



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO MULTIDISCIPLINAR UFRJ – MACAÉ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



STEFANNY CALIXTO DA SILVA

**EFEITOS DO USO DE ANTICONCEPCIONAL COMBINADO ORAL SOBRE A
HISTOMORFOMETRIA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS
ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

**MACAÉ
2022**

STEFANNY CALIXTO DA SILVA

**EFEITOS DO USO DE ANTICONCEPCIONAL COMBINADO ORAL SOBRE A
HISTOMORFOMETRIA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS
ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia
do Centro Multidisciplinar UFRJ –
Macaé como requisito para obtenção
do título de farmacêutico.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Helene Nara
Henriques Blanc

MACAÉ

2022

CIP - Catalogação na Publicação

S586

Silva, Stefanny Calixto da

Efeitos do uso do anticoncepcional combinado oral sobre a histomorfometria gástrica de camundongos fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica / Stefanny Calixto da Silva - Macaé, 2022.

50 f.

Orientador(a): Helene Nara Henriques Blanc .

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Estômago. 2. Obesidade. 3. Contraceptivo oral combinado. 4. Etinilestradiol.
I. Blanc, Helene nara henriques, orient. II. Título.

CDD 615.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé
Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

STEFANNY CALIXTO DA SILVA

**EFEITOS DO USO DE ANTICONCEPCIONAL COMBINADO ORAL SOBRE A
HISTOMORFOMETRIA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS
ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 08 de junho de 2022

Comissão avaliadora:

Prof. Dra. Helene Nara Henriques Blanc (Presidente da banca)

Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé

<http://lattes.cnpq.br/7109489856293054>

Prof. Dra. Tais Fontoura de Almeida

Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4888202530912343>

Prof. Dra. Juliana Tomaz Pacheco Latini

Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4232978216805700>

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho a todos que acreditaram
e torceram por mim, em especial:
*À minha mãe, **Alexandra**, que sempre me incentivou
a estudar e a seguir meus sonhos.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Alexandra, por todo incentivo à minha educação e por ser um exemplo de mulher estudiosa, que ultrapassa todos os obstáculos para alcançar seus objetivos.

À Márcia e Francis, minha irmã Vitória e minha madrinha do coração Cristina, por todo o apoio e palavras de encorajamento.

Ao meu parceiro de vida Victor, que esteve comigo durante toda a minha trajetória acadêmica e foi meu ombro-amigo nos momentos mais difíceis da graduação.

Às minhas orientadoras, Prof.^a Dr.^a Rosane Aparecida Ribeiro e Prof.^a Dr.^a Helene Nara Henriques Blanc, por me aceitarem como orientanda, por acreditarem no meu potencial quando eu mesma duvidava, pelos ensinamentos e paciência. Vocês me inspiram.

Aos meus amigos de profissão Ráfany, Lucas, Diana, Débora, Thuane, Mateus, Alana e Ian pelos abraços, risadas, conselhos, horas de estudo e por estarem comigo ao decorrer desses cinco anos.

Às minhas amigas Thayla, Michelle, Juliana, Rayssa, Maria Aparecida, Erika Mayara, Andreza e Adriana por todo amor e suporte que me dão todos os dias.

Ao meu grande amigo Alexandre por todo o incentivo, carinho e risadas.

Aos meus cachorros Yui, Rabito e Roger por me recepcionarem todos os dias após um dia exaustivo de aulas e pesquisa, e pela companhia enquanto elaborava esse trabalho de conclusão de curso.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiopatologia, em especial, Janaina, Gésily e Ana Beatriz por todo empenho e parceria para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos professores que passaram pela minha vida e contribuíram para a minha formação. Serei eternamente grata por todo o conhecimento adquirido, pois foi o que me permitiu chegar até aqui.

Ao Pibic/UFRJ, pela bolsa de estudos e pelo apoio aos projetos desenvolvidos pelo laboratório.

Aos animais utilizados nesse projeto de pesquisa, todo o meu respeito e gratidão.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com a minha formação.

“A felicidade não é algo que você tem que alcançar.
Você ainda pode se sentir feliz durante o processo de alcançar algo”.
(Kim Namjoon)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das estruturas químicas dos estrogênios sintéticos valerato de estradiol, etinilestradiol e 17 β -estradiol .	15
Figura 2. Representação das estruturas químicas das progestinas de primeira geração, derivadas da progesterona e da testosterona .	16
Figura 3. Representação das estruturas químicas das progestinas de segunda, terceira e quarta geração .	17
Figura 4. Fotomicrografia do estômago (cárdia).	23
Figura 5. Fotomicrografia do estômago de camundongo. Porção não glandular (esquerda) transicionando para a glandular (direita).	24
Figura 6. Representação do protocolo experimental.	27
Figura 7. Peso corporal, peso da gordura mesentérica e peso do estômago de fêmeas tratadas com ACO e HFD.	29
Figura 8. Histomorfometria da porção não secretora do estômago de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD.	30
Figura 9. Fotomicrografias da túnica mucosa da porção não secretora gástrica de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD.	31
Figura 10. Histomorfometria da porção secretora do estômago de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD.	32
Figura 11. Fotomicrografias da túnica mucosa da porção secretora gástrica de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD.	33

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACO	Anticoncepcional Combinado Oral
DRSP	Drospirenona
E2	17 β -Estradiol
E2V	Valerato de Estradiol
EE	Etinilestradiol
ER α	Receptor de Estrogênio Alfa
ER β	Receptor de Estrogênio Beta
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HFD	Dieta Hiperlipídica
RM	Receptor Mineralocorticoide

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Anticoncepcionais hormonais	12
2.2 Anticoncepcionais combinados orais.....	14
2.3 Efeitos terapêuticos e adversos dos Anticoncepcionais Combinados Orais.....	17
2.4 Obesidade e prejuízos morfofuncionais gástricos	18
2.5 Anticoncepcional combinado oral, obesidade e comprometimento gástrico	20
2.6 Aspectos histológicos do estômago.....	22
3 JUSTIFICATIVA.....	24
4 OBJETIVO	24
4.1 Objetivo geral	24
4.2 Objetivo específico	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1 Grupos Experimentais	25
5.2 Avaliação da Obesidade	27
5.3 Análise histomorfométrica gástrica	27
5.4 Análise estatística.....	28
6 RESULTADOS.....	28
6.1 Avaliação da obesidade	28
6.2 Análise histomorfométrica gástrica	29
6.2.1 Túnica Mucosa – Porção não secretora gástrica	29
6.2.2 Túnica Mucosa – Porção secretora gástrica.....	31
7 DISCUSSÃO	33
8 CONCLUSÃO	40
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
10 ANEXO (documento do comitê de ética).....	50

RESUMO

Os contraceptivos hormonais constituem métodos com elevada adesão pelo público feminino. Apesar do trato gastrointestinal ser a primeira via de contato destes fármacos, pouco se sabe dos seus efeitos sobre a morfologia gástrica quando associado a condições obesogênicas. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração contínua do anticoncepcional combinado oral (ACO) composto por drospirenona (DRSP) e etinilestradiol (EE) sobre a histomorfometria gástrica de camundongos fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD). Camundongos fêmeas Swiss adultas foram alimentadas com dieta normolipídica ou HFD por 65 dias e receberam diariamente 0,2 mL de água destilada via gavagem sem [grupos: controle (CTL) e CH65, respectivamente], ou com 0,6µg de EE e 60µg de DRSP (grupos ACO e AH65, respectivamente). Após 35 dias, metade das fêmeas que compunham os grupos CTL e ACO passaram a receber HFD (grupos CH30 e AH30, respectivamente). Após 65 dias de tratamento, o peso corporal das fêmeas ACO não diferiu de CTL. Os grupos CH65 e CH30 apresentaram maior peso corporal, enquanto a administração de ACO impediu o ganho de peso nas fêmeas que receberam que receberam HFD (AH65 e AH30). O grupo ACO apresentou aumento do peso do estômago. A análise histomorfométrica da porção secretora gástrica evidenciou que a ingestão de HFD aumentou a espessura da muscular da mucosa dos grupos CH30 e CH65. O ACO associado à HFD aumentou a espessura do epitélio secretor gástrico nas fêmeas AH65. Na porção não secretora gástrica, as espessuras da camada de queratina, do epitélio e da muscular da mucosa foram menores nas fêmeas ACO em relação às CTL. A ingestão de HFD diminuiu a espessura da camada de queratina, do epitélio e da muscular da mucosa nas fêmeas CH65, mas aumentou a espessura do epitélio da mucosa no grupo CH30. O tratamento com ACO associado a HFD aumentou a espessura da queratina e da muscular da mucosa nas fêmeas AH30 e AH65, sendo que este último grupo apresentou hipertrofia do epitélio da mucosa. Portanto, a administração de ACO, composto por EE e DRSP, impediu o ganho de peso induzido pelo consumo de HFD, provocou aumento do peso do estômago nas fêmeas que receberam apenas o contraceptivo e alterações histomorfométricas que podem comprometer a atividade fisiológica gástrica.

Palavras-chave: Estômago, obesidade, contraceptivo hormonal, Etinilestradiol, Drospirenona.

