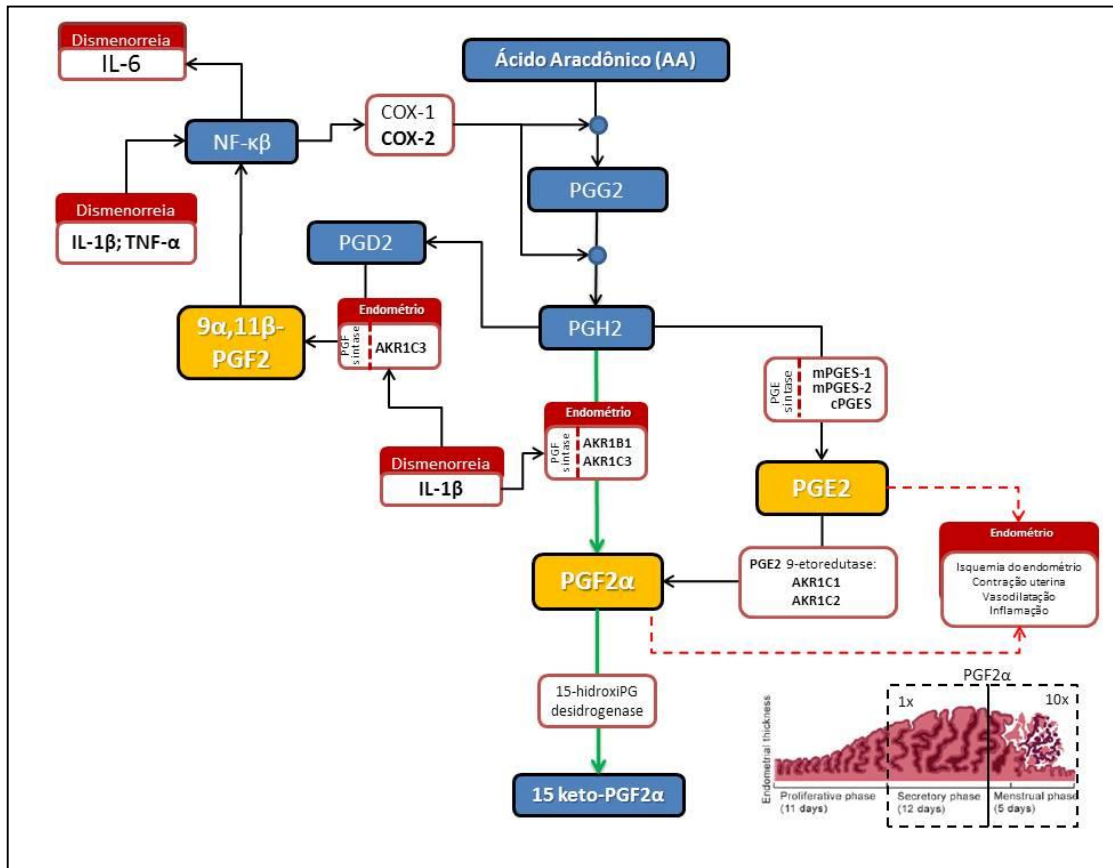
A PGF2 α medeia a constrição das artérias espiraladas que contribui para a hipóxia no endométrio (FAN *et al.*, 2008) e estimula as contrações do músculo liso que causam o derramamento na menstruação. Já a PGE2 é responsável pela dilatação de vasos sanguíneos do endométrio em conjunto com a quimiocina IL-8, aumentando a eficácia do recrutamento de leucócitos para o tecido (COLDITZ, 1990). Os efeitos opostos da vasoconstrição e vasodilatação produzidos respectivamente pela PGF2 α e PGE2, contribuem para a necrose celular endometrial, resultando na descamação do tecido na forma da menstruação. A prostaglandina I2, por sua vez, está envolvida na nocicepção da dor menstrual, e se encontra presente em níveis elevados no fluido menstrual de mulheres com dismenorreia (EVANS; SALAMONSEN, 2012).

3.3 DISTÚRBIOS DO CICLO MENSTRUAL

A menstruação representa um exemplo de regulação endócrina precisamente controlada do tecido endometrial (MORTOLA, 1998). No entanto, para aproximadamente 72% das mulheres, a intensidade, a duração da menstruação e a presença de dor fogem da normalidade, sendo deste modo considerado como eventos adversos (SANTIAGO *et al.*, 2002).

O sangramento em excesso durante a menstruação é um distúrbio grave, que, em função da alta quantidade de conteúdo sanguíneo perdido, acima de 80 mL por ciclo, pode levar a casos graves de anemia. (SAEED; SURIA, 1986). As etiologias dessa disfunção podem ser divididas em três categorias: doenças pélvicas estruturais, doenças sistêmicas e sangramento uterino disfuncional (SUD).

Figura 3: Síntese de prostaglandinas a partir da diminuição da produção de progesterona e da indução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) durante o ciclo menstrual.



(Fonte: Autor.)

As doenças pélvicas estruturais representam a maioria dos casos, podendo ser provocadas por miomas, adenomionas, pólipos endometriais, carcinomas endometriais e hipertrofia miometral (OBSTETRICS, 1992). As doenças sistêmicas representam uma porção muito pequena de casos de menorragias, sendo as condições mais comuns os distúrbios da coagulação, tais como trombocitopenia, trombocitopatias e doença de Von Willebrand. Nestes casos, é possível que parte do mecanismo seja mediado por erros no metabolismo do tromboxano (OBSTETRICS, 1992). Já o sangramento uterino anormal, sem causa orgânica demonstrável (genital ou extragenital), é considerado um diagnóstico de exclusão, provavelmente relacionado à alterações hormonais.

A menstruação é um evento autolimitado porque ocorre descamação do endométrio estruturalmente estável por apropriada ação sequencial de estrogênio e progesterona, à qual se seguem mecanismos de coagulação que “selam” as

áreas de sangramento expostas. As modulações hormonais inadequadas impedem essa ação sequencial do estrogênio e progesterona e, conseqüentemente, comprometem a descamação e a hemostasia endometrial, levando ao SUD (SMITH *et al.*, 1981; VAN EIJKEREN *et al.*, 1992).

A hemostasia endometrial normal se dá por meio de agentes procoagulantes e anticoagulantes, fibrinolíticos e antifibrinolíticos, é responsável pela limitação da perda sanguínea durante a menstruação (DAVIES; KADIR, 2012). O processo de hemostasia é alcançado em dois estágios: (I) ativação e agregação de plaquetas para a formação de um tampão no local lesionado e (II) deposição de fibrina, a qual possibilita a formação da rede plaquetária (CHRISTIAENS, 1996). A menorrágia poderia ser o reflexo de desarranjos deste processo de hemostasia, e estar intimamente relacionados com o desequilíbrio na secreção de mediadores inflamatórios que proporcionam maior vasodilatação, dificultando o processo de reparo tecidual (CHRISTIAENS; SIXMA; HASPELS, 1980).

A dismenorreia é outro tipo de distúrbio menstrual que provoca intensos quadros de dor e sintomas secundários que podem ocorrer antes do início da menstruação e perdurar por alguns dias (MORTOLA, 1998; SANTIAGO *et al.*, 2002). Dependendo da origem, a dismenorreia pode ser classificada em primária e secundária. A dismenorreia primária é subdividida em: dismenorreia espasmódica e dismenorreia congestiva. A dismenorreia espasmódica consiste em espasmos de dor na região abdominal, na região lombar ou parte interna das coxas, tendo início no primeiro dia da menstruação. Já a dismenorreia congestiva induz sintomas de dor na parte inferior do abdômen no período que antecede a menstruação, além de letargia, depressão e irritabilidade (CHESNEY; TASTO, 1974). A dismenorreia secundária pode ocorrer em função de distúrbios ginecológicos como a endometriose, adenomiose, miomas uterinos, pólipos endometriais entre outros (KOLHE; DEB, 2011). Geralmente esse distúrbio começa alguns anos após a menarca, sendo que em algumas mulheres podem desenvolver um síndrome de dor crônica de difícil tratamento (WONG, 2011; GUMANGAR; KWAME-ARYEE, 2012).

Estudos mostram que tanto os sangramentos excessivos de causas não estruturais quanto a dismenorreia primária são acometidos por alterações nas concentrações de mediadores inflamatórios, como por exemplo, as

prostaglandinas F2 α e E2 (DEB; RAINE-FENNING, 2008). As quantidades de PGs produzidas por mulheres com dismenorreia é muito maior em relação as não acometidas por essa disfunção (JOHNSON, 2006). A PGF2 α , em conjunto com leucotrienos, pode aumentar a sensibilidade das fibras musculares no útero de mulheres com dismenorreia. Além disso, em função de um padrão anormal de contração, a pressão intrauterina pode exceder os 60 mmHg, aumentando a intensidade de dor (DEB; RAINE-FENNING, 2008). Dessa forma, a intensa produção de PGF2 α no endométrio poderia ser o reflexo de fortes contrações do músculo liso uterino, comprometendo o fluxo sanguíneo e aumentando os sintomas de dor (MA *et al.*, 2013).

Por outro lado, em pacientes com diagnóstico de SUD, a quantidade de prostaglandinas produzidas pelas células endometriais é reduzida pela pouca disponibilidade de seus precursores. Entretanto, os níveis de prostaglandinas vasodilatadoras, como PGE2 e PGI2, parecem estar presentes no tecido em maior quantidade em relação à prostaglandina vasoconstritora F2 α (SMITH *et al.*, 1981; RESS *et al.*, 1984). Não está totalmente esclarecido se estes distúrbios ocorrem em combinação no organismo da mulher. Evidências sugerem que as anomalias devem realmente ser múltiplas em alguns casos. Além disso, é provável que haja um fator indutor comum ou uma cascata de processos fisiológicos que desencadeie tais anormalidades (HICKEY; FRASER, 2006).

3.4 A RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO CICLO MENSTRUAL

O ciclo menstrual envolve a participação de diferentes mediadores inflamatórios e células do sistema imune que são recrutadas para o tecido endometrial. Estudos sugerem que o recrutamento leucocitário seja modulado ao longo do ciclo, dependendo da concentração dos hormônios estrógeno e progesterona. Isso se deve ao fato de que as alterações nas quantidades de leucócitos modificam-se durante a Fase Secretora, justamente quando ocorrem as mudanças perceptíveis nos níveis destes hormônios (EVANS; SALAMONSEN, 2012; NOWAK; BORKOWSKA; PAWLOWSKI, 2016).

Em seres humanos, o aumento do influxo de leucócitos no endométrio ocorre pouco antes da menstruação, sendo coincidente com a queda da progesterona (SALAMONSEN; ZHANG; BRASTED, 2002). Desta forma, a progesterona também poderia regular a migração leucocitária nos endotélios, uma vez que tem a capacidade de agir sob as células do tecido endometrial (GOTTSHALL, 1992).

Os leucócitos são predominantes no endométrio de várias espécies de animais (BAUER, 2001). O número total de células do endométrio sofre alterações em função da migração celular para o tecido epitelial durante a Fase Secretora ou por apoptose que ocorre durante o derramamento da camada funcional do endométrio na Fase Menstrual (SALAMONSEN; ZHANG; BRASTED, 2002; THIRUCHELVAM *et al.*, 2012). A migração de populações de leucócitos para o endométrio é um processo que envolve a expressão de moléculas de adesão, além da produção de quimiocinas e citocinas que atuam em receptores específicos presentes no tecido (SCHALL; BACON, 1994; GARCÍA-VELASCO; ARICI, 1999). A permeabilidade dos vasos sanguíneos é modulada, principalmente, pela presença de prostaglandinas E2 e F2 α , as quais têm sido implicadas no controle do tonus dos vasos sanguíneos antes e durante a menstruação (JONES *et al.*, 1997) e, dessa forma, regulam a quantidade de células migratórias presentes no tecido.

A IL-8 é uma das principais quimiocinas que regulam a quimiotaxia periovulatória, atuando no recrutamento de neutrófilos e linfócitos T, além de induzir a angiogênese e ter propriedades mitogênicas. A IL-8 também está envolvida no processo de derramamento do endométrio da Fase Menstrual. As células inflamatórias recrutadas para o tecido pela IL-8 produzem metaloproteinases que degradam a matriz extracelular, dando início aos eventos da descamação tecidual da menstruação (GARCÍA-VELASCO; ARICI, 1999; YUE *et al.*, 1994; MULAYIM, 2002). O estudo de Maybin *et al.* (2011) demonstrou que existem alterações significativas na expressão do RNA mensageiro de IL-8 durante todo o ciclo, com expressão máxima durante o derramamento menstrual. A expressão de IL-8 também é induzida em células epiteliais em condições de hipóxia. Além disso, a prostaglandina E2 age em sinergismo com a IL-8,

umentando a infiltração de neutrófilos no tecido endometrial (MAYBIN *et al.*, 2011)

Outra quimiocina importante no ciclo menstrual é a Proteína-1 Quimiostática de Monócitos (MCP-1), a qual é responsável por recrutar e ativar macrófagos, linfócitos T e outras células como basófilos e células *natural killer* (NK). Sua produção, também, foi detectada no endométrio humano, onde exerce atividades equivalentes as da IL-8 (ARICI, *et al.*, 1993; GARCÍA-VELASCO; ARICI, 1999). Há evidências de que, durante a fase pré-menstrual, os fatores inflamatórios produzidos pelas células do estroma decidualizado do endométrio, quando da implantação do ovo, possam exercer papel essencial no recrutamento de leucócitos.

A presença dos leucócitos em quantidades exacerbadas, também, pode implicar no SUD. Os macrófagos podem liberar PGE2 aumentando assim a vasodilatação e, conseqüentemente, o sangramento. Além disso, os linfócitos T citotóxicos e as células NK secretam porfirinas, que podem atuar na degradação do endométrio vascular e de outras estruturas celulares, promovendo sangramento intenso (revisado por HICKEY; FRASER, 2006)

Outros fatores imunológicos, como as citocinas pró-inflamatórias, também estão presentes no endométrio para contribuir com os processos de decidualização, menstruação e a subsequente reparação endometrial. Algumas destas citocinas têm sido associadas com o aumento ou a inibição da decidualização, incluindo a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (ARICI *et al.*, 1993). As interações das citocinas pró-inflamatórias com o estrógeno e a progesterona causam modificações na morfologia do endométrio durante a fase pré-menstrual, culminando na degradação da matriz extracelular seguido de sangramento menstrual (MA *et al.*, 2013).