1 INTRODUÇÃO

Aprovada em 1960, nos Estados Unidos, pelo *Food and Drug Administration* (FDA), a pílula anticoncepcional, composta por análogos dos hormônios estrogênio e progesterona, revolucionou os paradigmas sociais, levantando discussões sobre o controle da natalidade, sexualidade, liberdade feminina, fertilidade e seus impactos político-religiosos. Atualmente, é um dos métodos mais utilizados pelo público feminino devido a sua eficácia em mimetizar os hormônios sexuais endógenos, impedindo a contracepção (BLACK *et al.*, 2017; CAREY e ALLEN, 2012; TYRER, 1999). Farmacologicamente, o anticoncepcional oral pode ser combinado (ACO), quando há a associação de um componente estrogênico com um progestógeno, ou isolado, tendo apenas o progestógeno na formulação (BLACK *et al.*, 2017).

O primeiro ACO esteve associado a sérios efeitos adversos, como episódios de tromboembolismo venoso, sangramentos irregulares, ganho de peso e câncer de mama, devido às altas concentrações dos princípios ativos. Por isso, desde a sua inserção no mercado, os contraceptivos hormonais têm sofrido modificações farmacotécnicas e estruturais para torná-los mais seguros, sem o comprometimento da eficácia (DE LEO *et al.*, 2016; INMAN *et al.*, 1970). Um dos sistemas mais impactados pela atividade hormonal dos anticoncepcionais é o trato gastrointestinal, ocasionando o desequilíbrio da microbiota intestinal, que corrobora com quadros de dor abdominal, refluxo, constipação ou episódios diarreicos. Há estudos que demonstram uma relação de causalidade entre o uso de contraceptivos esteroides e o risco aumentado do desenvolvimento de Doença de Crohn, bem como de colite ulcerativa (KHALILI, 2016; KHALILI *et al.*, 2016; LESKO *et al.*, 1985; RAMCHARAN *et al.*, 1980; RHODES *et al.*, 1984). No entanto, pouco se sabe sobre os impactos do uso de anticoncepcional combinado oral sobre a histomorfometria gástrica, em condições obesogênicas. Portanto, é necessário elucidar as possíveis alterações atribuídas ao uso de ACO associado ao consumo de dieta hiperlipídica (HFD).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anticoncepcionais hormonais

Os anticoncepcionais hormonais são fármacos amplamente utilizados pelo público feminino devido a sua eficácia em prevenir a concepção, por meio da

mimetização dos hormônios sexuais progesterona e estrogênio. Podem ser classificados em combinado, devido a presença de um componente estrogênico e um progestógeno, ou isolado, contendo apenas o progestógeno (DE LEO *et al.*, 2016; SITRUK-WARE, 2006). O mecanismo de ação desses medicamentos não se limita a inibição da ovulação em decorrência de um *feedback* negativo no hipotálamo, mas também por aumentarem a espessura do muco cervical, que é responsável por facilitar a locomoção dos espermatozoides durante a atividade; além disso, reduzem o peristaltismo tubário, promovem a hipotrofia do endométrio, com consequente diminuição da receptividade deste tecido para nidação (CHAVES *et al.*, 2021; HORVATH; SCHREIBER; SONALKAR, 2000; WOOD; BAIRD; GLASIER, 1993).

A primeira pílula anticoncepcional, registrada como Enovid®, tinha como princípios ativos o mestranol e noretisterona. A princípio, foi aprovada para o tratamento de distúrbios ginecológicos em 1957 e, até ser formalizada como contraceptivo em 1960, seu uso era *off-label* (JUNOD, 2002). Desde então, é um dos métodos de maior adesão devido a sua eficácia, reversibilidade, fácil utilização e por apresentar propriedades adicionais não-contraceptivas (HORVATH; SCHREIBER; SONALKAR, 2000).

Apesar da existência de métodos contraceptivos não-hormonais, como dispositivo intrauterino (DIU) não hormonal, preservativo feminino e masculino e esterilização, cerca de 16% da população feminina mundial em idade reprodutiva faz o uso de pílula anticoncepcional, o equivalente a 151 milhões de usuárias (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2019). Em 2013, a prevalência da utilização de contraceptivos hormonais no Brasil era de 29,7%, sendo o método de maior adesão por mulheres com idade entre 15 e 49 anos (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2019). Um fator contribuinte para este percentual, foi a inserção das pílulas anticoncepcionais na Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica, em especial os ACO, selecionados por apresentarem eficácia de 99,9% e efetividade entre 97-98%, demonstrando uma correlação positiva com controle de natalidade, contribuindo para a manutenção das políticas de planejamento familiar (BRASIL, 2020; WANNMACHER, 2003).

2.2 Anticoncepcionais combinados orais

A formulação dos ACO, diferente dos isolados, pode variar na dose e tipo de estrogênio, dose e tipo de progestina, bem como o regime adotado, monofásico, bifásico, trifásico ou quadrifásico (DE LEO *et al.*, 2016). A fração dos hormônios presentes no contraceptivo determina sua fase, portanto, os monofásicos possuem a mesma dosagem e concentração, sendo estes os mais utilizados, e se apresentam em cartelas de 21, 24 ou 28 comprimidos, dependendo do esquema terapêutico; os bifásicos apresentam duas fases de dosagem com a mesma composição dos componentes ativos e, por fim, os que possuem três fases distintas em relação a dose, sendo chamados de trifásicos (DICKSON; EISENFELD, 1981; REGIDOR, 2018; SITRUK-WARE, 2006).

Os ACOs exercem sua atividade por sinergismo dos princípios ativos em suprimir a ovulação devido ao *feedback* negativo no hipotálamo, inibindo o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), acarretando a diminuição da secreção do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). Ainda, o componente estrogênico mantém um padrão de sangramento de retirada regular, pois auxilia na estabilização do endométrio, enquanto a progestina promove atrofia e decidualização endometrial, espessamento do muco cervical e alteração da motilidade tubária (BLACK *et al.*, 2017; COOPER e MADHY, 2021).

Um dos primeiros componentes estrogênicos utilizados no ACO foi o valerato de estradiol (E2V), um estrogênio de origem natural. Atualmente, também são empregados o etinilestradiol (EE) e o 17 β -estradiol (E2), no entanto, E2V e EE são os mais comumente encontrados nas formulações (DE LEO *et al.*, 2016; DICKSON e EISENFELD, 1981; STANCZYK *et al.*, 2013). A estrutura química dos principais estrogênios sintéticos utilizados nos ACOs está mostrada na Figura 1.

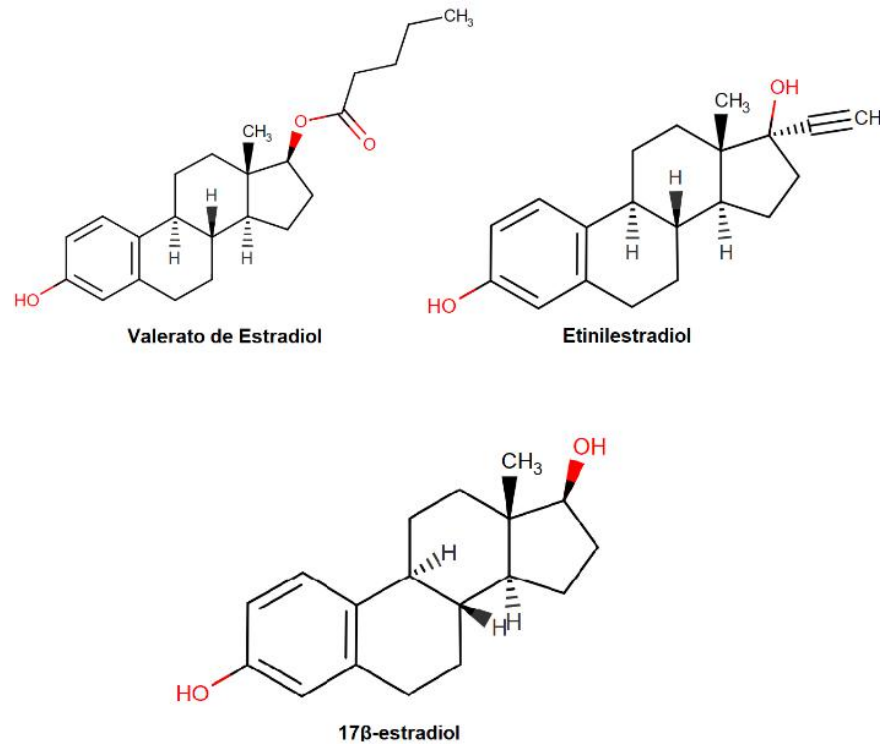


Figura 1. Representação das estruturas químicas dos estrogênios sintéticos valerato de estradiol, etinilestradiol e 17β-estradiol (adaptado de Drugbank Database, 2021).

A dose de estrogênio nas formulações precisou ser adaptada à medida em que foi observada uma relação de risco e causalidade entre a utilização de pílulas hormonais e desordens vasculares, como tromboembolismo e hipertensão, por estimular a síntese de fatores de coagulação e do sistema renina-angiotensina (DHONT, 2010; RISK...,1967; TYLER, 1963).

Notavelmente, o ajuste na concentração de estrogênio atenua o perfil de efeitos adversos comumente associados aos contraceptivos, diminuindo a sensibilidade mamária, náuseas e o risco de evento cardiovascular, apesar de não o eliminar (DHONT, 2010; TRENOR *et al.*, 2011). Desde que foi sintetizado em 1938, o EE teve sua dose reduzida de 50 µg para 15 µg, e mesmo as concentrações mais baixas desse ativo são capazes de suprimir a atividade ovariana quando associado a uma progestina com alta atividade e potencial antigonadotrófico (DE LEO *et al.*, 2016).

As progestinas são classificadas em gerações, cuja denominação é um representativo do tempo em que foram desenvolvidas e comercializadas. A criação

de novas progestinas, assim como no caso dos estrogênios, foi impulsionada pela necessidade de minimizar os efeitos adversos, como náuseas, sangramento irregular e retenção hídrica, atribuídos a elevadas doses desses ativos na pílula (DE LEO *et al.*, 2016; DHONT, 2010).

Os hormônios progesterona e testosterona são os precursores das progestinas de primeira geração. As progestinas obtidas a partir da progesterona são derivadas da 17 α -OH-progesterona e 19-Norprogesterona, enquanto as obtidas a partir da testosterona são derivadas da 19-Nortestosterona, recebendo a nomenclatura de pregnanas e estranas, respectivamente. As pregnanas são comumente encontradas na forma de acetatos, como o de medroxiprogesterona e ciproterona; quanto às estranas, as mais conhecidas são o linestrenol, etinodiol e noretisterona (Fig. 2; SITRUK-WARE, 2006; VIGO *et al.*, 2011). A Figura 2 mostra a representação química das progestinas de primeira geração.

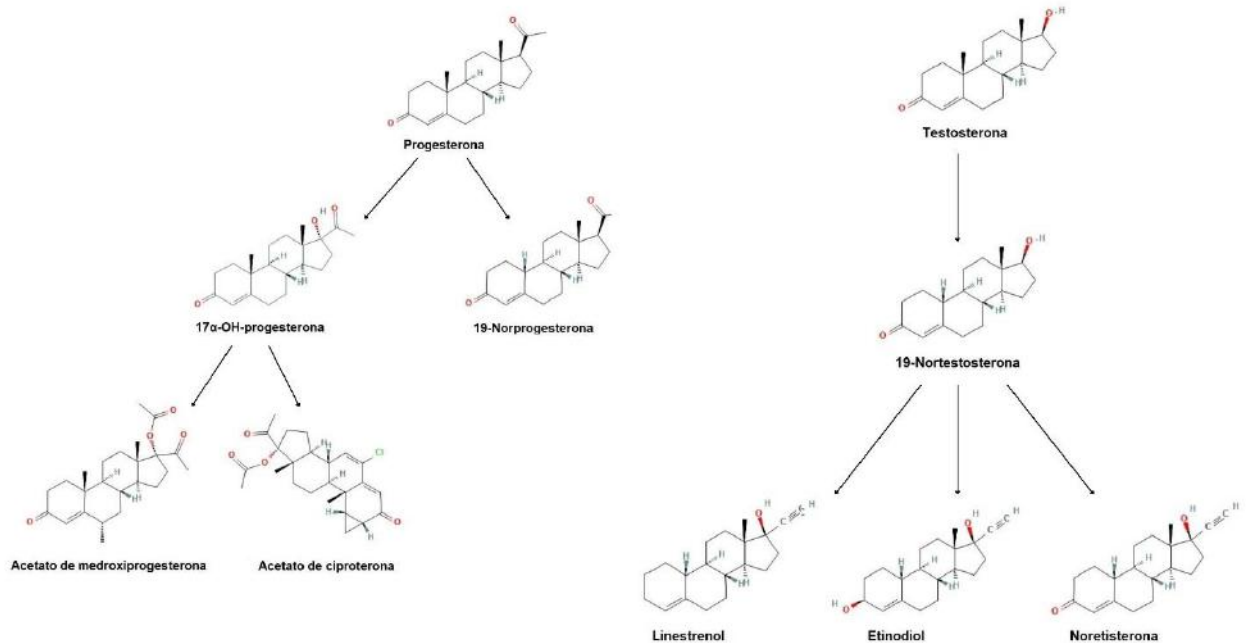


Figura 2. Representação das estruturas químicas das progestinas de primeira geração, derivadas da progesterona e da testosterona (adaptado de SITRUK-WARE, 2006; VIGO *et al.*, 2011 e PubChem).

Os derivados da 19-Nortestosterona compõem a segunda geração das progestinas (gonanas) e possuem maior atividade progestagênica que as estranas (VIGO *et al.*, 2011). O norgestrel e levonorgestrel, representam esta geração, sendo este último o precursor das progestinas de terceira, como o gestodeno e desogestrel. A quarta e última geração é representada pelo nomegestrol, dienogest, trimegestona e a drospirenona (DE LEO *et al.*, 2016; SITRUK-WARE, 2006). A

drospirenona (DRSP) é um análogo da espironolactona, com propriedades antimineralocorticoide, progestagênica e com moderado efeito antiandrogênico. Sabe-se que muitos dos efeitos adversos desencadeados pelo uso dos contraceptivos hormonais, são associados ao potencial androgênico elevado e, apesar da evolução das progestinas, esses efeitos não foram eliminados, apenas minimizados. Portanto, essas propriedades adicionais observadas na DRSP são características objetivadas no processo de desenvolvimento de novos fármacos (BRYNHILDSEN, 2014; CAPRIO et al., 2011; SITRUK-WARE, 2006). As estruturas químicas das progestinas de terceira e quarta gerações estão mostradas na Figura 3.

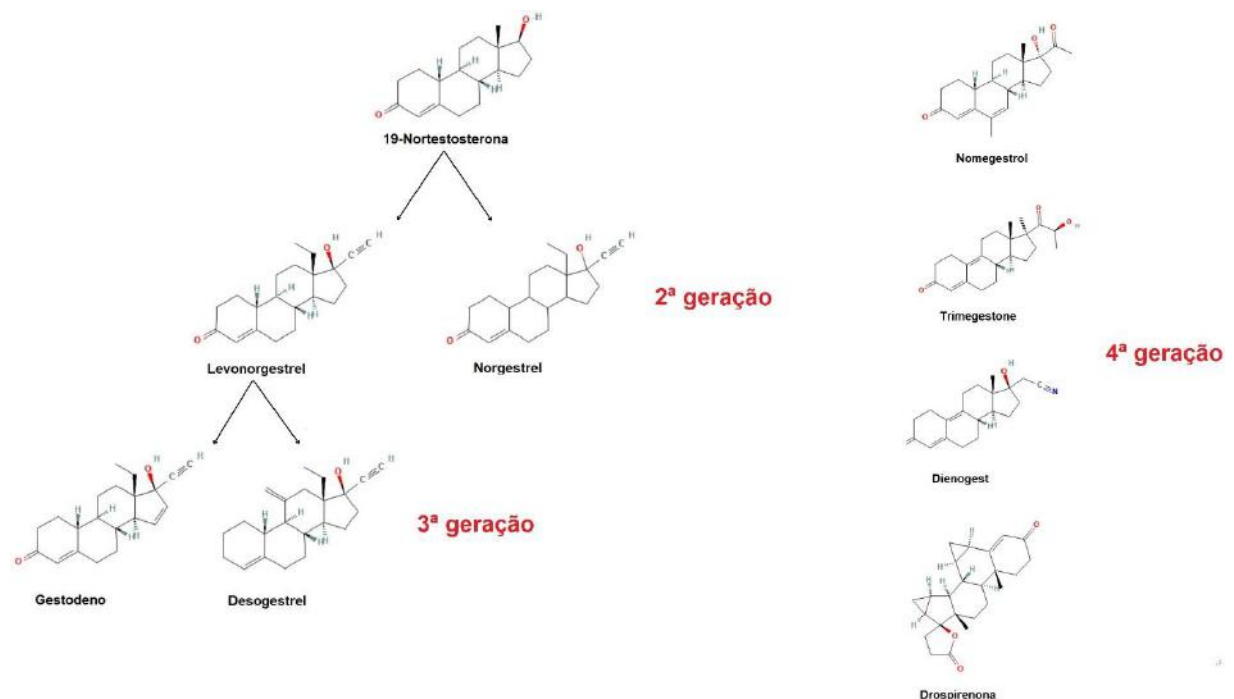


Figura 3. Representação das estruturas químicas das progestinas de segunda, terceira e quarta geração (adaptado de DE LEO *et al.*, 2016; SITRUK-WARE, 2006 e PubChem).

2.3 Efeitos terapêuticos e adversos dos Anticoncepcionais Combinados Orais

Impedir a concepção de forma segura, reversível e eficaz é o principal efeito terapêutico dos ACOs (DRAGONMAN, 2014). No entanto, são conhecidos benefícios não-contraceptivos, os quais estendem sua indicação para o tratamento de diferentes distúrbios ginecológicos, como sangramento menstrual desregular, dismenorreia, endometriose, adenomiose, ovários policísticos, síndrome e transtorno disfórico pré-menstrual (THE ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP, 2005)

As formulações combinadas de estrogênio e progesterona têm apresentado resultados positivos no tratamento de hiperandrogenismo, que se manifesta por meio da acne, seborreia, alopecia e hirsutismo, sintomas decorrentes do aumento da concentração e atividade de androgênios (DE LEO *et al.*, 2016). Neste tipo de quadro clínico, a escolha do ACO pode ser baseada na presença de uma progestina com potente atividade antiandrogênica, destacando os acetatos de ciproterona e clormadinona, dienogest e DRSP (SCHINDLER, 2012).