A IL-1 β é produzida, principalmente, por monócitos e desempenha papel importante na remodelagem do tecido em estado inflamatório. No endométrio humano, esta citocina foi detectada em células epiteliais e estromais, sendo mais expressa durante a fase secretora (KAUMA *et al.*, 1990). A IL-6 pode ser produzida por diferentes tipos de células do sistema imune e células da camada granulosa. Uma vez que é regulada pela presença do hormônio FSH,

desempenha importante papel na maturação do folículo germinativo. Já a redução dos níveis de IL-6 no endométrio pode estar relacionada com o ciclo menstrual irregular (ANGSTWURM; GÄRTNER; ZIEGLER-HEITBROCK, 1997).

O TNF- α é uma citocina pleiotrófica reconhecida como produto de muitos tipos de células que atua, principalmente, em processos de reparação tecidual. Já foi demonstrado que os hormônios esteróides femininos regulam a expressão do gene de TNF- α em camundongos e mastócitos uterinos humanos *in vivo*, bem como, em macrófagos de camundongos *in vitro* (HUNT et al., 1997).

Em conjunto, estes dados têm mostrado que os mediadores inflamatórios produzidos durante a menstruação exercem atividades distintas, porém complementares. O mesmo, também, foi observado em condições de distúrbios menstruais, quando há excesso de síntese destes mediadores e, conseqüentemente, em suas atividades. Ma *et al.*, 2013 demonstrou, que em mulheres com dismenorreia, ocorre o aumento da expressão e da transcrição dos genes IL-1 β , IL-6 e TNF- α logo no primeiro dia da menstruação. O aumento da produção destas citocinas foi correlacionado com a indução da síntese e da liberação de PGF2 α , resultando na hipercontratilidade uterina acompanhada por dor (MA *et al.*, 2013).

3.5 TERAPÊUTICA ANTI-INFLAMATÓRIA: MECANISMOS DE AÇÃO E DESVANTAGENS

A descoberta da ação das prostaglandinas endometriais na gênese dos distúrbios menstruais deu suporte aos estudos utilizando fármacos anti-inflamatórios como opção terapêutica para o tratamento da menorragia de causas não estruturais a da dismenorreia primária. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são utilizados para aliviar a dor, a febre e a inflamação (MENDES *et al.*, 2012). Tais atividades estão relacionadas com o papel inibidor destes fármacos sobre a ação enzimática da COX (MORAES, 2011), uma vez que bloqueiam o sítio ativo das COX-1 e COX-2, e dessa forma, inibem a produção de PGs (van EIJKEREN *et al.*, 1992).

O termo AINEs foi utilizado pela primeira vez na década de 1950, quando a Fenilbutazona, precursora dos fármacos anti-inflamatórios não-salicilatos foi

desenvolvida. Entre 1970 e 1980, após a elucidação dos mecanismos dos primeiros inibidores de COX, o número de AINEs aumentou exponencialmente. Para o tratamento dos distúrbios menstruais, se destacam o Diclofenaco, Ibuprofeno, Indometacina e Naproxeno (MUNRO, 2000). A utilização de medicações como AINEs diminui a quantidade de prostaglandinas produzidas no endométrio e no líquido menstrual. Essa classe de fármacos quando administrados no início da menstruação, não afetam o desenvolvimento endometrial mas diminuem a produção de prostaglandinas, o que resulta no alívio das dores ocasionadas pela produção dos mediadores inflamatórios (DAWOOD, 1995).

Os AINEs tradicionais são classificados como “não seletivos”, pois inibem ambos os subtipos de COX, apesar de seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos estarem ligados a inibição da COX-2 (HAYES; LEE, 2001). No entanto, a inibição da COX-1, principalmente a longo prazo, pode acarretar efeitos colaterais como gastropatias e nefropatias, uma vez que a enzima exerce funções protetoras nos sistemas gástrico e renal. Por sua vez, a inibição da COX-2 aparentemente resultaria apenas em efeitos anti-inflamatórios, sem causar problemas dessa natureza no organismo (BREDEMEIER *et al.*, 2014).

Por outro lado, quando se refere aos efeitos inibidores específicos de COXs no organismo feminino, existem estudos que também demonstram efeitos negativos na ovulação, decidualização, fertilização, implantação do óvulo e no parto (revisado por NORMAN *et al.*, 2004). Neste contexto, foi observado que camundongas fêmeas que não expressam COX-2 apresentaram inúmeras deficiências durante os processos reprodutivos. Esse resultado levou ao desenvolvimento da hipótese de que a ruptura da superfície no processo ovulatório estaria relacionada a um processo inflamatório dependente de COX-2 (revisado por SALHAB *et al.*, 2001). Nos estudos de Sookvanichsilp e Pulbutr (2002), os autores observaram que a administração de indometacina (inibidor não seletivo de COX-1 e COX-2) e celecoxib (inibidor específico de COX-2) em ratas grávidas reduziram significativamente o número de gestações bem sucedidas, bem como a decidualização uterina. Já a administração de Meloxicam - inibidor específico de COX-2 - também teve seus efeitos sobre a ovulação observada em coelhos, de forma dose/tempo dependente (NORMAN *et al.*, 2014)

Em conjunto, estes estudos mostram que os inibidores de COX devem ser utilizados com precaução por mulheres em idade fértil e com o desejo de engravidar, uma vez que a inibição da síntese de prostaglandinas exerce um papel crítico nos processos reprodutivos, especialmente na ovulação. Saliendo-se que estes fármacos podem intervir no processo reprodutivo sem induzir nenhuma alteração na função endócrina (SALHAB *et al.*, 2001; NORMAN *et al.*, 2014). Diante deste fato, pesquisas que buscam tratamentos alternativos que possam substituir o uso de anti-inflamatórios convencionais são de extrema importância para não interferir nos resultados para as mulheres que querem engravidar e necessitam fazer o uso de inibidores de COX ao longo da vida.

3.6 CITRUS- TRATAMENTO FITOTERÁPICO

A administração de anti-inflamatórios inibidores da via de síntese de prostaglandinas é amplamente utilizada na clínica como tratamento para a dismenorreia e as menorragias de causa não estrutural. No entanto, apesar da eficácia desses fármacos para tal finalidade, não existem garantias de que efeitos adversos graves não ocorram no organismo feminino. Frente a isto, estudos que buscam substitutos para o uso dos anti-inflamatórios não esteroidais são de extrema importância. A utilização de produtos naturais poderia proporcionar vantagens significativas sobre os tratamentos convencionais. A existência de múltiplos compostos presentes nas plantas que possuem efeitos sinérgicos, poderiam ampliar a eficácia do tratamento sem aumentar os riscos de efeitos colaterais (YUNES, 2001). Isso é possível visto que as plantas possuem compostos que atuam em diferentes moléculas-alvo das mesmas vias, proporcionando, em conjunto, os mesmos efeitos. Essa abordagem permite que doses menores desses compostos sejam usados para potencializar as ações farmacológicas sem acrescer a possibilidade de efeitos adversos.

Em estudos anteriores, mais de 2000 espécies vegetais foram utilizadas na América Latina, no Caribe, na África Subsaariana e na Ásia para tratar distúrbios uterinos variados tais como: sangramento excessivo, dismenorreia, miomas, regulação ou indução da menstruação, limpeza uterina, e expulsão da placenta. Contudo, apenas cerca da metade das espécies foram testadas quanto

aos seus efeitos farmacológicos, dos quais 48% e 31% mostraram alguma atividade espasmolítica ou espasmogênica uterinas, respectivamente. Os gêneros mais comumente utilizados foram os *Citrus*, *Senna*, *Phyllanthus* e *Gossypium* (ANDEL *et al.*, 2014).

As frutas cítricas contém compostos bioativos que incluem flavonóides, alcalóides, diosmina, hesperidina, cumarinas, sinefrinas limonóides, carotenóides, ácidos fenólicos e óleos essenciais. Tem sido demonstrado que estes metabólitos são de grande importância para a saúde, uma vez que podem ser aplicados como tratamento de diversas doenças, devido a grande diversidade quanto às suas propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, anti-neoplásicas e também cardioprotetoras (LV *et al.*, 2015). Os flavonoides, pertencem a uma classe de compostos polifenólicos de baixo peso molecular, podem atuar como varredores de radicais livres, moduladores de atividades enzimáticas, e inibidores da proliferação celular, bem como exercendo atividades antibiótica, antialérgica e anti-inflamatória. As propriedades anti-inflamatórias apresentadas pelos compostos diosmina e hesperidina são justificadas pela inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios, principalmente os derivados do ácido aracônico, prostaglandinas E2 e F2 α e tromboxano A2 (NOGATA *et al.*, 2006).

Dentre os *citrus*, o limão Taiti (*Citrus latifolia*) se destaca por ser um fruto tropical de fácil acesso, baixo custo e de grande consumo pela população brasileira. Além disso, o fruto possui em suas partes uma grande diversidade de compostos. No flavedo (ou epicarpo), estão presentes os carotenóides, vitaminas e óleos essenciais, enquanto que no albedo (ou mesocarpo), há abundância em hemicelulose, celulose, lignina, glicídeos solúveis, substâncias pécicas e flavonoides (MENDONÇA *et al.*, 2006). No endocarpo, ou polpa, existem vesículas de suco compostas por hemicelulose, celulose e o suco rico em vitamina C, glicídeos solúveis, sais minerais e compostos fenólicos, todos com propriedades terapêuticas (BEHLING *et al.* 2008). Alguns de seus compostos incluindo β -cariofileno, LIM, e linalol têm efeitos anti-inflamatórios comprovados (BENTO, 2001). O LIM, por exemplo, já foi demonstrado ser capaz de inibir a produção de PGE2 em macrófagos e diminuir os níveis de IL-1 β sistêmico de humanos (YOON *et al.*, 2010), o que sugere que o limão Taiti pode exercer

importantes propriedades anti-inflamatórias que podem ser investigadas em diversos tipos de doenças, incluindo os distúrbios menstruais.

Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, observamos uma ação do suco do limão Taiti na redução do fluxo menstrual em 72% das pacientes, tanto em relação ao número de dias de sangramento, quanto em volume de conteúdo menstrual perdido por dia. Em relação à presença de dismenorrea, 21% das pacientes que relataram cólicas menstruais não experimentaram os sintomas durante o consumo do suco do limão ao longo do estudo (ANDRADE *et al.*, 2015).

Diante do pressuposto que o limão Taiti possui em potencial complexa constituição agentes anti-inflamatórios, e que, estes podem influenciar no processo menstrual, buscamos através deste estudo investigar se a ação do suco deste limão neste processo ocorre através da regulação de síntese de importantes mediadores inflamatórios envolvidos no ciclo menstrual, como citocinas e prostaglandinas. Deste modo, este estudo teve como pretensão, fornecer mais subsídios teóricos a respeito dos mecanismos de ação relacionados com o consumo do suco do limão Taiti como alternativa para controle das disfunções menstruais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das Participantes

Para realização do estudo foram convidadas 45 voluntárias na faixa etária entre 18 a 40 anos de idade, as quais receberam as informações necessárias quanto aos procedimentos realizados para a pesquisa. Estes procedimentos foram desenvolvidos após concordância e assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Carlos (parecer nº 48233715.8.0000.5504). As voluntárias foram selecionadas de acordo com os critérios de inclusão e de exclusão descritos a seguir:

4.1.1 Critérios de Inclusão

- Voluntárias do sexo feminino.
- Ciclo menstrual anovulatório normal.
- Vida sexualmente ativa.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Para a obtenção dos resultados de acordo com a proposta da pesquisa, foram seguidos os seguintes critérios de exclusão:

- Presença ou histórico de qualquer doença ginecológica que cause alterações no ciclo menstrual, tais como miomas, endometrioses, dentre outras.
- Consumo de álcool ou fumo de qualquer natureza mais de 3 vezes semanais.
- Utilização de contraceptivo hormonal.
- Atividade física intensa ou modificação recente no padrão de atividade física.
- Presença ou histórico de neoplasia maligna, tratamento quimioterápico ou radioterápico;

- Presença ou histórico de imunodeficiência congênita, adquirida ou doenças autoimunes;
- Uso crônico de drogas tais como anti-inflamatórios não esteroidais, imunossupressores, ansiolíticos ou antidepressivos;
- Uso de quais quer tipo de anti-inflamatórios nos 15 dias antecedentes ao início do estudo;
- Ser portadora de doenças sistêmicas tais como insuficiência renal, insuficiência hepática, hipertensão, diabetes, hipertireoidismo, hipotireoidismo, dentre outras;
- Presença ou histórico de coagulopatias;
- Presença ou histórico de gastrite ou pirose;
- Alergia ao princípio ativo meloxicam ou a outros anti-inflamatórios não esteroidais;

4.2 Desenho experimental

As características relativas ao ciclo menstrual das voluntárias selecionadas foram levantadas por meio de questionário. Foram avaliadas as informações tais como: regularidade, padrão de fluxo, ocorrência de coágulos e presença de cólicas e, utilizadas como dados clínicos de referência. As voluntárias foram divididas em três grupos: Limão (G1 n=15), Meloxicam (G2 n=15) e Controle (G3 n=15). A divisão dos grupos foi realizada de forma aleatória, por meio da utilização de programa de randomização (<https://www.randomlists.com/>).

As voluntárias do grupo G1 (grupo Limão) receberam a orientação para exprimir todo o conteúdo do suco de um limão Taiti em um copo de água e beber logo em seguida. Os sucos foram ingeridos no início do sangramento e no segundo dia da menstruação, pela período da manhã e com pelo menos três horas de antecedência em relação à coleta das amostras. As voluntárias do grupo G2 (grupo Meloxicam) receberam dois comprimidos do anti-inflamatório Meloxicam® 15 mg (Novamed - Produtos Farmacêuticos Ltda, Manaus,

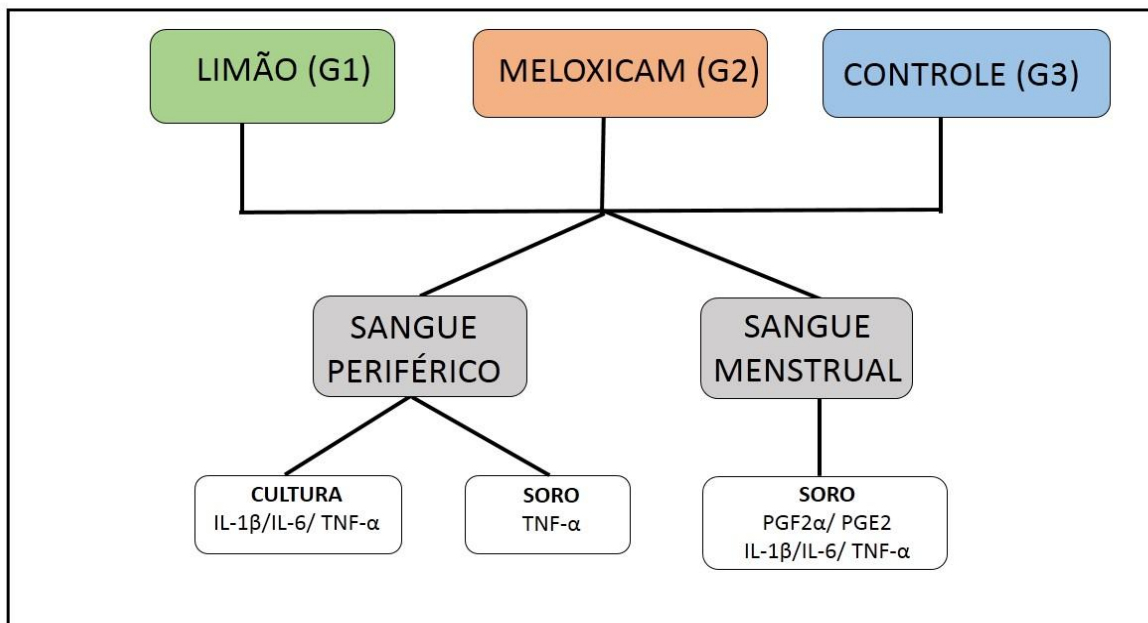
Amazonas, Brasil). O grupo G2 fez o uso do medicamento no início do sangramento e no segundo dia da menstruação, no período da manhã e também, respeitando o intervalo de três horas de antecedência em relação à coleta. Por fim, as voluntárias do grupo G3 (grupo Controle) foram orientadas a não fazer uso de nenhum tipo de anti-inflamatório e não consumir alimentos cítricos nos dois primeiros dias da menstruação.

Para obtenção das amostras do fluido menstrual, cada voluntária recebeu um coletor menstrual de uso individual (figura 4), os quais foram doados pela empresa Kevosai (Coletor Menstrual Lunette, Kevosai, Curitiba, Brasil). Todas as voluntárias receberam as orientações sobre a correta utilização do coletor, desde o primeiro uso até o momento da coleta. As coletas foram realizadas no segundo dia da menstruação, uma vez que, neste período, a literatura relata pico máximo de produção de prostaglandinas durante a menstruação. Dessa forma, as voluntárias dos três grupos compareceram ao Laboratório de Imunologia Aplicada (Departamento de Genética e Evolução- Universidade Federal de São Carlos-UFSCar) para a coleta do fluido menstrual e sangue periférico.

Figura 4: Coletores individuais recebidos pela empresa Kevosai®



Figura 5: Desenho experimental das coletas de sangue menstrual e periférico dos grupos G1, G2 e G3.



4.3. Cultura de Células Totais do Sangue Periférico

A coleta do sangue venoso foi realizada por um profissional habilitado por meio de venipuntura periférica em condições de assepsia, usando tubos sem anticoagulante (Vacutainer Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). e com o anticoagulante EDTA (EDTA- BD Vacutainer Biosciences). As amostras coletadas em tubos sem o anticoagulante foram empregadas na obtenção do soro autólogo utilizado na dosagem dos mediadores inflamatórios (PGF2 α , PGE2 e TNF- α) e na suplementação do cultivo das células do sangue total (figura 5).

As amostras de sangue periférico coletadas em tubos com EDTA foram diluídas na proporção 1:1, com meio de cultura RPMI (1640, GIBCO Life Technologies, USA), suplementado com L-glutamina (concentração final de 2 mM), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg /ml) e cultivadas em placas de cultura de 6 poços (modelo K12-006, Kasvi) a 37 °C, sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células contidas em dois dos poços foram

suplementadas com soro fetal bovino 10% (Life Technologies, USA) inativado pelo calor (56 °C por 30 min), enquanto que as células de outros dois poços foram suplementadas com 10% do soro da própria voluntária obtido no passo anterior. Em um dos poços contendo o SFB e o soro da voluntária, as células foram estimuladas com 10 ng/ml de LPS de *E coli* (K12, InvivoGen, San Diego, CA, EUA). Os outros poços restantes foram utilizados como controle. Após o período de 24 horas, os conteúdos coletados de todos os poços foram centrifugadas a 1000x g por 10 minutos em temperatura a 4°C, sendo que o sobrenadante obtido foi armazenado a -80 °C até a finalização de todas as coletas.

4.4 Obtenção do Soro Periférico

As amostras de sangue periférico coletadas com tubos isentos de anticoagulante EDTA foram centrifugadas após 20 minutos da realização da coleta, à 1000x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O material foi utilizado tanto para o cultivo de células totais do sangue periférico (como descrito no item 4.3) quanto para a quantificação posterior dos mediadores pró-inflamatórios.

4.5. Obtenção do Soro Menstrual

O fluido menstrual armazenado no coletor foi vertido em um tubo plástico estéril de 15 mL e centrifugado a 1000x g por 10 minutos, a temperatura ambiente, para a obtenção do soro do fluido menstrual. Todas as amostras de soro foram armazenadas em freezer a -80°C até que todas as coletas de cada grupo fossem realizadas.

4.6 Quantificação de Prostaglandinas

A quantificação da produção das prostaglandinas F2 α e E2 nas amostras de soro de fluído menstrual foram realizadas utilizando os Kits ELISA KHL1731 e KHL1701 (Biosource, Caramillo, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para melhor quantificação destes mediadores, as amostras foram diluídas em 1/100. As absorbâncias das amostras foram detectadas em leitor de placa (Asys UVM 340, Holliston, MA, EUA) em comprimento de onda a 450 nm.

4.7 Quantificação de Citocinas

As quantificações das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β , IL-6 e TNF- α presentes no sangue periférico, no soro do fluído menstrual e no sobrenadante celular foram realizadas pela técnica de ELISA utilizando os kits CHC1213, CHC1263 e CHC1753 (Invitrogen- Caramillo, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Através de testes prévios, foram escolhidas as seguintes diluições para cada tipo de amostras: (I) Soro Menstrual: 1/100; (II) Cultura Celular: 1/5 e (III) Soro Periférico: 1/10. As quantificações das absorbâncias das amostras foram realizadas em leitor de placas (Asys, UVM 340) em comprimento de onda de 450 nm.

4.8 Obtenção dos Leucócitos da Cultura de Células Totais

Após 24 horas de cultivo, as células totais foram retiradas dos poços da placa de cultura. As células aderentes foram desprendidas da superfície dos poços por meio de repetidas lavagens com solução fisiológica gelada, obtendo assim todas as células que estavam presentes em casa amostra cultivada. Em seguida, as células foram transferidas para tubos plásticos de 15 mL e centrifugadas a 1000x g por 10 minutos. Após esse processo, foi observado uma pequena faixa “esbranquiçada” no tubo, a qual correspondia aos leucócitos que ficaram localizados entre o sobrenadante e a camada de hemácias. Os leucócitos foram transferidos por pipetagem para microtubos, onde foram novamente lavados com 500 μ L de solução fisiológica gelada e centrifugados à 1000x g por

10 minutos. O sobrenadante obtido foi retirado e foi adicionado às células, 500 µL de tampão de lise (NH_4Cl [0,144M] / $[\text{NH}_4]_2\text{CO}_3$ [0,01M]: 3,85g NH_4Cl + 0,395g $[\text{NH}_4]_2\text{CO}_3$ em 500 mL água ultra pura) para eliminação de hemácias. Após permanecerem por 10 minutos com o tampão a 4°C, as amostras foram centrifugadas a 1000x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, posteriormente, foram feitas 5 lavagens com solução fisiológica gelada para a obtenção do pellet de leucócitos isentos de hemácias

4.9 Análise de Leucócitos por Citometria de Fluxo

Após a obtenção do *pellete* de leucócitos, foram adicionados 200 µL de solução fisiológicas a temperatura ambiente em cada amostra e, imediatamente as células foram submetidas à análise de citometria de fluxo. O procedimento foi realizado em citometro (BD Accuri™ C6 Plus) do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos).

A suspensão celular foi injetada no citômetro e os parâmetros de dispersão luminoso FSC e SSC foram utilizados para classificação do tipo celular de 400.000 eventos por amostra.

4.10 Análise Estatística

Os dados foram representados pela média, erro padrão da média, mediana, percentil 25 e percentil 75. Nos casos onde os dados seguiam a distribuição normal (segundo o teste de Shapiro-Wilk), as diferenças entre os grupos foram determinadas utilizando-se o teste estatístico ANOVA e o teste Newman-Keuls para as comparações múltiplas. Para os casos onde a normalidade não pôde ser garantida, os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis acompanhado pelo teste de Dunn para realização das comparações múltiplas. O software utilizado para as análises foi o GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Os testes foram considerados estatisticamente significantes quando o valor p foi inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Voluntárias

Para o estudo, foram convidadas e avaliadas 45 voluntárias que acordo com os critérios de exclusão e inclusão descritos anteriormente. No entanto, alguns impecílios fizeram com que algumas voluntárias não pudessem mais participar das coletas, como por exemplo, a ocorrência de gravidez. Dessa forma, foi realizada mais uma triagem de voluntárias para garantir o número correto de participantes.

Durante a triagem, foi aplicado um questionário para obter informações clínicas de referência sobre o ciclo menstrual de cada voluntária. Os dados obtidos foram referentes a: regularidade do ciclo; tempo de menstruação (em dias); presença de cólicas; eliminação de coágulos; uso de medicamentos para cólicas. A tabela 1 mostra dos dados obtidos de cada participante.

Tabela 1: Dados coletados através de questionário das voluntárias relativos ao ciclo menstrual: regularidade do ciclo, quantidades de dias de sangramento, presença de cólicas e eliminação de coágulos.

Paciente	Regularidade do Ciclo	Tempo de Menstruação (dias)	Presença de Cólicas	Eliminação de Coágulos	Uso de Medicamentos Para Cólica
P1	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P2	Sim	5 a 7	Durante	Não	Não
P3	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P4	Sim	5 a 7	Durante	Não	Sim
P5	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Não
P6	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Sim
P7	Sim	3 a 4	Antes	Sim	Não
P8	Sim	5 a 7	Não	Sim	Não
P9	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P10	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P11	Sim	5 a 7	Durante	Não	Sim
P12	Não	3 a 4	Antes	Sim	Não
P13	Não	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P14	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Sim
P15	Não	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P16	Não	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P17	Não	5 a 7	Durante	Sim	Não
P18	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P19	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P20	Sim	5 a 7	Durante	Não	Não
P21	Não	5 a 7	Antes	Não	Não
P22	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Sim
P23	Não	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P24	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Sim
P25	Sim	5 a 7	Durante	Não	Sim
P26	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P27	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P28	Não	5 a 7	Durante	Sim	Não
P29	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Não
P30	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P31	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P32	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P33	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P34	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Sim
P35	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P36	Sim	7	Durante	Sim	Sim
P37	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P38	Não	5 a 7	Durante	Sim	Sim
P39	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P40	Não	5 a 7	Antes	Não	Não
P41	Sim	5 a 7	Não	Sim	Sim
P42	Sim	3 a 4	Durante	Sim	Não
P43	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P44	Sim	5 a 7	Durante	Sim	Não
P45	Não	5 a 7	Durante	Sim	Sim

5.2 Soro de Fluido Menstrual

5.2.1 Prostaglandinas PGF2 α e PGE2

A tabela 2 mostra os dados estatísticos obtidos relativos a concentração no fluido menstrual das prostaglandinas E2 e F2 α das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão. As figuras 6 e 7 representam as distribuições dos valores de concentrações de prostaglandina E2 e F2 α no soro do fluido menstrual dos grupos estudados. Em relação a prostaglandina E2, observamos que os grupos Controle (310,2 ng/ml) e Limão (316,3 ng/ml) apresentaram concentração medianas significativamente maiores em relação ao grupo Meloxicam (71,8 ng/ml), porém não diferiram entre si. Em relação a prostaglandina F2 α , o Grupo Limão apresentou o valor de concentração mediano (2953 ng/ml) significativamente maior em relação aos grupos Controle (1806 ng/ml) e Meloxicam (1131 ng/ml), os quais também diferiram entre si.

Tabela 2. Análise descritiva das concentração de prostaglandinas E2 e F2 α presentes no soro do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Limão, Meloxicam e Controle.

Prostaglandinas	Grupo	N	Média (ng/ml)	EPM (ng/ml)	Mediana (ng/ml)	P25 (ng/ml)	P75 (ng/ml)
E2 ⁽¹⁾	Limão ^a	16	328,3	43,60	316,3	199,1	438,3
	Meloxicam ^b	15	146,3	48,87	71,8	44,9	109,5
	Controle ^a	13	369,4	80,65	310,2	133,3	561,7
F2 α ⁽²⁾	Limão ^a	16	3165	426,9	2953	2057	3789
	Meloxicam ^b	15	1402	213,3	1131	801,8	1827
	Controle ^c	13	1955	194,8	1806	1474	2315

EPM – erro padrão da média, P25 quantil 25%, P75 quantil 75%. As letras a e b representam os grupos diferentes do ponto de vista estatísticos. Testes estatísticos: (1) Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas / (2) ANOVA e Newman-Keuls para comparações múltiplas.

Fonte: autor

Figura 6: Concentração de prostaglandina E2 (ng/mL) presente no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletado no segundo dia da menstruação. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

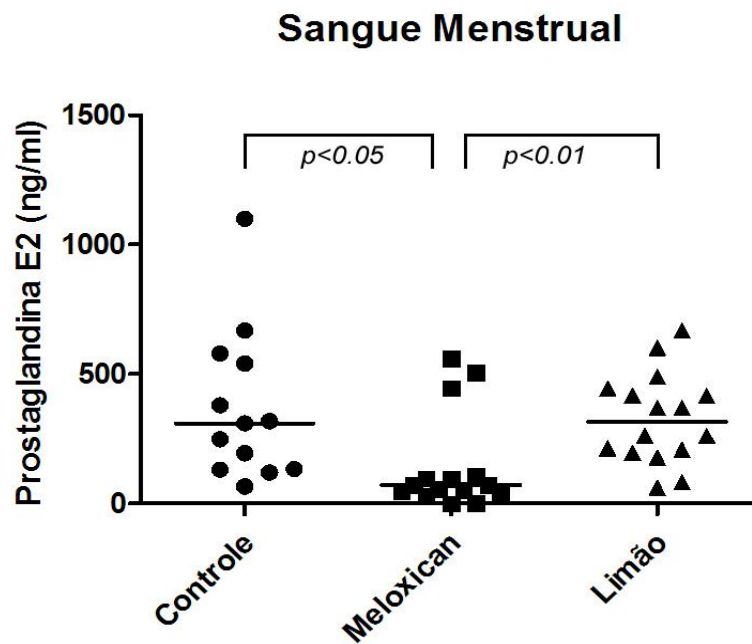


Figura 7: Concentração de prostaglandina F2α (ng/mL) presente no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletado no segundo dia da menstruação. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: ANOVA e Newman-Keuls para comparações múltiplas.