Estudos avaliando a relação entre o uso de ACO e a incidência de neoplasias, evidenciaram uma redução significativa no risco de câncer ovariano em indivíduos com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, e um efeito protetor para a manifestação de câncer colorretal e endometrial (IVERSEN *et al.*, 2017; MOORMAN *et al.*, 2013). Por outro lado, o seu uso prolongado está relacionado a uma maior predisposição no desenvolvimento de câncer mamário e cervical, sendo este risco minimizado com a suspensão da administração (DE LEO *et al.*, 2016; IVERSEN *et al.*, 2017).

Os efeitos adversos influenciam diretamente na adesão do medicamento, podendo ser mais brandos como náusea, cefaleia, dor abdominal, disbiose, refluxo, constipação, retenção hídrica, mastalgia, sangramento de escape e ganho de peso; ou de maior gravidade, como tromboembolismo e infarto do miocárdio, sendo este último uma condição atípica em usuárias não fumantes, considerando que o tabagismo potencializa os eventos cardiovasculares dos contraceptivos (HORVATH; SCHREIBER; SONALKAR, 2000; LIDEGAARD, 1999; SITRUK-WARE, 2006).

O uso de ACO não é recomendado para mulheres hipertensas, diabéticas, portadoras de trombofilias hereditárias, mutações ou deficiência de componentes da cascata de coagulação (DE BASTOS *et al.*, 2014; HORVATH; SCHREIBER; SONALKAR, 2000). Portanto, a escolha e análise da concentração do progestógeno e estrogênio, regime de administração e perfil do indivíduo devem ser considerados pelo prescritor, pois influenciará na melhor resposta terapêutica e contribuirá para a minimização dos efeitos adversos (DRAGOMAN, 2014; STEWART e BLACK, 2015).

2.4 Obesidade e prejuízos morfofuncionais gástricos

A obesidade é definida como uma doença crônica não transmissível, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, cujos prejuízos a qualidade de vida do indivíduo não se limitam ao comprometimento fisiológico, mas

psicossociais, em todas as suas esferas (ORTIZ e KWO, 2015; WU e BERRY, 2018). Apresenta um perfil epidemiológico progressivo, de público heterogêneo, afetando homens e mulheres, independente da faixa etária, etnia e/ou grau socioeconômico (WANG e BEYDOUN, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2018), no ano de 2016, cerca de 13% da população mundial era obesa. A Pesquisa Nacional em Saúde realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostrou que um em cada quatro brasileiros com 18 anos ou mais eram obesos em 2019, sendo observado também que o sobrepeso acometia 62,6% das mulheres e 57,5% dos homens (IBGE, 2019).

Apesar de se tratar de uma doença de etiologia multifatorial, o crescimento acentuado de novos casos de obesidade, pode estar associado ao sedentarismo, consumo de alimentos com baixo valor nutritivo e ultraprocessados, desbalanço energético na relação consumo/gasto calórico, desregulação endócrina, características genéticas, doenças pré-existentes, uso de medicamentos como corticoides e alguns antidepressivos, além de condições socioambientais atreladas à hábitos de vida como alcoolismo e tabagismo (HRUBY e HU, 2015; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1998).

O perfil sistêmico da obesidade explica a suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de comorbidades, ou agravo de condições clínicas pré-existentes, como o *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, osteoartroses e doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA) (BORNSTEIN *et al.*, 2020; BURTON *et al.*, 1985).

Um dos principais sistemas acometidos pela obesidade é o trato gastrointestinal, por ser a primeira via de contato do alimento com organismo e desempenhar o papel fisiológico da digestão. Alterações na secreção de hormônios digestivos, motilidade, indução de processos inflamatórios e ulcerativos, como colite e doença de Crohn; aumento do depósito de gordura mesentérica, adenomas, neoplasias, refluxo gastroesofágico, cálculos biliares e disbiose são algumas das complicações mais comuns em indivíduos obesos (BILSKI *et al.*, 2019; MIRON, 2019; NAM, 2017; WOLIN; CARSON; COLDITZ, 2010).

No estômago, estudos (MADDOX *et al.*, 1989; VERDICH *et al.*, 2000; WRIGHT *et al.*, 1983) sugerem que indivíduos obesos apresentam menor volume pós-prandial, esvaziamento gástrico acelerado e disfunção na motilidade gástrica, o que afeta a saciedade e contribui para o aumento da frequência alimentar (MUSHREF e SRINIVASAN, 2013). A grelina, hormônio responsável por regular o balanço energético e a ingestão alimentar, é regulada negativamente na obesidade e supõe-se que isso seja uma adaptação fisiológica ao balanço energético positivo na patologia (TSCHOP *et al.*, 2001).

O acúmulo excessivo de gordura corporal predispõe um processo inflamatório e estresse oxidativo causado pela redução de adiponectina e liberação de mediadores como interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e proteína quimioatraente de monócitos-1 (ELLULU *et al.*, 2017). A inflamação propicia o surgimento de gastrite atrófica que acomete a mucosa por meio da degradação do epitélio glandular, com consequente substituição das células glandulares por tecido fibroso e intestinal (GAO *et al.*, 2010).

Além disso, alguns estudos mostram o aparecimento de metaplasia intestinal no estômago, o que poderia anteceder a neoplasia. Nesse contexto, o excesso de peso corporal pode ser um cofator para o desenvolvimento de câncer gástrico e para o aumento dos níveis de leptina circulante, tendo em vista que sua secreção é proporcional aos estoques de gordura corporal (FRIED *et al.*, 2000; INAGAKI-OHARA *et al.*, 2016).

2.5 Anticoncepcional combinado oral, obesidade e comprometimento gástrico

O primeiro ACO continha concentrações elevadas de progestina e estrogênio, sendo associado a uma série de efeitos adversos, dentre eles o ganho de peso que, apesar das modificações nas formulações, ainda é uma queixa frequente das usuárias (DE LEO *et al.*, 2016; INMAN *et al.*, 1970). Segundo Stachenfeld *et al.* (1999), o estrogênio possui efeitos primários na osmorregulação, reduzindo a excreção renal de água, diminuindo a tonicidade plasmática, consequentemente, promovendo retenção hídrica e inchaço. Alguns autores sugerem que os ACOs influenciem no ganho de peso por meio de estímulos no sistema renina angiotensina-aldosterona, alterações no metabolismo de carboidratos e na indução do apetite (THE ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP, 2005).

Ao avaliar o perfil de ganho de peso associado a diferentes combinações de estrógeno e progestina, por meio do banco de dados Cochrane, Gallo *et al* (2014) não evidenciaram uma relação de causalidade significativa, sendo considerado um método contraceptivo recomendado para usuárias com sobrepeso e obesidade (BERENSON e RAHMAN, 2009; MODY e HAN, 2014). Por outro lado, um estudo de coorte realizado na Malásia, com 380 mulheres, verificou aumento no ganho de peso nas usuárias de anticoncepcionais hormonais em relação aos não hormonais (IBRAHIM *et al.*, 2019). Corroborando com esses achados, Endalifer *et al* (2016) apontaram que o uso de ACO aumenta o risco de sobrepeso e obesidade em duas vezes, sugerindo uma relação significativa entre estes dois parâmetros.

Apesar de usuárias de ACOs atribuírem o ganho de peso à administração contínua desses medicamentos, a literatura carece de informações que demonstrem uma relação de causalidade. A DRSP, utilizada como progestógeno em formulações combinadas, é um potente antagonista específico dos receptores mineralocorticoides e um análogo do diurético espironolactona, o que contribui para a diminuição da retenção hídrica associada ao estrogênio, impactando positivamente no peso corporal (SITRUK-WARE, 2006).

Caprio *et al.* (2011) observaram que a DRSP, ainda, é capaz de inibir vias críticas que modulam a adipogênese, diferenciação e expansão clonal de adipócitos e interfere na expressão de PPAR γ , o fator de transcrição chave da adipogênese, em células murinas 3T3-L1. Essa potente inibição na conversão adiposa também ocorreu em linhagem celular de pré-adipócitos humanos nos depósitos de gordura visceral, epicárdica e subcutânea (CAPRIO *et al.*, 2011). Adicionalmente, Armani *et al* (2014) observaram que camundongos alimentados com dieta moderadamente hiperlipídica, quando tratados com DRSP, não apresentaram aumento no ganho de peso ou na massa de tecido adiposo branco, alterações comuns na obesidade. Os benefícios citados são referentes as propriedades da DRSP, não sendo observados em outras progestinas sintéticas isoladamente ou associadas à um estrógeno.

O estrogênio é capaz de regular e distribuir a gordura corporal, mobilizar o colesterol e exerce um papel importante sobre o sistema reprodutor, cardiovascular e, principalmente, no sistema digestório. É descrito na literatura que esse hormônio exerce um efeito protetor sobre a mucosa gástrica, atuando como antioxidante por meio da ativação de enzimas antioxidantes, supressão da produção de espécies

reativas de oxigênio e neutralização de radicais livres, diminuindo a incidência de úlceras pépticas (CHEN *et al.*, 2019; IGNACIO *et al.*, 2009).