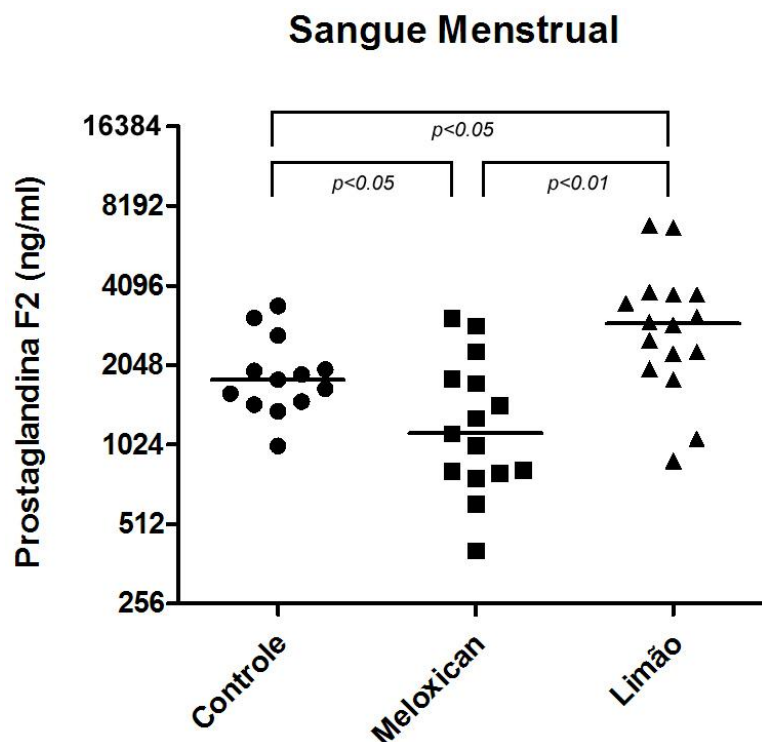
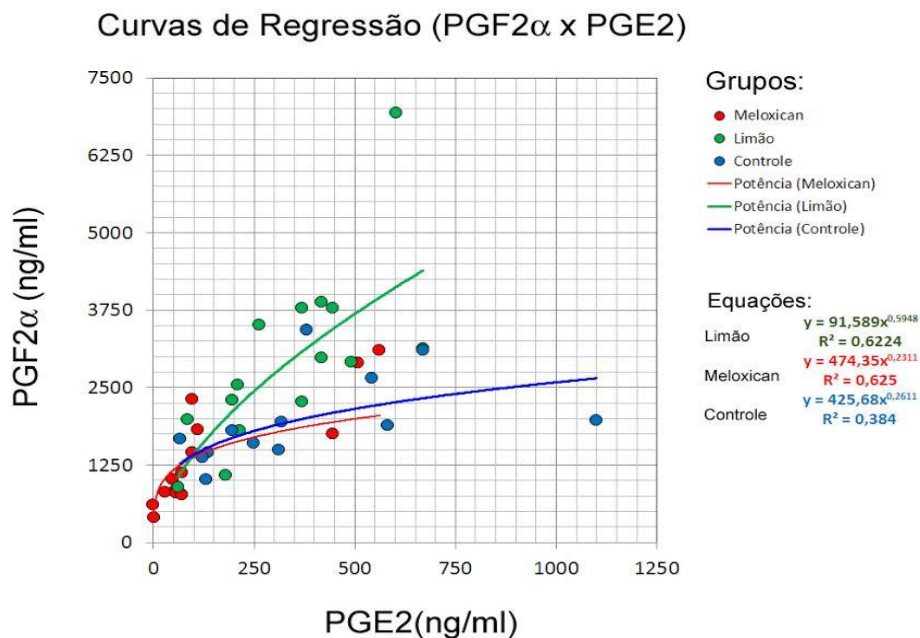


Figura 8: Curva de dispersão das concentrações de prostaglandinas PGF2 α e PGE2 (ng/mL) presentes no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletado no segundo dia da menstruação.



A figura 8 representa as curvas de dispersão formadas pela combinação dos valores de concentração das variáveis PGE2 e PGF2 α do soro menstrual de cada voluntária, em cada um dos grupos. Interpretando o padrão de distribuição, podemos perceber que os valores de PGF2 α no grupo limão aumentaram de forma mais intensa em relação a PGE2, provocando um aumento de inclinação do padrão de distribuição do grupo em relação ao controle. Em relação ao grupo Meloxicam, podemos notar que houve uma inibição de PGE2 e PGF2 α , no entanto essa inibição parece atingir de forma mais intensa a PGE2, o que de certo modo parece provocar também uma inclinação maior em relação ao controle, principalmente, quando os valores extremos são descartados.

5.2.2 Citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6

A tabela 3 mostra os dados estatísticos obtidos em relação as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 produzidas no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão. As figuras 9, 10 e 11 representam as distribuições dos valores de concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no *soro* do fluido menstrual dos grupos estudados. Em relação as concentrações de TNF- α , o grupo que utilizou o limão Taiti apresentou valor mediano (2717 ng/ml) significativamente menor em relação ao grupo controle (10950 ng/ml). Entretanto, em comparação como o grupo Meloxicam (4335 ng/ml), não houve diferença estatística. Em relação as citocinas IL-1 β e IL-6, não observamos qualquer diferença nas concentrações medianas entre os grupos analisados.

Tabela 3: Análise descritiva das concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 presentes no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Limão, Meloxicam e Controle.

CITOCINAS	Grupo	N	Média (pg/ml)	EPM (pg/ml)	Mediana (pg/ml)	P25 (pg/ml)	P75 (pg/ml)
TNF- α	Limão ^a	15	4240	989,1	2717	1581	5241
	Meloxicam ^{a,b}	15	5946	1533	4335	1857	7047
	Controle ^b	13	9353	1433	10950	4590	13710
IL-1 β	Limão ^a	15	6516	1818	3244	1854	14000
	Meloxicam ^a	15	9452	2551	4426	1434	20290
	Controle ^a	13	12810	3208	13240	1933	18180
IL-6	Limão ^a	15	42800	10350	32650	11390	58100
	Meloxicam ^a	16	17480	4331	11700	2995	23480
	Controle ^a	12	28490	7208	19300	14240	47740

EPM – erro padrão da média, P25 quantil 25%, P75 quantil 75%. As letras a e b representam os grupos diferentes do ponto de vista estatísticos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Fonte: autor

Figura 9: Concentração de citocina TNF- α (pg/mL) presente no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletado no segundo dia da menstruação. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

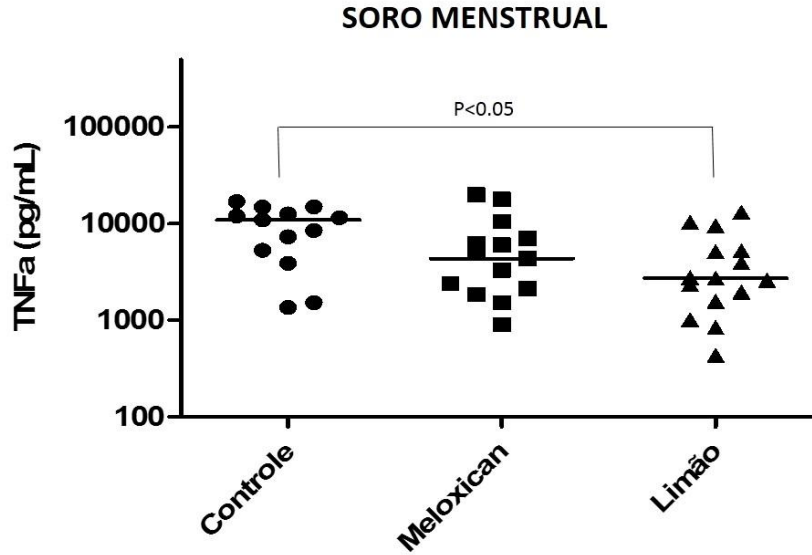


Figura 10: Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no *soro* do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletado no segundo dia da menstruação. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

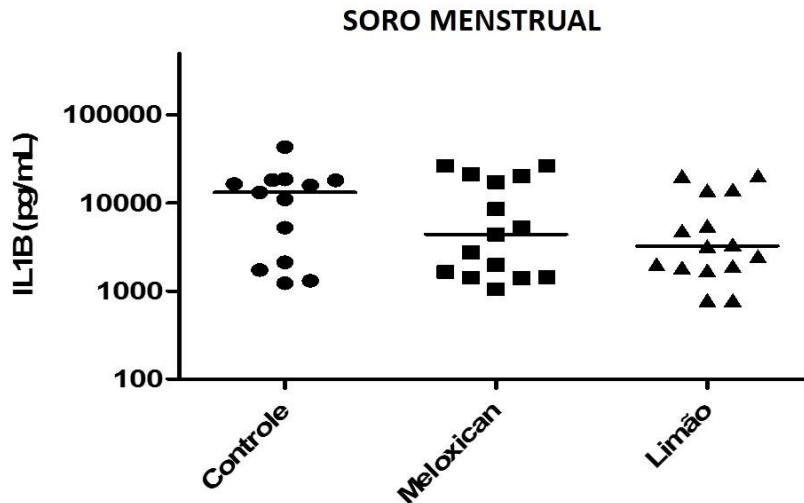
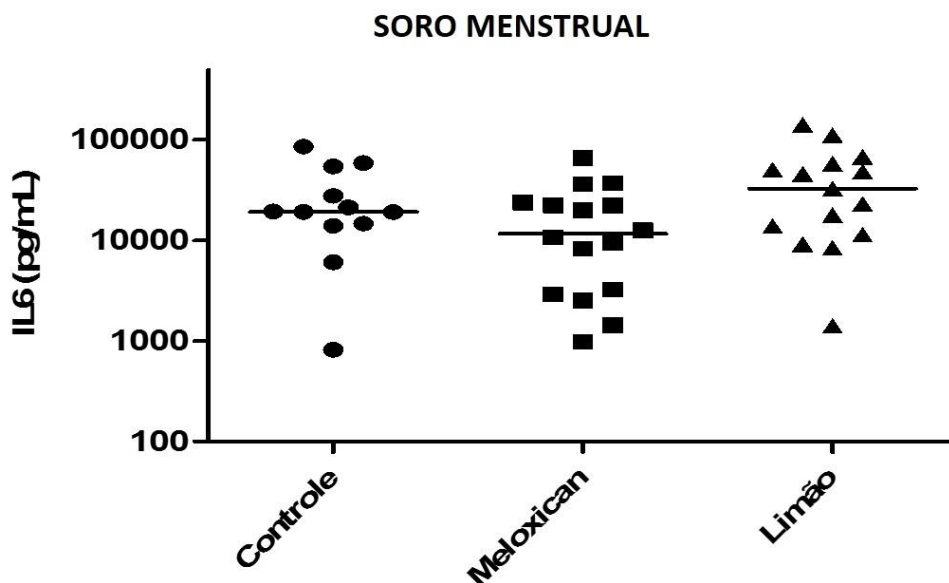


Figura 11: Concentração de citocina IL-6 (pg/mL) presente no soro do fluido menstrual das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão coletados no segundo dia da menstruação. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.



5.3 Soro do Sangue Periférico

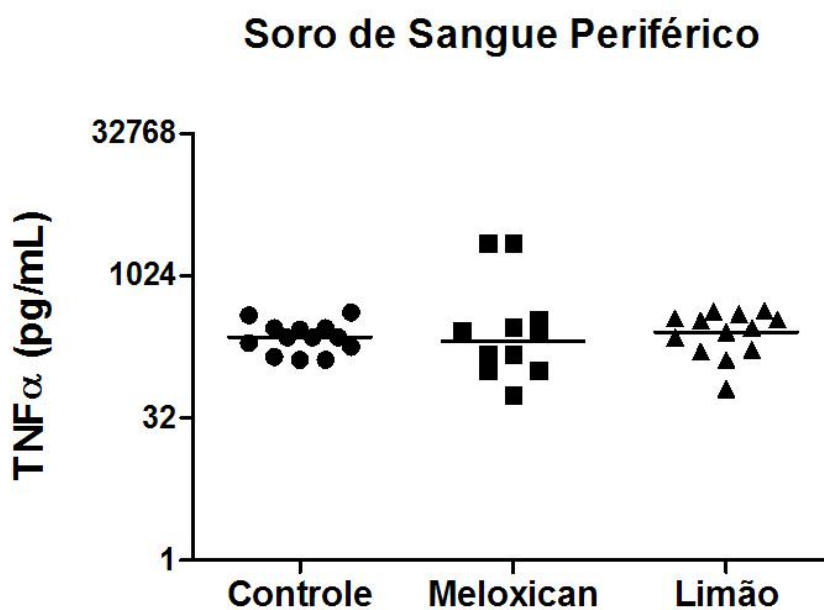
A tabela 4 e a figura 12 mostram, respectivamente, a descrição estatística e a distribuição dos valores dos dados de concentração da citocina TNF- α presentes no soro periférico das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão. Os resultados revelam que não houve diferença nos níveis medianos da citocina entre os grupos Limão (258,4 pg/ml), Meloxicam (210 pg/ml) e Controle (229,6 pg/ml). Os valores de IL-6 e IL1- β medidos estavam abaixo da sensibilidade de quantificação dos kits de ELISA e por isso não foram computados nas análises.

Tabela 4: Análise descritiva das concentração das citocinas TNF- α , presentes no soro de sangue periférico das voluntárias dos grupos Limão, Meloxicam e Controle.

Soro Periférico	Grupo	N	Média (pg/ml)	EPM (pg/ml)	Mediana (pg/ml)	P25 (pg/ml)	P75 (pg/ml)
	Limão ^a	15	239,5	40,24	258,4	133,2	363,9
	Meloxicam ^a	12	525,7	238,0	210,3	104,2	340,0
	Controle ^a	14	224,7	29,08	229,6	140,4	287,2

EPM – erro padrão da média, P25 quantil 25%, P75 quantil 75%. A letra a representa os grupos com valores medianos semelhantes do ponto de vista estatísticos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas. Fonte: autor

Figura 12: Distribuição das concentração de citocina TNF- α (pg/mL) presentes no soro de sangue periférico das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, coletado no segundo dia da menstruação. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.