Por meio da regulação da expressão de genes-alvo nas células que possuem receptores intracelulares de estrogênio, como células de câncer gástrico humanas, esse hormônio modula vias de crescimento e diferenciação celular, estando intimamente relacionado com a ativação da apoptose. Somado a esses fatores regulatórios, o estrogênio induz a expressão de peptídeos cujos genes atuam como supressores tumorais, formam uma barreira protetora e reparam lesões da mucosa (KATOH, 2003; KATZENELLENBOGEN, 1996; TOKUNAGA *et al.*, 1986; ZHAO, 2003).

O papel dos hormônios sexuais sobre a fisiologia gástrica não é bem elucidado, mas estudos demonstraram que o estrogênio e a progesterona promovem uma resposta inibitória na contratilidade das células musculares do estômago, afetando a motilidade gástrica a nível tecidual através da ativação da via do óxido nítrico mediada por monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) na presença do agonista acetilcolina (AL-SHBOUL *et al.*, 2018a; AL-SHBOUL *et al.*, 2018b). Além disso, a diminuição na taxa de esvaziamento gástrico foi observada em ratos machos tratados cronicamente e expostos a altas doses de progesterona (COŞKUN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2002).

2.6 Aspectos histológicos do estômago

O estômago possui quatro regiões anatômicas, sendo a porção inicial, próxima a junção gastroesofágica, denominada cárdia, seguida do fundo, corpo e piloro. No entanto, histologicamente, consideram-se apenas três porções, devido à similaridade estrutural do fundo e corpo gástrico. Ainda, é formado por camadas, a camada mucosa, constituída por epitélio secretor, lâmina própria e muscular da mucosa. A submucosa é uma camada de tecido conjuntivo moderadamente denso, onde se localiza o plexo submucoso de Meissner. Logo após, se estende a camada muscular externa, formada por fibras de musculatura lisa de conformação longitudinal, circular e oblíqua, e pelo plexo mioentérico de Auerbach. A camada serosa é a mais externa da parede gástrica e consiste, basicamente, em uma membrana delgada (FRAUCHES *et al.*, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A histologia da cárdia está mostrada na Figura 4.

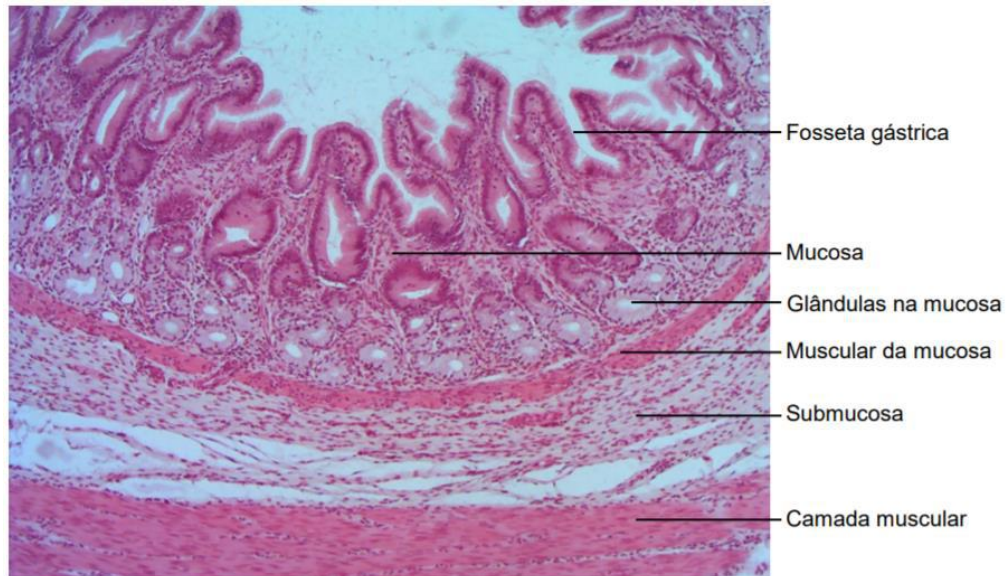


Figura 4. Fotomicrografia do estômago (região da cárdia). (Fonte: DE ANDRADE; FERRARI, 2020).

O estômago de camundongo é dividido em porção proximal, não glandular, cuja estrutura consiste em epitélio escamoso estratificado, revestido por uma camada de queratina que protege o epitélio de lesões mecânicas associadas à alimentação dos roedores, com estrato granuloso aparente e túnica muscular da mucosa que, à medida que transiciona para a porção distal, diminui a espessura. Anatomicamente, a mucosa não glandular reveste o fundo e uma pequena parte do corpo gástrico (FRANTZ *et al.*, 1991; GHOSHAL e BAL, 1989; RUBERT *et al.*, 2017).

A porção distal, glandular ou secretora, é composta por epitélio colunar simples, lâmina própria com células principais, parietais e foveolares, lâmina muscular da mucosa fina e tela submucosa de tecido conjuntivo frouxo vascularizado que se estende do corpo à região pilórica. A túnica muscular, composta pelas camadas espiral interna e oblíqua externa, é espessa e a serosa é fina (FRANTZ *et al.*, 1991; GHOSHAL e BAL, 1989; RUBERT *et al.*, 2017). As porções da túnica mucosa estão mostradas na Figura 5.

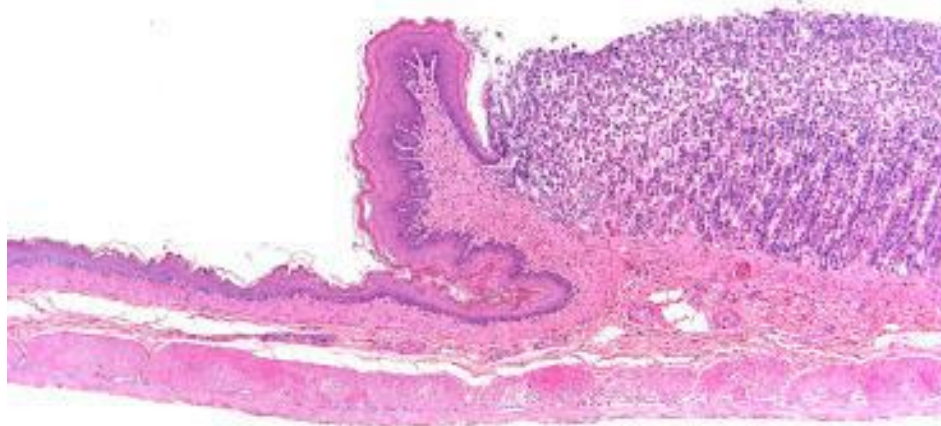


Figura 5. Fotomicrografia do estômago de camundongo. Porção não glandular (esquerda) transicionando para a glandular (direita). (Fonte: BOORMAN *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

A pílula anticoncepcional, em especial a combinada, é um dos métodos de primeira escolha por mulheres em idade reprodutiva para evitar a concepção. Apesar dos benefícios contraceptivos e não-contraceptivos dos análogos dos hormônios endógenos estrogênio e progesterona, os efeitos adversos contribuem para a interrupção do uso desses medicamentos, sendo o ganho de peso uma das queixas mais comuns. O sobrepeso e a obesidade são um problema de saúde pública mundial, cuja incidência e prevalência é maior no público feminino. É descrito na literatura o papel dos hormônios sexuais sobre a distribuição de gordura corporal, mas uma associação estreita entre o estrogênio e a progesterona e a fisiopatologia da obesidade ainda não foi atestada. O trato gastrointestinal é um dos principais sistemas prejudicados pela obesidade por ser responsável pelo processo digestivo e absorptivo, no entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos sobre a morfologia gástrica, tampouco quando há aumento nos níveis de androgênios pelo uso de contraceptivos. Sendo assim, é importante avaliar as possíveis alterações histomorfométricas atribuídas à essa associação, considerando o uso difundido de anticoncepcionais orais combinados para o controle de natalidade e o perfil progressivo da obesidade no público feminino.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do anticoncepcional combinado oral contendo Drospirenona e Etinilestradiol na histomorfometria gástrica de camundongos fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica.

4.2 Objetivo específico

- Avaliar o ganho de peso de camundongos fêmeas tratados com ACO associado a dieta hiperlipídica;
- Avaliar a deposição de gordura mesentérica e o peso do estômago em fêmeas tratadas com ACO associado a dieta hiperlipídica;
- Analisar alterações histomorfométricas no estômago de fêmeas tratadas com ACO associado a dieta hiperlipídica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Grupos Experimentais

Camundongos fêmeas *Swiss* de 80-100 dias de vida, provenientes do Biotério de Reprodução de Roedores (NUPEM, Campus UFRJ-Macaé; Aprovação CEUA UFRJ-Macaé sob nº: 0039, ANEXO 1), foram mantidas no Biotério de Experimentação de Roedores (NUPEM, Campus UFRJ-Macaé) sob condições controladas de luminosidade (12h claro/12h escuro), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45-65%). Após sete dias de aclimação, os animais foram distribuídos para compor os seguintes grupos experimentais:

Controle (CTL): fêmeas que receberam 0,2 mL de água destilada (veículo), e foram alimentadas com ração padrão normolipídica (Nuvital, Nuvilab, CR1, Curitiba, PR, BRA; teor lipídico de 14,8%) por 65 dias;

Controle + HFD 30 dias (CH30): fêmeas que receberam 0,2 mL de água destilada (veículo), e foram alimentadas com ração padrão normolipídica durante os primeiros 35 dias de experimento, tendo a dieta substituída por HFD (teor lipídico de 65,4%) por 30 dias, correspondendo ao término do tratamento;

Controle + HFD 65 dias (CH65): fêmeas que receberam 0,2 mL de água destilada (veículo), e foram alimentadas com HFD por 65 dias;

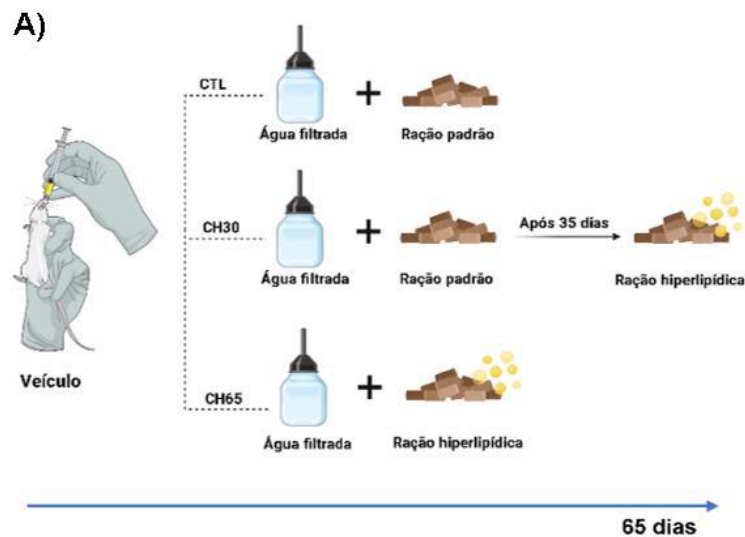
Anticoncepcional Combinado Oral (ACO): fêmeas que receberam 0,6 μg de EE e 60 μg de DRSP diluído em 0,2 mL de água destilada (dose adaptada por alometria, segundo OLIVEIRA *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2013), e foram alimentadas com ração padrão normolipídica por 65 dias;

Anticoncepcional Combinado Oral + HFD 30 dias (AH30): fêmeas que receberam 0,6 µg de EE e 60 µg de DRSP diluído em 0,2 mL de água destilada e foram alimentadas com ração padrão normolipídica durante os primeiros 35 dias de experimento, tendo a dieta substituída por HFD por 30 dias, correspondendo ao término do tratamento;

Anticoncepcional Combinado Oral + HFD 65 dias (AH65): fêmeas que receberam 0,6 µg de EE e 60 µg de DRSP diluído em 0,2 mL de água destilada e foram alimentadas com HFD por 65 dias.

Todos os tratamentos foram realizados diariamente, por gavagem e os animais receberam água filtrada *ad libitum* durante todo o período experimental. A representação do protocolo experimental pode ser vista na Figura 5.

A ração HFD foi preparada a partir da ração padrão, sendo para tanto, adicionados gordura de porco (banha; Aurora, Chapecó, SC, BRA) e óleo de soja (Liza, Mairinque, SP, BRA) para o aumento do teor lipídico. A adição de caseína purificada (Synth, Diadema, SP, BRA) corrigiu o valor proteico da dieta.



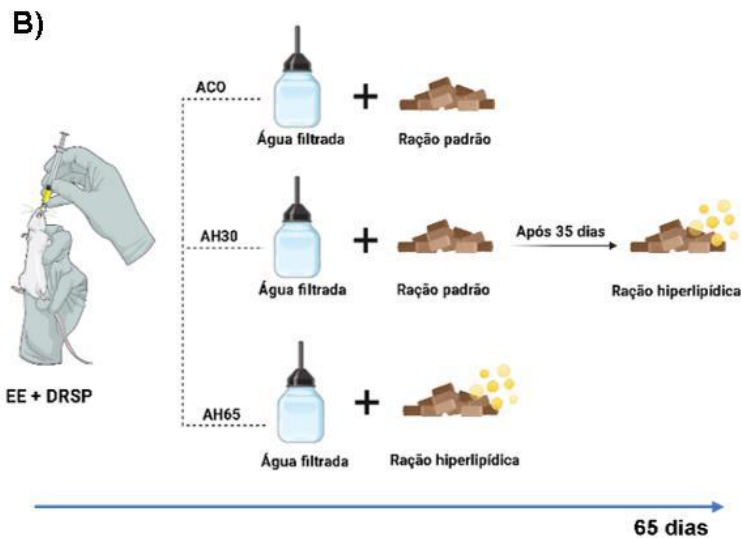


Figura 6. Representação do protocolo experimental. Camundongos fêmeas Swiss que receberam dieta padrão ou HFD por 65 dias associada à ingestão diária de 0,2 mL de veículo por gavagem (CTL e CH65). Fêmeas que receberam dieta padrão ou HFD por 65 dias associada à ingestão diária de solução contendo 0,6 µg de EE e 60 µg de DRSP por gavagem (ACO e AH65). Fêmeas que receberam ração padrão pelos primeiros 35 dias, e após, passaram a consumir HFD associada à ingestão diária de 0,2 mL de água destilada (CH30) ou solução contendo 0,6 µg de EE e 60 µg de DRSP por gavagem (AH30).

Ao término dos 65 dias de experimento, avaliou-se o ciclo estral dos camundongos CTL, CH30 e CH65 por meio do esfregaço vaginal, com o auxílio de uma pipeta contendo 10 µL solução salina 0,9% e microscópio óptico (CALIGIONI, 2009). Apenas as fêmeas em metaestro foram utilizadas, devido aos baixos níveis de gonadotrofinas, similar às que foram tratadas com ACO. Todos os animais foram eutanasiados por decapitação, em jejum pela manhã e, após laparotomia, o estômago e a gordura mesentérica foram dissecados e pesados.

5.2 Avaliação da ganho de peso

Os animais foram pesados semanalmente no decorrer do experimento para avaliação do ganho de peso corporal. Ao término dos 65 dias de experimento, foi feita a pesagem dos camundongos para obtenção de um peso corporal final.

5.3 Análise histomorfométrica gástrica

Após a eutanásia, a gordura mesentérica e o estômago das fêmeas de todos os grupos experimentais foram coletados. O estômago foi fixado em formol de Carson (88,5% de PBS, 10% de formaldeído e 1,5% de metanol), por 48 horas. Após, o tecido foi seccionado verticalmente, da junção gastroesofágica até o piloro, processado e incluído em parafina (Biotec, Biotec EIRELI - ME, São José dos Pinhais, PR). Foram realizados três cortes de 5 µm por lâmina, sendo três lâminas

por animal, utilizando micrótomo manual (Lupetec MRP 2015, São Paulo, BR). As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e fotografadas com o auxílio de um microscópio de luz (Novel BM 2100, China) acoplado à câmera (Tucsen USB 2.0 H series, China).

A histomorfometria foi realizada utilizando ferramentas do *software Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) medindo a espessura do epitélio e muscular da mucosa da porção secretora gástrica, assim como a camada de queratina, epitélio e muscular da mucosa da porção não secretora, em todos os campos fotografados.

5.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Os dados foram submetidos ao teste de distribuição de normalidade Shapiro-Wilk, e comparados por testes paramétricos (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's); $P < 0,05$ foi adotado como critério de significância.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação do peso corporal e gordura mesentérica

Ao decorrer dos 65 dias de tratamento com ACO composto por EE e DRSP associado ou não ao consumo de HFD, o peso corporal (PC) das fêmeas foi avaliado. Um perfil semelhante foi observado entre o grupo ACO (PC: 33 ± 2 g) em relação ao CTL (PC: 33 ± 3 g), sem alterações no peso corporal. As fêmeas que ingeriram HFD e veículo até o término do tratamento (CH65; PC: 47 ± 7 g) apresentaram aumento no ganho corporal em relação às CTL, indicando que a dieta foi eficiente em mimetizar condições obesogênicas. Após 35 dias do início de tratamento, a introdução de HFD não promoveu aumento do peso corporal das fêmeas tratadas com veículo (CH30; PC: 40 ± 7 g) em relação ao grupo CTL. A administração de ACO associado ao consumo de HFD a curto (AH30; PC: 38 ± 6 g) e a longo prazo (AH65; PC: 37 ± 6 g) não modificou esse parâmetro quando comparado ao grupo que recebeu ACO isoladamente. O peso corporal médio dos grupos está mostrado na Figura 7A.

Na Figura 7B, compara-se o depósito de gordura mesentérica entre os grupos experimentais. Não foram observadas modificações no depósito de gordura mesentérica entre as fêmeas do grupo ACO (12 ± 6 mg/g de PC) e CTL (10 ± 4 mg/g de PC). Os grupos CH65 (35 ± 10 mg/g de PC) e CH30 (23 ± 8 mg/g de PC) apresentaram aumento da gordura mesentérica em relação ao CTL. Esse parâmetro não se alterou nas fêmeas AH65 (17 ± 8 mg/g de PC) e AH30 (19 ± 9 mg/g de PC) quando comparadas às ACO.