5.4 Cultura

5.4.1 Contagem Relativa das Populações Celulares após 24h de cultura

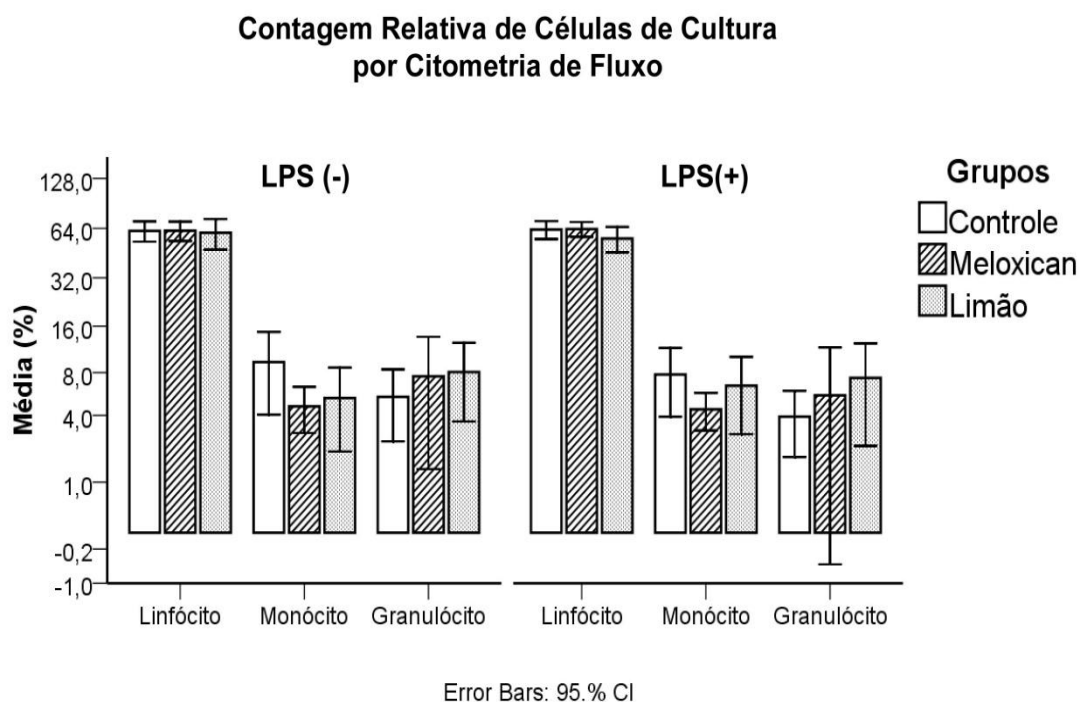
A tabela 5 apresenta a descrição estatística das proporções relativas das supostas populações de linfócitos, monócitos e granulócitos provenientes das culturas celulares das voluntárias dos grupos Limão, Meloxicam e Controle, estimuladas com Soro Fetal Bovino e Soro autólogo na presença ou ausência de LPS, obtidas por meio da citometria de fluxo. A figura 13 mostra a comparação das distribuições dos valores relativos das populações de células nas diferentes situações descritas acima. Analisando os dados, pode-se observar que não existe diferenças significativas entre as quantidades relativas das três subpopulações celulares em relação aos grupos (limão, Meloxicam e controle), à estimulação (LPS⁻ vs LPS⁺) ou ao tipo de suplementação (SFB vs Soro autólogo).

Tabela 5: Proporção das populações celulares de linfócitos, monócitos e granulócitos após 24h de cultura em relação ao grupo, ao tipo de estimulação e ao tipo de soro de sangue periférico utilizado na suplementação.

Célula	Estímulo	Tipo de Soro	Grupo	N	Média (%)	Erro Padrão (%)	Mediana (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Linfócito	LPS(-)	SFB	Limão	7	61,3	5,90	61,6	41,1	85,1
			Meloxicam	6	67,4	5,08	66,8	49,5	85,1
			Controle	8	64,8	5,00	59,2	50,6	84,9
		Soro Autólogo	Limão	7	59,0	10,60	66,0	7,1	88,1
			Meloxicam	6	56,5	5,01	60,6	38,6	67,8
			Controle	7	58,4	6,72	60,4	24,6	80,4
	LPS(+)	SFB	Limão	8	58,9	5,39	61,8	33,0	80,3
			Meloxicam	6	62,9	4,98	68,6	42,6	72,5
			Controle	8	65,9	4,78	64,9	49,5	84,1
		Soro Autólogo	Limão	6	51,0	7,94	45,6	34,3	88,0
			Meloxicam	6	63,9	3,76	64,0	49,4	74,5
			Controle	8	60,0	5,71	60,3	32,5	87,0
Monócito	sem LPS	SFB	Limão	7	6,6	2,35	5,0	0,3	17,0
			Meloxicam	6	4,2	0,95	4,4	0,5	7,6
			Controle	8	7,8	3,69	6,2	0,0	32,6
		SP	Limão	7	4,1	2,00	1,6	0,3	15,2
			Meloxicam	6	5,1	1,32	5,4	0,1	9,0
			Controle	7	11,2	3,42	10,3	2,3	29,3
	com LPS	SFB	Limão	8	6,6	2,30	4,4	0,2	18,4
			Meloxicam	6	4,0	0,84	4,3	0,3	6,3
			Controle	8	5,3	1,65	5,0	0,0	14,8
		SP	Limão	6	6,4	2,71	4,7	0,2	16,3
			Meloxicam	6	4,8	0,96	5,2	0,4	7,0
			Controle	8	10,2	3,10	9,0	0,0	26,6
Granulócito	sem LPS	SFB	Limão	7	8,1	2,99	5,4	1,9	22,3
			Meloxicam	6	6,1	3,74	2,9	0,9	24,7
			Controle	8	5,1	2,39	2,8	1,5	21,6
		SP	Limão	7	8,0	3,09	3,7	2,2	25,0
			Meloxicam	6	9,0	4,42	5,2	2,5	30,8
			Controle	7	5,8	1,33	5,4	2,8	13,0
	com LPS	SFB	Limão	8	6,9	2,84	3,6	2,0	25,7
			Meloxicam	6	5,2	3,88	1,4	0,9	24,6
			Controle	8	4,6	1,87	3,0	1,1	17,2
		SP	Limão	6	8,0	4,26	3,5	1,2	28,3
			Meloxicam	6	6,0	4,35	1,5	1,1	27,7
			Controle	8	3,2	0,70	3,0	1,0	7,1

Fonte: Programa GraphPad Prism. Análise Estatística (Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas) não mostrou a existência de diferença significativas entre os valores medianos de porcentagem das populações celulares em relação ao grupo, ao tipo de estimulação e ao tipo de soro de sangue periférico utilizado na suplementação.

Figura 13: Proporção das populações celulares de linfócitos, monócitos e granulócitos provenientes das culturas celulares estimuladas ou não com LPS (10ng/ml) após 24h, nos grupos Controle, Meloxicam e Limão. Os dados das culturas com 10% de SFB e 10% de soro autólogo, por serem semelhantes, foram agrupados no mesmo gráfico para facilidade de visualização. As análises Estatísticas (Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas) não mostraram a existência de diferenças significativas entre os valores medianos de porcentagem das populações celulares em relação: ao grupo, ao tipo de estimulação e ao tipo de soro de sangue periférico utilizado na suplementação.



5.4.2 Influência do limão e do Meloxicam na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, pelas células de sangue total suplementadas com SFB e induzidas por LPS.

A tabela 6 e as figuras 14, 15 e 16 mostram, respectivamente, a descrição estatística e a distribuição das relações das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 produzidas nas culturas de células das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão, suplementadas com SFB e estimuladas com LPS (10 ng/ml) por 24 horas, em relação às culturas não estimuladas: $\log_2(\text{LPS}^+/\text{LPS}^-)$. Tendo como referência o grupo controle, os dados mostram que o limão e o meloxicam não interferiram de forma significativa no aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) após a suplementação com SFB e a estimulação com LPS (24h).

Tabela 6: Relação entre as concentrações de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) presentes nas culturas celulares suplementadas com SFB e estimuladas com LPS, e as produzidas pelas culturas não estimuladas, nos grupos Limão, Meloxicam e Controle: $\log_2(\text{LPS}^+/\text{LPS}^-)$.

CITOCINA	Grupo	N	Média	EPM	Mediana	P25	P75
TNF- α	Limão ^a	15	1,43	0,262	1,40	0,900	2,00
	Meloxicam ^a	14	1,43	0,343	1,10	0,575	2,50
	Controle ^a	15	1,69	0,490	1,70	0,700	2,20
IL-1 β	Limão ^a	15	3,07	0,502	3,30	1,80	4,20
	Meloxicam ^a	14	2,89	0,475	3,35	1,70	4,10
	Controle ^a	15	3,11	0,399	3,20	1,90	4,00
IL-6	Limão ^a	15	4,43	0,793	5,70	2,50	6,80
	Meloxicam ^a	14	5,06	0,666	5,80	3,90	6,20
	Controle ^a	15	5,12	0,661	6,40	3,30	7,00

Fonte: Programa GraphPad Prism. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 14: Relação entre as concentrações de TNF- α produzida pela cultura de sangue total contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, e a produzida pelas células não estimuladas, entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

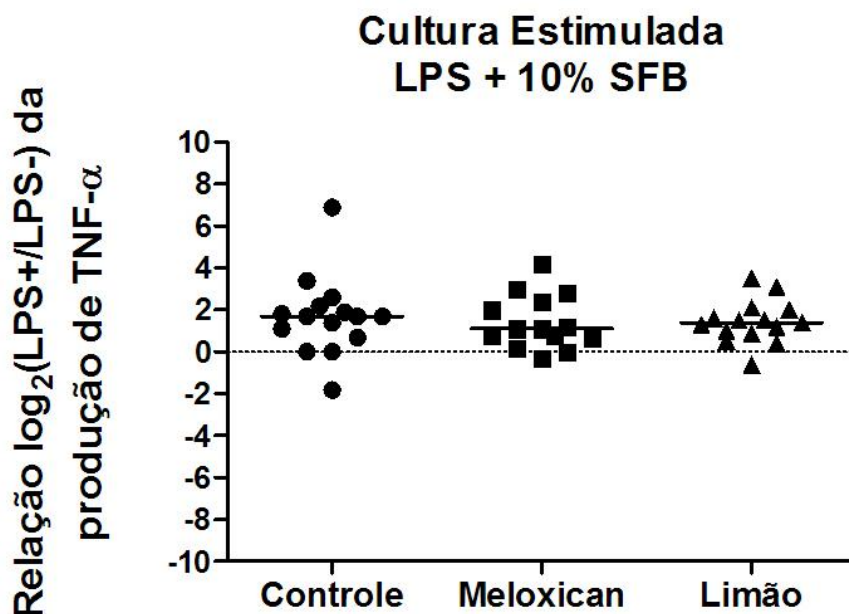


Figura 15: Relação entre as concentrações de IL-1 β produzida pela cultura de sangue total contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, e a produzida pelas células não estimuladas, entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

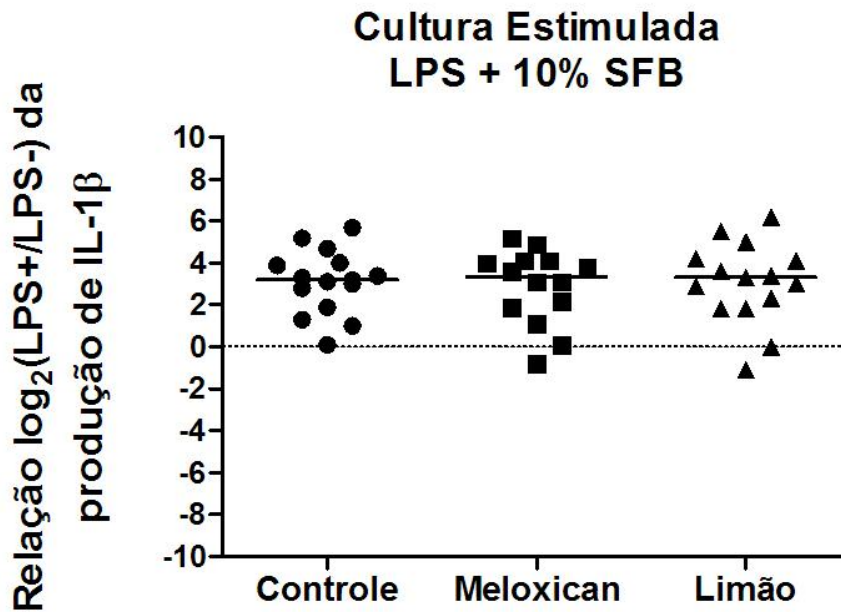
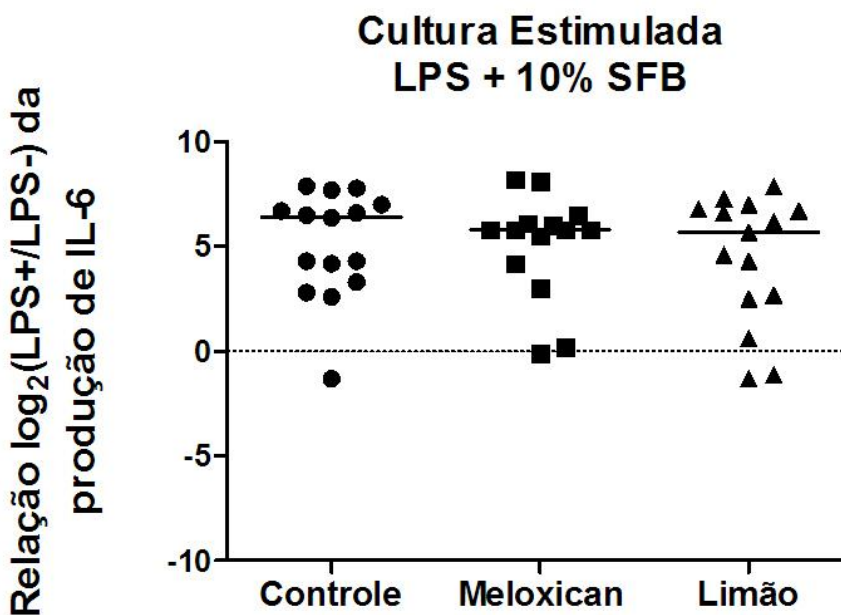


Figura 16: Relação entre as concentrações de IL-6 produzida pela cultura de sangue total contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, e a produzida pelas células não estimuladas, entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.



5.4.3 Influência do limão e do Meloxicam na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, pelas células de sangue total suplementadas com soro autólogo e induzidas por LPS.

A tabela 7 e as figuras 17, 18 e 19 mostram, respectivamente, a descrição estatística e a distribuição das proporções das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 produzidas nas culturas de células das voluntárias dos grupos Controle, Meloxicam e Limão suplementadas com soro autólogo e estimuladas com LPS (10 ng/ml) por 24 horas, em relação as culturas não estimulada: $\log_2(\text{LPS}^+/\text{LPS}^-)$. Os dados mostram que as células suplementadas com soro autólogo do grupo tratado com limão Taiti produziram uma quantidade mediana maior de TNF- α ($2^{[1,92]}$ vezes em relação ao sem estimulação), em relação aos grupos Meloxicam ($2^{[0,29]}$ vezes em relação ao sem estimulação) e controle ($2^{[0,85]}$ vezes em relação ao sem estimulação).

Tabela 7: Relação entre as concentrações de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) presentes nas culturas celulares suplementadas com soro autólogo e estimuladas com LPS, e as produzidas pelas culturas não estimuladas, nos grupos Limão, Meloxicam e Controle: $\log_2(\text{LPS}^+/\text{LPS}^-)$.

CITOCINA	Grupo	N	Média	EPM	Mediana	P25	P75
TNF- α	Limão ^a	14	2,08	0,51	1,92	0,45	3,34
	Meloxicam ^b	13	-0,46	0,75	0,29	-1,50	1,76
	Controle ^{a,b}	14	0,87	0,39	0,85	0,28	1,85
IL-1 β	Limão ^a	14	3,34	0,28	3,05	2,50	4,42
	Meloxicam ^a	13	2,55	0,48	3,20	1,05	4,05
	Controle ^a	14	2,75	0,44	3,50	1,22	3,82
IL-6	Limão ^a	14	3,82	0,24	3,85	3,25	4,42
	Meloxicam ^a	13	3,13	0,086	3,10	2,90	3,35
	Controle ^a	14	2,80	0,51	3,10	1,42	4,32

Fonte: Programa GraphPad Prism. As letras a e b representam os grupos diferentes do ponto de vista estatísticos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

Figura 17: Relação entre as concentrações de TNF- α produzida pela cultura de sangue total contendo 10% de soro autólogo e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, e a produzida pelas células não estimuladas, entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

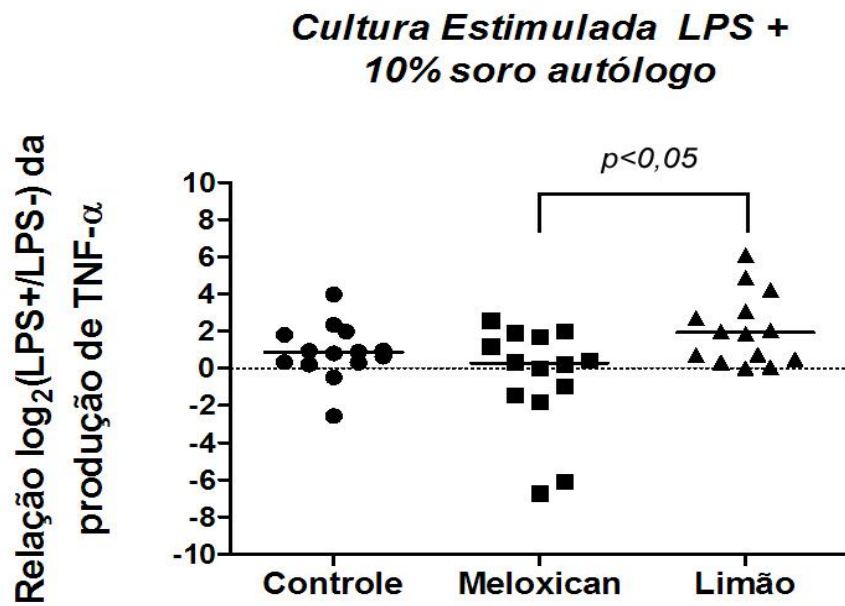


Figura 18: Relação entre as concentrações de IL-1 β produzida pela cultura de sangue total contendo 10% de soro autólogo e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, e a produzida pelas células não estimuladas, entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.

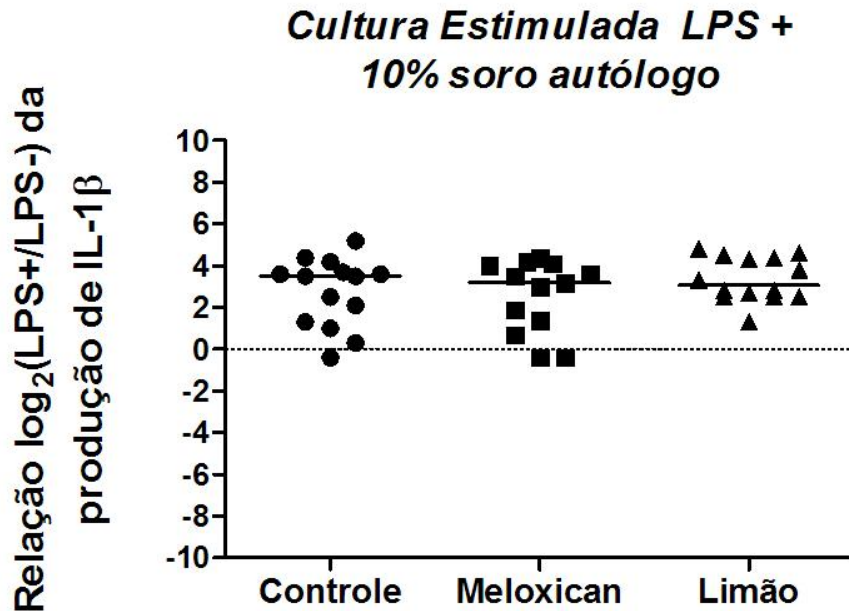
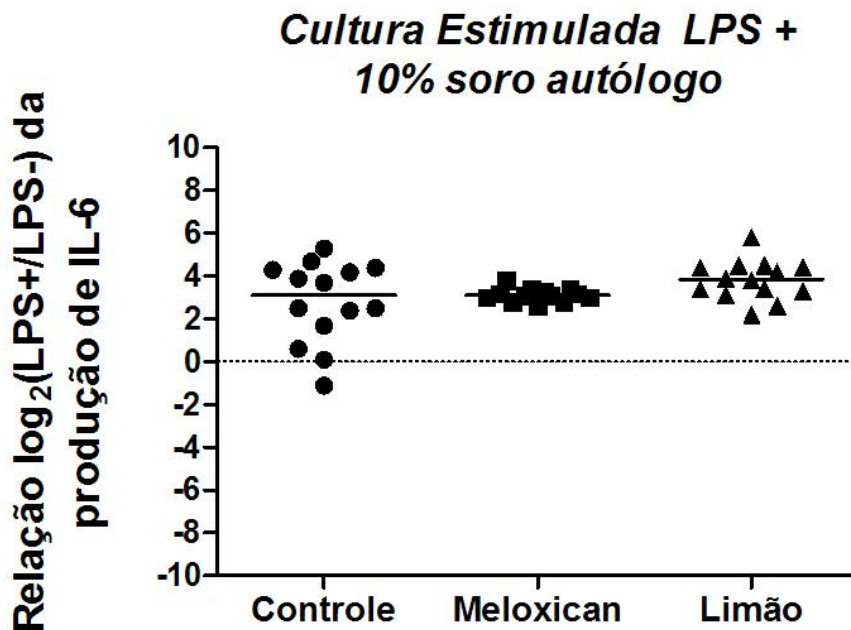


Figura 19: Relação entre as concentrações de IL-6 produzida pela cultura de sangue total contendo 10% de soro autólogo e estimulada com LPS (10 ng/ml) por 24h, e a produzida pelas células não estimuladas, entre os grupos Controle, Meloxicam e Limão. As linhas centrais representam as medianas dos grupos. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Dunn para comparações múltiplas.



6. DISCUSSÃO

O endométrio humano é um tecido dinâmico, cujas funções são reguladas sobretudo pelas atividades dos hormônios estrógeno e progesterona. Durante a menstruação, muito dos eventos que acometem no tecido endometrial tem caráter inflamatório (FINN, 1986) e, dentre os vários mediadores, as prostaglandinas se destacam como importantes agentes da inflamação em função das suas atividades de controles da contração da musculatura uterina, do calibre e da permeabilidade vascular. Vários estudos têm associado os distúrbios do ciclo menstrual, principalmente o fluxo menstrual excessivo e a dismenorreia, com anormalidades na produção de prostaglandinas, em especial das E2 e F2 α (DEB; RAINE-FENNING, 2008). Normalmente, o tratamento destas disfunções tem sido realizado pela indicação de anti-inflamatórios não esteroidais, mas nem sempre esse tipo de abordagem é eficaz e segura. Recentemente, em um estudo piloto, o grupo testou com sucesso a utilização da citoterapia para o controle da menorreia e dismenorreia, porém os mecanismos envolvidos não foram estudados. Por essa perspectiva, o presente trabalho visou contribuir com conhecimento sobre mecanismos biológicos, identificando possíveis mediadores inflamatórios alvos da citoterapia, que tivessem relação com o controle do quadro clínico associado com as dismenorreias e as menorragias.

De acordo com Hickey e Fraser (2006) as quantidades de prostaglandinas produzidas pelas células endometriais de mulheres com menorreia é limitada, sendo que a quantidade de prostaglandinas E2 e I2 predominam em relação à prostaglandina vasoconstritora F2 α (REES *et al.*, 1983). Willman *et al.*, (1976) também mostraram que a concentração de PGE2 no endométrio de mulheres que apresentaram o distúrbio foi relativamente elevada em comparação com PGF2 α , e sugeriram que alterações na síntese de prostaglandinas pelo endométrio poderia ser a principal responsável pelo sangramento menstrual excessivo.

Analisando o fluido menstrual das voluntárias, observamos que a concentração de PGE2 nas amostras, tanto do grupo Controle quanto do grupo Limão, se mantiveram praticamente equivalentes, sem apresentarem diferenças

estatísticas significantes. Entretanto, no grupo tratado com Meloxicam, a concentração da prostaglandina foi estatisticamente inferior em relação ao grupo Controle e ao grupo submetido à citoterapia, apesar das voluntárias não apresentarem nenhum tipo de distúrbio de menstruação (tabela 1, figura 6). Por outro lado, nossos resultados mostraram um aumento expressivo nos níveis de PGF2 α no soro menstrual das voluntárias do grupo Limão, quando comparado aos grupos Controle e Meloxicam (tabela 1, figura 7). Analisando a relação entre PGF2 α e PGE2 por meio de regressão, observamos que a inclinação da curva melhor ajustada foi mais acentuada no grupo Limão em relação aos outros dois (Figura 8). Esse resultado está relacionado, sobretudo, com o aumento da produção de PGF2 α em relação à PGE2 no grupo do Limão. Por outro lado, no grupo Meloxicam, as concentrações individuais de PGF2 α e PGE2 foram, de forma geral, inferiores aos dos dois outros grupos. A inclinação da curva PGF2 α / PGE2 do grupo Meloxicam não foi considerada diferente em relação ao grupo Controle.

A prostaglandina PGF2 α é um potente vasoconstritor que atua diretamente na diminuição do calibre dos vasos sanguíneos (SALES; JABBOUR, 2003), enquanto que a PGE2 possui atividade uma vasodilatadora. Possivelmente, a intensidade do fluxo menstrual e da dor, causada pela contração uterina, têm relação com a ação desequilibrada dessas duas PGs. Os dados aqui apresentados apontam que o Limão poderia exercer uma atividade de controle do fluxo menstrual, induzindo o aumento de PGF2 α e mantendo inalterado o nível de PGE2. Esse efeito poderia beneficiar as mulheres acometidas por distúrbio menstruais associados com a baixa produção de PGF2 α de uma maneira superior à terapia associada com o uso de anti-inflamatórios. De acordo com nossos dados, o uso de AINEs inibiu concomitantemente as expressão PGE2 e PGF2 α , e isso poderia prejudicar o controle do fluxo menstrual exercido pelo processo da vasoconstrição. Analisando a concentração endometrial de PGs de mulheres normais ou com menorreia, Smith *et al.*, (1981) propuseram que a perda excessiva de sangue possa estar relacionada com a possível conversão da PGF2 α em PGE2 (SAEED; SURIA, 1986). Nos resultados deste trabalho, essa hipótese pode ser descartada, uma vez que observamos um aumento na inclinação da curva

PGF2 α / PGE2 no sangue menstrual das voluntárias tratadas com Limão, em relação às participantes dos grupos Controle e Meloxicam. De certa forma, os resultados apontam para a importância do aumento da concentração de prostaglandina F2 α no tecido endometrial mediado pela citoterapia.

De forma resumida, a prostaglandina F2 α é sintetizada pelo metabolismo da PGH2 por três vias distintas (Figura 3). A primeira via transforma a PGH2 em PGD2 que, em seguida é convertida em PGF2 α pela ação da enzima AKR1C3, pertencente ao grupo das aldoceto redutases (AKRs). Na segunda via, a PGH2 é transformada diretamente em PGF2 α pela ação das enzimas AKR1B1 ou AKR1C3. A terceira via é responsável pela conversão da PGH2 em PGE2 por meio da atividade de PGE sintases (PGES, PGES2 ou PGES3), seguida pela conversão da PGE2 em PGF2 α pela PGE2 9-cetoreductase. Baseados nos resultados encontrados, podemos propor que componentes presentes no limão Taiti teriam ação facilitadora na primeira e na segunda via uma vez que, o aumento da PGF2 α no fluxo menstrual não parece ser acompanhado pela alteração da concentração de PGE2. No entanto, somente analisando a dinâmica enzimática poderíamos comprovar essas hipóteses.

A descoberta de que certos flavonoides são moduladores seletivos *in vitro* de prostaglandinas levou à especulação de que esses compostos, presentes principalmente em frutas cítricas, poderiam ser os principais responsáveis pelo mecanismo anti-inflamatório. Os flavonoides são compostos fenólicos encontrados na natureza com propriedades antioxidantes e reguladores dos mecanismos do sistema imune (ALAM *et al.*, 2014). Vários tipos de flavonoides são encontrados em citrus tais como: Flavonas, Flavanonas, Flavonóis, Isoflavonas, e Antocianinas (PETERSON; DWYER, 1998). No trabalho realizado por Bhatia *et al.*, (2015) utilizando *Citrus limon* no controle das desordens menstruais, os autores observaram que os flavonoides presentes no Citrus aumentaram a resistência dos capilares sanguíneos presentes no tecido endometrial. Esse achado poderia ser explicado pelo aumento de PGF2 α produzido pela citoterapia, destacando o efeito local em nossa pesquisa. A PGF2 α é capaz de aumentar a resistência capilar agindo sobre receptores de prostaglandina (EKSTRÖM *et al.*, 1991.).