Em contrapartida, O grupo ACO apresentou aumento do peso do estômago (23 ± 4 mg/g PC), quando comparado ao CTL (15 ± 3 mg/g PC). Mas, os grupos que consumiram HFD tiveram peso do estômago similar aos seus respectivos controles (CH30 11 ± 2 , CH65 10 ± 2 , AH30 18 ± 5 e AH65 19 ± 4 mg/g PC). O peso relativo do estômago está mostrado na Figura 7C.

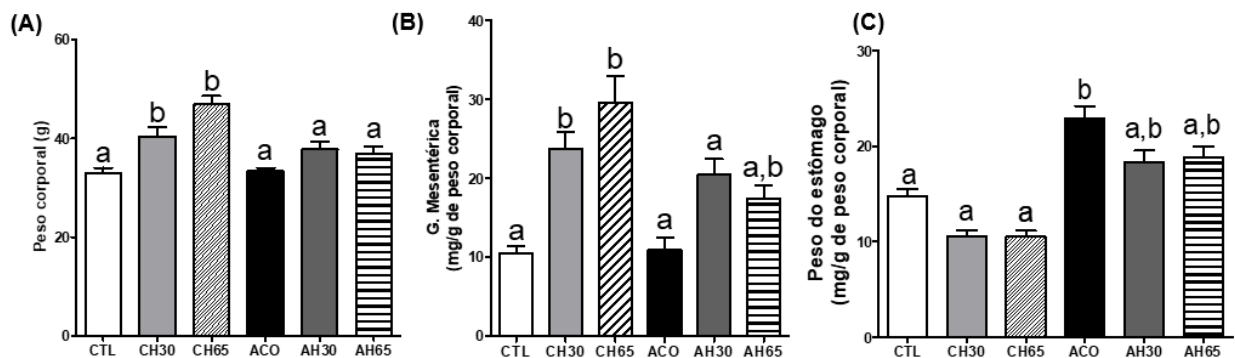


Figura 7. Peso corporal, peso da gordura mesentérica e peso do estômago de fêmeas tratadas com ACO e HFD. Dados expresso como Média \pm EM; CTL (n = 10), CH30 (n = 10), CH65 (n = 8), ACO (n = 8), AH30 (n = 6) e AH65 (n = 11). Letras diferentes representam diferenças estatísticas (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn's, $p < 0,05$).

6.2 Análise histomorfométrica gástrica

6.2.1 Túnica Mucosa – Porção não secretora gástrica

Na porção não secretora gástrica, também conhecida como pré-estômago, a espessura da camada de queratina foi significativamente menor nas fêmeas que receberam ACO (37 ± 30 μ m), em relação às CTL (115 ± 108 μ m). A ingestão de HFD contribuiu para um perfil semelhante entre grupos CH65 (71 ± 37 μ m) e CH30 (112 ± 74 μ m). O tratamento concomitante de ACO e HFD causou hipotrofia da queratina no grupo AH30 (58 ± 42 μ m) em relação ao ACO, o que não foi observado no AH65 (Fig. 8A).

A administração de ACO ($61 \pm 41 \mu\text{m}$) promoveu atrofia do epitélio quando comparado ao grupo CTL ($116 \pm 106 \mu\text{m}$). A ingestão de HFD pelas fêmeas CH65 ($71 \pm 34 \mu\text{m}$) contribuiu para o mesmo efeito relatado anteriormente, no entanto, seu consumo a curto prazo (CH30) demonstrou o oposto ($125 \pm 100 \mu\text{m}$). Nos grupos tratados com ACO e HFD, apenas as fêmeas AH65 apresentaram hipertrofia do epitélio da mucosa ($107 \pm 69 \mu\text{m}$). Sugere-se que a administração de ACO minimizou os efeitos induzidos pela dieta a curto a prazo no grupo AH30 ($65 \pm 28 \mu\text{m}$) (Fig. 8B).

Fêmeas tratadas com ACO ($20 \pm 13 \mu\text{m}$) apresentaram redução significativa da camada muscular da mucosa em relação às CTL ($45 \pm 50 \mu\text{m}$). O consumo de HFD foi responsável pela hipotrofia da muscular da mucosa nos grupos CH65 ($27 \pm 10 \mu\text{m}$) e CH30 ($41 \pm 20 \mu\text{m}$) quando comparados ao seu respectivo controle. Por outro lado, os grupos AH65 ($44 \pm 41 \mu\text{m}$) e AH30 ($27 \pm 13 \mu\text{m}$), tiveram aumento desse parâmetro em relação ao ACO (Fig. 8C).

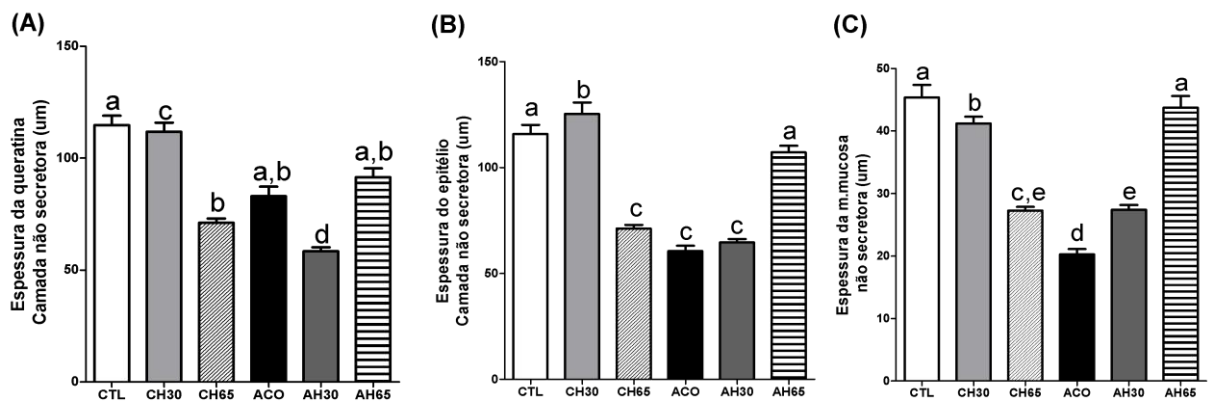


Figura 8. Histomorfometria da porção não secretora do estômago de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD. Dados expressos como média \pm EM da espessura da camada de queratina (A), espessura do epitélio (B) e da muscular da mucosa (C); CTL (n = 10); ACO (n = 8), CH30 (n = 10), AH30 (n = 6), CH65 (n = 8) e AH65 (n = 11). Letras diferentes representam diferenças estatísticas (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn's, $p < 0,05$).

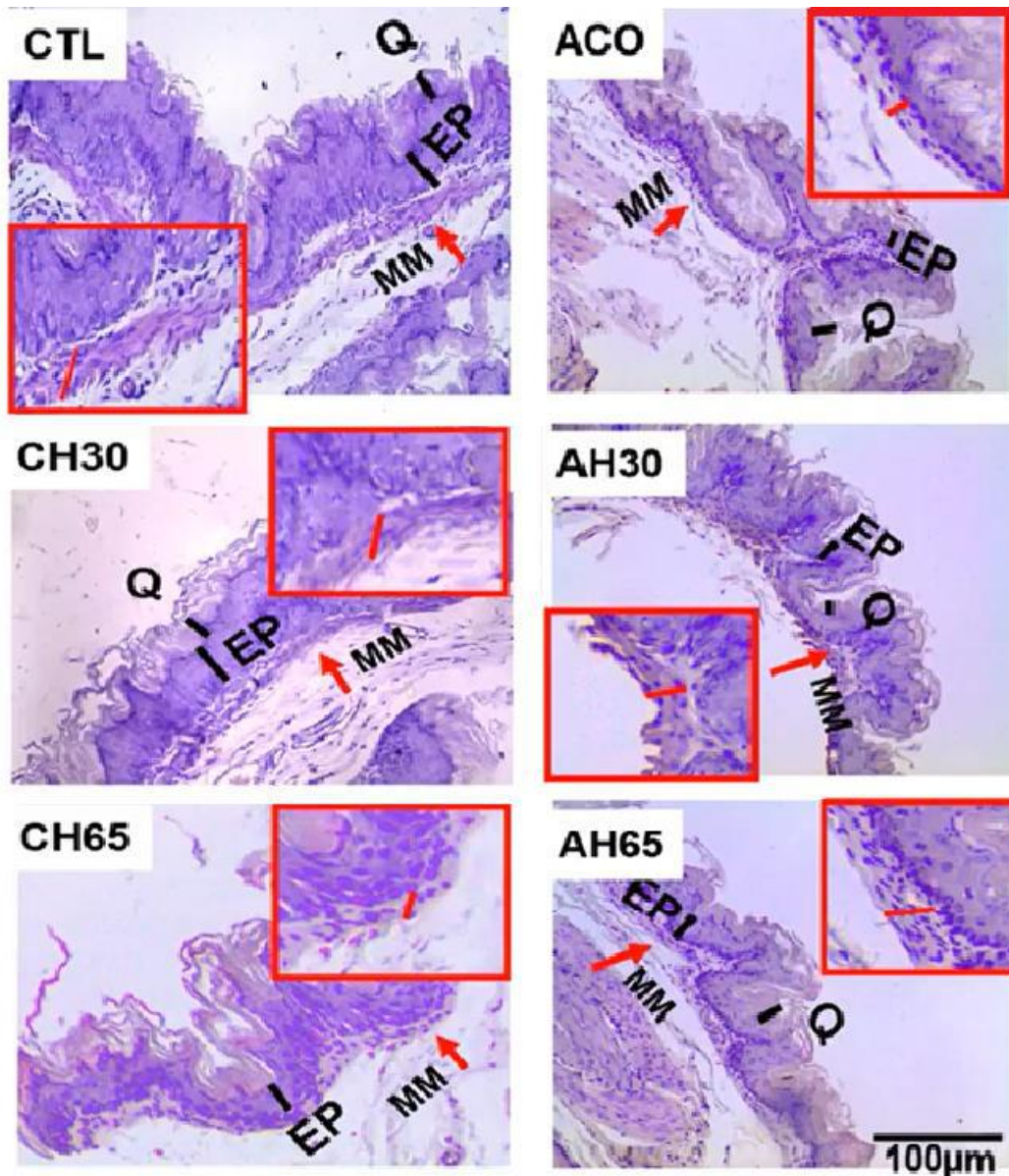


Figura 9. Fotomicrografias da túnica mucosa da porção não secretora gástrica de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD. Queratina (Q), epitélio (EP) e muscular da mucosa (MM). Coloração com HE. Setas vermelhas indicam a camada muscular da mucosa. Barras vermelhas indicam espessura da camada muscular da mucosa. Barra de escala = 100 µm.