Como já revisto nos trabalhos de Alcaraz e Ferrándiz (1987), alguns flavonoides podem ter efeitos estimuladores ou inibidores da síntese de prostaglandinas. O provável mecanismo de interação dos flavonoides com as PG sintetases pode estar relacionado com a capacidade de interagir com moléculas oxidantes. Sabe-se que a conversão da prostaglandina intermediária H₂ é catalisada, na maioria das vezes, por uma hidroperoxidase, e durante a reação é formado um radical livre. Esse pode interagir com o flavonoide e inativar a COX por um fenômeno de feedback negativo. Por outro lado, outros flavonoides exercem suas atividades na degradação de radicais livres durante o processo, estimulando a síntese de PGs. Dessa forma, alguns flavonoides tendem a diminuir a atividade da COX, enquanto outros podem estimular sua via de síntese (HERTZ; CLOAREC, 1984).

Hesperidina e eriocitrina são glicosídeos presentes em alguns tipos de flavonoides como as flavanonas de laranjas e limões. Esses glicosídeos, quando em contato com bactérias intestinais, são desglicosilados e conjugados, originando o homoeriodictiol e a hesperetina. Estes metabolitos possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória capazes de eliminar radicais livres e inibir a inflamação *in vitro* através do bloqueio do fator de transcrição NF- κ B, redução do stress oxidativo e redução da expressão de COX-2 (revisado por FERREIRA *et al.*, 2016). No trabalho de Kang (2014), os autores utilizaram a casca de citrus para o controle da expressão de mediadores inflamatórios induzidos por LPS. Os seus resultados mostraram que a expressão da proteína COX-2 foi ligeiramente diminuída pelo tratamento com extratos das cascas de citrus. Ainda no mesmo estudo, o citrus inibiu significativamente a síntese de IL-6 e TNF- α . Através destes achados, os autores mostraram que o extrato da casca de citrus impede a expressões da proteína COX-2 e inibem a produção de IL-6 e TNF- α .

Durante os eventos inflamatórios, há um aumento na produção de citocinas, principalmente das TNF- α e IL-1 β , as quais possuem importantes funções na manutenção do perfil pró-inflamatório tecidual. A citocina IL-1 β é capaz de estimular o fator de transcrição NF- κ B que aumenta a produção dos genes relacionados com a COX-1 e COX-2. Em uma situação pró-inflamatória, como ocorre no processo menstrual, poderíamos esperar maior produção de

COX-2, a qual potencializaria a produção de PGs. Vários autores têm relatado os efeitos dos flavonoides na regulação da produção de citocinas. Lyu e colaboradores (2005) estudando os efeitos dos flavonoides sobre a produção de TNF- α , mostraram que essa classe de compostos tem um potencial anti-inflamatório importante. No trabalho de Amorim *et al.*, (2016) no qual foram testados óleos essenciais de diferentes citrus em camundongos, os resultados indicaram que os Citrus possuem efeitos significantes na redução de citocinas e na regulação da migração de leucócitos para o local da inflamação. Como relatado por Yoon *et al.*, (2010), em seus estudos realizados para verificar os efeitos farmacológicos do limoneno sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios, os dados sugerem que o mesmo pode ser usado para inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e impedir a migração de leucócitos (CÁSSIA *et al.*, 2013). Alguns trabalhos têm relatado também as atividades da vitamina C, presentes na maioria de frutas cítricas, na resposta imune, incluindo a produção de citocinas, quimiocinas e a proliferação de leucócitos. Um estudo *in vitro* utilizando sangue humano mostrou que os monócitos em cultura celular, estimulados com variadas concentrações de vitamina C, produziam quantidades significativamente menores de IL-6 e TNF- α (HARTEL, 2004).

Por outro lado, vários estudos já demonstraram que os flavonoides modulam o metabolismo do ácido araquidônico através da inibição de COX-2, PLA₂ e enzimas produtoras de óxido nítrico (iNOS) que, conseqüentemente, inibem a síntese dos eicosanóides, em particular as prostaglandinas (NIJVELDT *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2004). Em nosso caso, provavelmente a inibição da expressão de COX-2 não é o mecanismo principal responsável pelo controle das disfunções menstruais, mediado pelo limão Taiti. Nossos resultados verificaram que a concentração de PGE₂ no sangue menstrual não sofreu alteração em relação do grupo Controle e, a concentração de PGF₂ α aumentou. As concentrações de IL-1 β e IL-6 não foram consideradas significativamente diferentes entre os três grupos. Apenas o TNF- α apresentou uma diminuição na concentração no soro do fluido menstrual entre os grupos Controle e Limão (tabela 2, figuras 9, 10 e 11). Se houvesse inibição da atividade da COX-2, como relatado nos estudos *in vitro*, nós deveríamos ter observado valores inferiores

das duas PGs e das citocinas IL-1 β e IL-6 analisadas nas amostras coletadas no grupo do Limão em relação ao Controle. Ao contrário da maioria dos estudos que utilizaram o epicarpo para obtenção dos óleos essenciais, nós empregamos o suco extraído do endocarpo como componente terapêutico. Essa distinção poderia explicar as diferenças nos resultados relacionados a inibição da COX e das citocinas pró-inflamatórias.

No trabalho piloto, os resultados mostraram que, principalmente, as voluntárias com fluxos menstruais aumentados e submetidas à citoterapia se beneficiaram do tratamento. Parte das voluntárias apresentou diminuição nos dias (23% das pacientes) e no volume de sangramento (72%), redução de coágulos (43%) e ainda, algumas delas exibiram completa remissão da dismenorreia (21%) (ANDRADE, P. et al, 2015). Dessa forma, provavelmente, a modulação da produção de prostaglandinas proporcionada pela citoterapia induziu a redução do calibre dos vasos e diminuiu o fluxo menstrual, sem potencializar as contrações uterinas relacionadas com a sintomatologia dolorosa. Podemos especular que a intensidade do provável aumento de PGF2 α não foi o suficiente para elevar as contrações miométriais e intensificar as cólicas durante a menstruação. Além disso, provavelmente a diminuição da produção de citocinas, como por exemplo o TNF- α , teria inibido o processo inflamatório e reduzido as atividades nociceptivas.

Além do estudo dos efeitos locais da citoterapia usando a análise do fluído menstrual, nosso estudo avaliou, por meio de ensaios de cultura celular, os efeitos sistêmicos da citoterapia com limão Taiti. Partindo da hipótese de que componentes do limão poderiam modular a atividade dos leucócitos, realizamos ensaios de estimulação com LPS (10 ng/ml) usando amostras de sangue total e quantificamos a produção de citocinas pró-inflamatórias, após 24 horas de incubação. Supondo que a suplementação com o soro autólogo potencializaria a ação do medicamento e da citoterapia em comparação com a cultura com o SFB, as culturas celulares de sangue total foram suplementadas com 10% de SFB ou 10% de soro da própria voluntária. A análise levou em consideração a proporção do aumento da produção das citocinas entre as culturas sem qualquer estimulação e as culturas estimuladas com LPS, sempre da mesma voluntária. Este cuidado garantiu que as variações existentes nas quantidades absolutas de

leucócitos não interferissem na medida do fenômeno biológico estudado. Para garantir que as populações relativas também não fossem diferentes, os leucócitos recuperados da cultura celular após as 24 horas foram submetidos à citometria de fluxo. As distribuições das subpopulações não mostram qualquer diferença relativas entre os grupos estudados. Pelo gráfico, observamos que a população predominante foi a de linfócitos, seguida pela de granulócitos e de monócitos em todos os grupos (tabela 4 e figura 13).

Os resultados das análises não mostraram diferenças significativas na produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelos leucócitos estimulados com LPS e suplementados com SFB, provenientes dos três grupos avaliados. Nos experimentos utilizando leucócitos suplementados com soro autólogo, o tratamento com Limão aumentou a concentração da citocina TNF- α , em relação à quantidade produzida pelas células das voluntárias tratadas com Meloxicam. Deve-se lembrar que a cultura em si não foi diretamente suplementada por limão ou Meloxicam, o componente responsável pelo efeito observado estava provavelmente presente no soro e sofreu toda a metabolização normal que ocorre no organismo. Esse tipo de enfoque é diferente daquele no qual a cultura é suplementada com o composto diretamente. Tal abordagem é muito mais próxima da realidade, pois não somente os componentes originais, mas também os metabólitos secundários podem influenciar nas atividades dos leucócitos.

Em relação aos resultados diferentes relacionados ao TNF- α , onde o grupo tratado com limão Taiti apresentou concentrações menores no *soro* do fluido menstrual e maiores no sobrenadante da cultura celular, em comparação ao grupo controle, podemos supor que o efeito da citroterapia é dependente do tipo celular e das condições locais. O modelo de estimulação dos leucócitos com LPS não reproduziu as condições inflamatórias do útero e, portanto, mostrou um comportamento diferente daquele observado no útero frente à citroterapia.

Como em todos os tipos de pesquisas envolvendo seres humanos, as dúvidas que surgem no meio e no final do trabalho são muito maiores e mais complexas do que as iniciais que supostamente deveríamos esclarecer. Desta forma não poderia ser diferente. Após a conclusão deste trabalho, encontramos fortes indícios que apontam para uma ação do limão Taiti na modulação do

PGF2 α . Este estudo pode ser considerado um ponto inicial no caminho a ser percorrido para atingir um conhecimento detalhado dos processos envolvidos. Pretendemos no futuro continuar as investigações, procurando estabelecer um modelo *in vitro* que reproduza os fenômenos que acontecem no útero durante a menstruação, principalmente aqueles relacionados com a contração da musculatura lisa. A partir de um modelo de contração bem estabelecido, pretendemos caminhar para identificação precisa dos componentes presentes no limão Taiti ou em outros citrus que respondem pelos efeitos biológicos descritos. Além disso, pretendemos continuar as investigações das vias relacionadas à produção de PGF2 α , a fim de identificar precisamente os alvos envolvidos nas respostas à citroterapia.

7. CONCLUSÃO

O suco do limão Taiti parece atuar na cascata de produção de $\text{PGF2}\alpha$ do útero, podendo favorecer os eventos associados com a contração uterina e no volume de sangramento, de uma forma distinta em relação aos mecanismos de atividade associados com o Meloxicam.

8. REFERÊNCIAS

ALAM, M. A. et al. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. **Advances In Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 4, p.404-417. 2014.

ALCARAZ, M. J; FERRÁNDIZ, M. J. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 3, p.209-229. 1987.

AMORIM, J. L. et al. Anti-Inflammatory Properties and Chemical Characterization of the Essential Oils of Four Citrus Species. **Plos One**, v.11, n. 4, p.1-18. 2016.

ANDRADE, P. et al. CITRUS THERAPY CONTROLLING THE MENSTRUAL FLOW. **International Journal of Phytotherapy**, v. 5, n. 2, p. 98-101. 2015.

ANDEL, T.; BOER, H.J.; BARNES, J.; VANDEBROEK, I. Medicinal plants used for menstrual disorders in Latin America, the Caribbean, sub-Saharan Africa, South and Southeast Asia and their uterine properties: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 992-1000. 2014

ANDERSEN; C.Y.; EZCURRA, D. Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**. v 12. p128-139. 2014.

ANGSTWURM, M. W. A.; GÄRTNER, R; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L. Cyclic plasma il-6 levels during normal menstrual cycle. **Cytokine**, v. 9, n. 5, p.370-374. 1997

ARICI, A; MACDONALD, P. C.; CASEY, M.L. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 gene expression in human endometrial cells in cultures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 107, p.189-197. 1995.

AZIATO, L.; DEDEY, F; CLEGG-L., JOE N. The experience of dysmenorrhoea among Ghanaian senior high and university students: pain characteristics and effects. **Reproductive Health**, v. 11, n. 1, p.58-65. 2014.

BAIRD, D. T. et al. Prostaglandins and menstruation. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, v. 70, p.15-17, 1996.

BHATIA, H et al. Traditional phyto remedies for the treatment of menstrual disorders in district Udhampur, J&K, India. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 160, p.202-210. 2015.

BAUER, M.; REIBIGER, I.; SPANEL-BOROWSKI, K. Leucocyte proliferation in the bovine corpus luteum. **Reproduction.Leipzig**, v. 121, p.297-305. 2001.

BEGUM, S.; S, A. Study of immune profile during different phases of menstrual cycle. **International Journal Of Biological & Medical Research**, v. 3, p.1407-1409, 2012.

BENTO, A. F.; MARCON R.; DUTRA R. C. β -caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153–1166, 2011.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**. v. 25. p. 280-288. 2004.

BREDEMEIER, M., WANNMACHER, L. **Antiinflamatórios não-esteróides: Uso indiscriminado de inibidores seletivos de cicloxigenase-2.** [S.l.:s.n], 2004.

BURG, B. D.; SAAG, P. T. Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, p.433-438. 1996.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 10, p.791-800. 2003.

CAMPBELL, D. J.; KOCH, M A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p.119-130. 2011.

CHAPDELAINE, P.; KANG, J.; BOUCHER-KOVALIK, S.; CARON, N.; TREMBALY, J .P.; FORTIER, M.A.; Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen. **Molecular Human Reproduction**. v.12, n.5 p. 309–319. 2006.

CHENG, C. et al. Quantitative Cellular and Molecular Analysis of the Effect of Progesterone Withdrawal in a Murine Model of Decidualization. **Biology Of Reproduction**, v. 76, n. 5, p.871-883, 24. 2007.

CHESNEY, M. A.; TASTO, D. L. The Effectiveness of Behavior Modification with Spasmodic and Congestive Dysmenorrhea. **Behav. Res & Therapy**, v.13, p.243-253. 1974.

CHRISTIAENS, G. C. M. L. Hemostasis in menstrual endometrium. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 70, n. 1, p. 19–20, 1996.

CHRISTIAENS, G. C. M. L.; SIXMA, J. J.; HASPELS, A. A.. Morphology of Hemostasis in Menstrual Endometrium. **Bjog: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 87, n. 5, p.425-439, maio 1980.

COLDITZ, I. G. Effect of exogenous prostaglandin E2 and actinomycin D on plasma leakage induced by neutrophil-activating peptide-I/interleukin-8. **Immunol. Celt Biol. Immunol**, v. 68, p.397-403, 1990.

DAVIES, J; KADIR, R. A.. Endometrial haemostasis and menstruation. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 4, p.289-299. 2012.

DAWOOD M.Y. Dysmenorrhea. **Clinl Obstet Gynecol**, v. 33, n. 1. 1990.

- DEB, S; RAINE-F. N. Dysmenorrhoea. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 18, n. 11, p.294-299. 2008.
- EKSTRÖM P, ALM P, AKERLUND M. Differences in vasomotor responses between main stem and smaller branches of the human uterine artery. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 70, n.6, p.429-33. 1991.
- EVANS, J; SALAMONSEN, L A. Inflammation, leukocytes and menstruation. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 13, n.4, p.277-288. 2012.
- EVANS, J.; SALAMONSEN, L. A. Decidualized Human Endometrial Stromal Cells Are Sensors of Hormone Withdrawal in the Menstrual Inflammatory Cascade. **Biology of Reproduction**, v. 90, n.1, p.14-14, 2013.
- FAN, X. et al. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 10, p.3571-3580, 2008.
- FERREIRA, P. S. et al. Citrus flavanones prevent systemic inflammation and ameliorate oxidative stress in C57BL/6J mice fed high-fat diet. **Food Funct**, v. 7, n. 6, p.2675-2681, 2016.
- FETTBACK, P. B. T. Células natural killer endometriais: o que são? O que fazem? O que devemos saber? **Femina**, v. 37, n. 7, p.373-378, 2009.
- FINN, C. A. Implantation, menstruation and inflammation. **Biological Reviews**, v. 61, n. 4, p.313-328, 1986.
- FUCTTS, A R. Prostaglandin f2alpha and oxytocin interactions in ovarian and uterine function. **Journal Steroid Biochemical**, v. 27, p.1073-1080, 1987.
- FUNK, C. Prostaglandins and Leukotrienes: advances in eicosanoids biology. **Science**. n 294. p 1871-1875, 2001.
- GARCÍA-VELASCO, J. A.; ARICI, A. Chemokines and human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 71, p.983-93, 1999.
- GOTTSHALL S. L.; P. J. HANSEN. Regulation of leucocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. **Immunology**, v.76, p. 636-641, 1992.
- GHOSH S.; MAY, M.J.; KOOP, E. NF-κB and Rel Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annu. Rev. Immunol.** v. 16. p. 225-260, 1998.
- GLOIRE, G.; LEGRAND, P. S.; PIETTE, J. NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p.1493-1505, 2006.
- GROVES, D.T.; JIANG, Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. **Critical reviews in oral biology and medicine:an official publication of the American Association Of Oral Biologist**, v 6, p 109-118, 1995
- GUMANGAR., S. K.; KWAME, A. R. A. Menstrual characteristics in some adolescent girls in accra, ghana. **Ghana Medical Journal**, v. 46, n. 1, p.3-7, 2012.

HARTEL, C. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. **Cytokine**, v. 27, n. 4-5, p.101-106, 2004.

HAYES, P.C.; LEE, A. Reproductive Consequences os COX-2 inhibition of Personal Use. [S.l.: s.n], 2001.

HAYNES, P. J. et al. Measurement of menstrual blood loss in patients complaining of menorrhagia. **Bjog: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 84, n. 10, p.763-768, 1977.

HENRIET, P.; CHEVRONNAY, H. P. G.; MARBAIX, E. The endocrine and paracrine control of menstruation. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 358, n. 2, p.197-207, 2012.

HERTZ, F.; CLOAREC, A. Pharmacology of free radicals; recent views on their relation to inflammatory mechanisms. **Life Sciences**, v. 34, n. 8, p.713-720, 1984.

HICKEY, M; FRASER, I. S. Clinical implications of disturbances of uterine vascular morphology and function. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 14, n. 6, p.937-95, 2000.

HUNT, J.S.; MILLER, L.; ROBY, K.F.; HUANG, J.; PLATT, J.S.; DEBROT, B.L. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, n.2, p.87-99, 1997.

JABBOUR, H. N.; KELLY, R.W.; FRASER, H.M.; CRITCHLEY, H.O.D. Endocrine Regulation of Menstruation. **Endocrine Reviews**, v. 27, n.1, p.17-46, 2006.

JOHNSON, N. Management of dysmenorrhoea. **Reviews in Gynecological and Perinatal Practice**. v. 6, n.1-2, p.57-62, 2006.

JONES, R. L; BULMER, J. N.; SEARLE, R F. Phenotypic and functional studies of leukocytes in human endometrium and endometriosis. **European Society of Human Reproduction and Embriology**, v.4, n. 5, p.702-709, 1998.

JONES, R. L.; KELLY, R. W.; CRITCHLEY, H. O. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. **Human Reproduction**, v. 12, n 6, p.1300-1306, 1997.

KAMAT, B R.; ISAACSON, P. G. The Immunocytochemical Distribution of Leukocytic Subpopulations in Human Endometrium. **Leukocytes in Endometrium**, v. 27, n.1, p.66-73, 1986.

KANG, J. et al. Independent regulation of prostaglandins and monocyte chemoattractant protein-1 by interleukin-1b and Hcg in human endometrial cells. **Human Reproduction**, v.19, n.11 p. 2465–2473, 2004.

KANG, K. Citrus Peel Extract Inhibits LPS-induced Cytokines Secretion in Macrophage. **International Journal Of Bioscience And Bio-technology**, v. 6, n. 1, p.11-20, 2014.

KARLSSON, T. S.; MARIONS, L. B.; EDLUND, M. G.. Heavy menstrual bleeding significantly affects quality of life. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, v. 93, n. 1, p.52-57, 2013.

KATS, R. Cycle-dependent expression of macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium. **Human Reproduction**, v. 20, n. 12, p.3518-3525, 2005.

KAUMA, S. et al. Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 163, p.1430-1437, 1990.

KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p.229-245, 2004.

KING, A. E.; CRITCHLEY, H. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2-3, p.116-126, 2010.

KING, A.; GARDNER, L.; Y.W.L. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. **Human Reproduction**, v. 11, n. 5, p.1079-1082, 1996.

KIRSCH, T. M. et al. Macrophages in corpora lutea of mice: characterization and effects on steroid secretion. **Biology of Reproduction**, v. 25, p.629-638, 1981.

KOLHE, S.; DEB, S. Dysmenorrhoea. **Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine**, v. 11, p.311-316, 2011.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C .R. B. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs: Current Issues. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, 2002

LOKE, Y. W.; KING, A. Immunology of human implantation: an evolutionary perspective. **Human Reproduction**, v. 11, p.283-286, 1996.

LUMSDEN, M.A. et al. The Concentrations of Prostaglandins in Endometrium During the Menstrual Cycle in Women with Measured Menstrual Blood Loss. **Prostaglandins, Leukotrienes And Medicine**, v. 23, p.217-227, 1986.

LV, X. et al. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. **Chemistry Central Journal**, v. 9, n. 1, p.1-14, 2015.

LYU, S.; PARK, W. Production of Cytokine and NO by RAW 264.7 Macrophages and PBMC In Vitro Incubation with Flavonoids. **Archives Of Pharmacal Research**, v. 28, n. 5, p.573-581, 2005.

MA, H. et al. Altered Cytokine Gene Expression in Peripheral Blood Monocytes across the Menstrual Cycle in Primary Dysmenorrhea: A Case-Control Study. **Plos One**, v. 8, n. 2, p.55200-55213, 4 fev. 2013.

- MARIONS, L.; DANIELSSON, K. G. Expression of cyclooxygenase in human endometrium during the implantation period. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 10, p.961-965, 1999.
- MAYBIN, J. A. et al. Novel Roles for Hypoxia and Prostaglandin E2 in the Regulation of IL-8 During Endometrial Repair. **The American Journal Of Pathology**, v. 178, n. 3, p.1245-1256, 2011
- MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **The American Physiological Society**, v. 79, p.264-304, 1999.
- MENDES, R. T. et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 5, p.774-782, 2012.
- MENDONÇA, L.M.V.P. et al. **Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (Citrus latifolia Tanaka)**. [S.l.: s.n], 2006.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 6, p.1167-1179, 1992.
- MILNE, S. A.; JABBOUR, H. N. Prostaglandin (PG) F_{2α} Receptor Expression and Signaling in Human Endometrium: Role of PGF_{2α} in Epithelial Cell Proliferation. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 4, p.1825-1832. 2003.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**, 9º ed. Rio de Janeiro, 2013
- MORAES, W.P.; Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do flavonoides BAS1 isolado da planta Brosimum acutifolium. [S.l.: s.n], 2011.
- MORTOLA, J. F. Premenstrual Syndrome — Pathophysiologic Considerations. **New England Journal of Medicine**. v. 338, n. 4, p.256-257, 1998.
- MULAYIM, N. Chemokine Receptor Expression in Human Endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p.1491-1495, 2002.
- MUNRO, M.G. Medical management of abnormal uterine bleeding. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v 27, n 2, p.287-304, 2000
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p.723-737, 2011.
- NELSON, A. L.; TEAL, S. B. Medical therapies for chronic menorrhagia. **Obstet Gynecol Surv**, v. 62, n. 4, p.272-81, 2007.
- NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p.418-425, 2001.

NISHIHARA, J.; ISHIBASHI, T.; FUKUSHIMA, T.; SUN, B.; SATO, Y.; TODO, S. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 995, n. 1, p.171-182, 2003.

NOGATA, et al. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 70, n. 1, 2006

NORMAN, R. J; WU, R. The potential danger of COX-2 inhibitors. **Fertility And Sterility**, v. 81, n. 3, p.493-494, 2004.

NOWAK, J.; BORKOWSKA, B.; PAWLOWSKI, B. Leukocyte changes across menstruation, ovulation, and mid-luteal phase and association with sex hormone variation. **Am. J. Hum. Biol.**, p.1-8, 2016.

OBSTETRICS, C. **Their roles in gynecological disorders**. P 829-857. 1992

OWEN, J. A. Physiology of the menstrual cycle. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 28, p.333-338, 1975.

PATE, J. L.; KEYES, P. L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Society for Reproduction and Fertility**, v. 122, p.665-676, 2001.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p.1995-2018, 1998.

PRESTON, J.T; SMITH, S.K. Investigation of menorrhagia. *Current Obstetrics & Gynaecology*, v. 2, n. 3, p.130-135, 1992.

RESS, M. C. P.; ANDERSON, A.B.; DEMERS, L. M.; TUMBULL, A.C. Endometrial and Myometrial Prostaglandin Release during the Menstrual Cycle in Relation to Menstrual Blood Loss. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 58, n. 5, p.813-818, 1984.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p.986-1000, 2011.

SÁ, R. C. S; ANDRADE, L.; SOUSA, D. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. **Molecules**, v. 18, n. 1, p.1227-1254, 2013.

SAEED, S. A.; SURIA, A. Prostaglandins, menstruation, and menstrual disorders. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 120, p.120-126, 1986.

SALAMONSEN, L. A.; WOOLLEY, D. E. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 44, p.1-27, 1999.

SALAMONSEN, L. A.; ZHANG, J; BRASTED, M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p.95-108, 2002.

SALHAB, A.S.; GHARAIBEH, M. N.; SHOMAF, M. S.; AMRO, B I. Meloxicam inhibits rabbit ovulation. **Contraception**, v. 63, n. 6, p.329-333, 2001

SALES, K.J.; JABBOUR, H.N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 71, n. 3-4, p.97-117, 2003

SANTIAGO, R.C.; SCHOR, E.; MELO, N.R. Dismemorréia. **Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia**, v 2. p 215, 2002.

SCHALL, T. J; BACON, K. B. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 6, p.865-873, 1994.

SINREIH, M.; ANKO, M.; KENE, N.H.; KOCBEK, V.; RIZNER, T.L. Expression of AKR1B1, AKR1C3 and other genes of prostaglandin F₂ α biosynthesis and action in ovarian endometriosis tissue and in model cell lines. **Chemico-biological Interactions**, v. 234, p.320-331, 2015.

SMITH, S. K. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 5, p.509-519, 1998

SMITH, S.K. et al. Prostaglandin synthesis in the endometrium of women with ovular dysfunctional uterine bleeding. **Br J Obstet Gynaecol**, v 88, n 4, p 434-442, 1981.

SOOKVANICHSILP, N.; PULBUTR, P. Anti-implantation effects of indomethacin and celecoxib in rats. **Contraception**, v. 65, n. 5, p.373-378, 2002.

SUGINO, N. et al. Withdrawal of Ovarian Sterioids Stimulates Prostaglandin F₂ α Production Through Nuclear Factor- κ B Activation via Oxygen Radicals in Human Endometrial Stromal Cell: Potential Relevance to Menstruation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 2, p.215-22, 2004.

SULLIVAN, M. W. et al. Ovarian Responses in Women to Recombinant Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone (LH): A Role for LH in the Final Stages of Follicular Maturation¹. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 84, n. 1, p.228-232, 1999

TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**. v. 94, p.8-16, 2015.

THIRUCHELVAM, U. et al. The importance of the macrophage within the human endometrium. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p.217-225, 2012.

EIJKEREN, M.A. et al. Menorrhagia: Current Drug Treatment Concepts. **Drugs**, v 43, n 2, p. 201-209. 1992.

WALLACE, S; KEIGHTLEY, A.; GIE, C. Dysmenorrhoea. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 12, n. 3, p.149-154, 2010.

WARNER, P. E, et al. Menorrhagia I: measured blood loss, clinical features, and outcome in women with heavy periods: a survey with follow-up data. **Am J Obstet Gynecol**, v.190, n.5, p.1216-23, 2004.

WILLMAN, E. A.; COLLINS, W. P.; CLAYTON, S. G. Studies in the involvement of prostaglandins in uterine symptomatology and pathology. **Bjog: An**

International Journal of Obstetrics and Gynaecology, v. 83, n. 5, p.337-341, 1976.

WISSINK, S.; HEERDE, E. C.; BURG, B.; SAAG. A Dual Mechanism Mediates Repression of NF- κ B Activity by Glucocorticoids. **Mol Endo**, v. 12. P 355-363, 1998.

WONG, L P. Attitudes towards dysmenorrhoea, impact and treatment seeking among adolescent girls: A rural school-based survey. **Australian Journal of Rural Health**, v. 19, n. 4, p.218-223, 2011.

WYMANN, M. P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p.162-176, 2008.

YANG, Y. et al. Identification of Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Potent Endothelial Cell Growth-Promoting Agent Released by Ectopic Human Endometrial Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 12, p.4721-4727, 2000.

YASSIN, S.A.T. Herbal remedy used by rural adolescent girls with menstrual disorders. **Journal of American Science**, v. 8, n.1, p. 467-474, 2012.

YOON, W.; LEE, N. H.; HYUN, C. Limonene Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide, Prostaglandin E2, and Pro-inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Macrophages. **Journal of Oleo Science**, v. 59, n. 8, p.415-421, 2010.

YUE, T. L. et al. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 75, n. 1, p.1-7, 1994.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e Fitoteráticos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoteráticos e Fitofármacos no Brasil. **Nova Química**, v .24, n .1, 2001.