6.2.2 Túnica Mucosa – Porção secretora gástrica

A análise histomorfométrica da porção secretora gástrica do grupo ACO não evidenciou modificações na espessura do epitélio secretor ($572 \pm 350 \mu\text{m}$), em relação ao CTL ($623 \pm 501 \mu\text{m}$). A ingestão de HFD aumentou o epitélio secretor nas fêmeas CH65 ($931 \pm 540 \mu\text{m}$) em relação às CTL. O mesmo não foi observado no grupo CH30 ($623 \pm 540 \mu\text{m}$). O ACO associado à HFD promoveu hipertrofia do

epitélio no grupo AH65 ($662 \pm 323 \mu\text{m}$), tendo o efeito oposto sobre o grupo AH30 ($386 \pm 183 \mu\text{m}$) (Fig. 10A).

Não houve diferenças entre a espessura da muscular da mucosa entre o grupo ACO ($35 \pm 21 \mu\text{m}$) e CTL ($33 \pm 26 \mu\text{m}$). A ingestão de HFD aumentou a espessura da muscular da mucosa dos grupos CH30 ($43 \pm 22 \mu\text{m}$) e CH65 ($48 \pm 24 \mu\text{m}$), quando comparados ao seu respectivo controle. A administração concomitante de ACO e HFD preveniu possíveis alterações na camada muscular da mucosa induzidas pela obesidade, nos grupos AH65 ($31 \pm 14 \mu\text{m}$) e AH30 ($31 \pm 14 \mu\text{m}$). A Figura 9 mostra a histomorfometria da porção não secretora do estômago (Fig.10B).

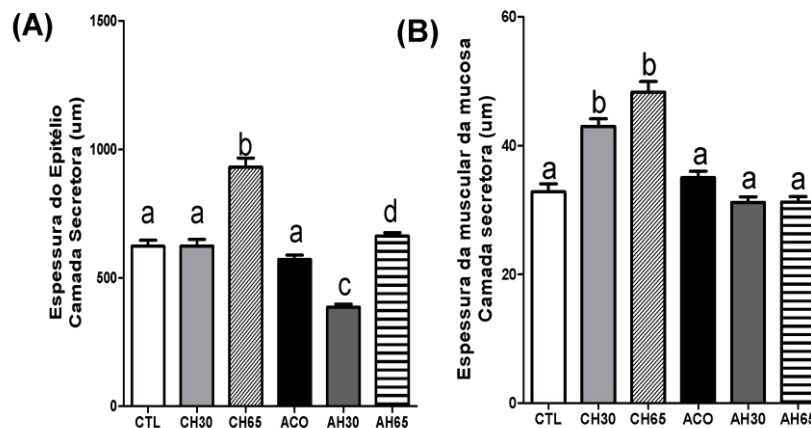


Figura 10. Histomorfometria da porção secretora do estômago de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD. Dados expressos como média \pm EM da espessura do epitélio (A) e da muscular da mucosa (B); CTL (n = 10), ACO (n = 8), ACO (n = 8), CH30 (n = 10), AH30 (n = 6), CH65 (n = 8) e AH65 (n = 11). Letras diferentes representam diferenças estatísticas (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn's, $p < 0,05$).

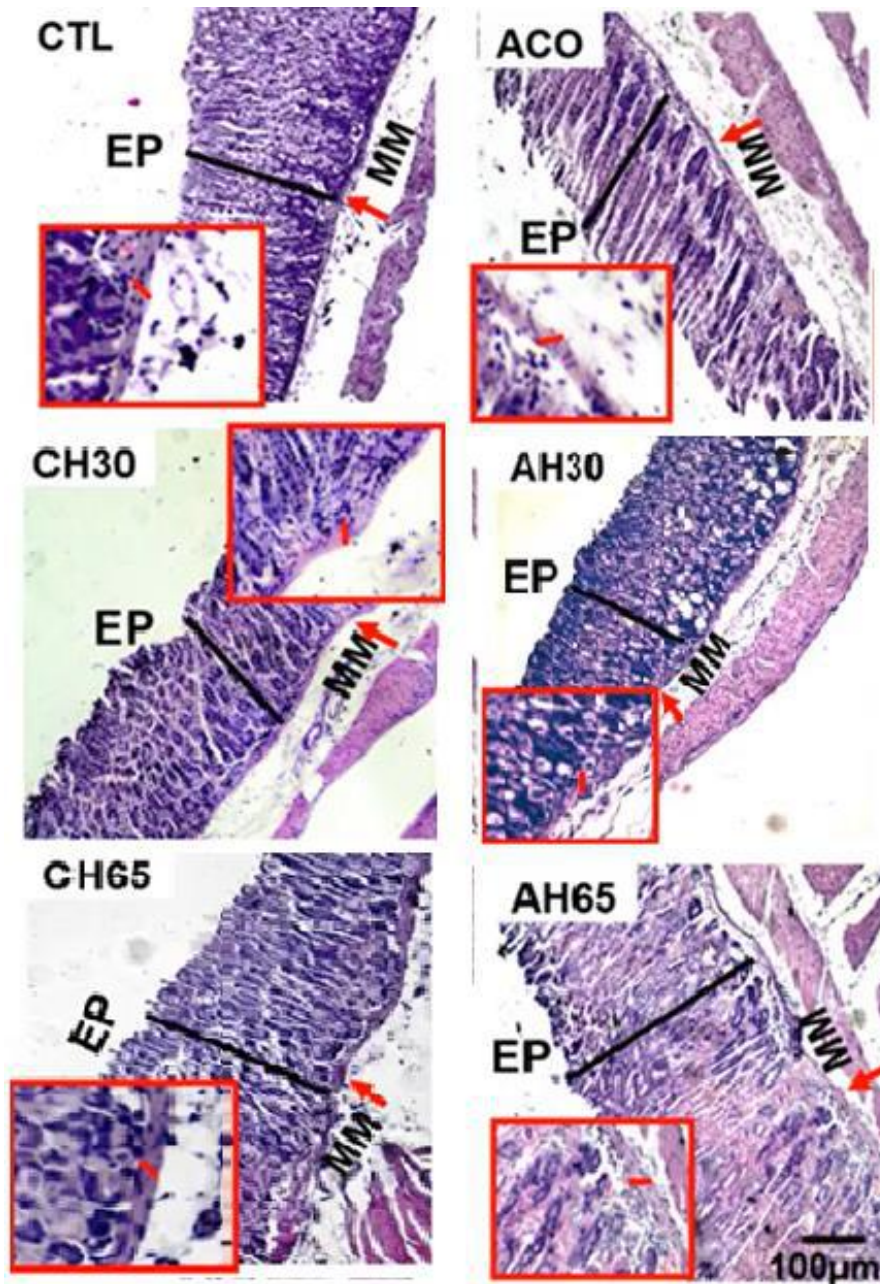


Figura 11. Fotomicrografias da túnica mucosa da porção secretora gástrica de camundongos fêmeas tratadas com ACO e HFD. Epitélio (EP) e muscular da mucosa (MM). Coloração com HE. Barra de escala = 100 μ m.

7 DISCUSSÃO

Os anticoncepcionais combinados orais são amplamente utilizados pelo público feminino em idade reprodutiva devido a sua eficácia, fácil administração e reversibilidade e, apesar dos benefícios contraceptivos e não-contraceptivos, o ganho de peso é a principal queixa para a descontinuação do uso do medicamento (STEWART e BLACK, 2015).

Dois estudos multicêntricos randomizados, duplo-cegos, controlados por placebo foram conduzidos para avaliar a eficácia do anticoncepcional trifásico, contendo etinilestradiol e norgestimato, para o tratamento de *acne vulgaris*. Ao analisar o perfil de efeitos adversos, os relatos de cefaleia e ganho de peso não foram diferentes entre as usuárias de ACO e placebo, apesar de ter ocorrido maior abandono do tratamento prematuramente em mulheres do grupo placebo, devido a esses efeitos indesejados (REDMOND *et al.*, 1999). Contribuindo com esses achados, Coney *et al.* (2001) observaram que baixas doses do ACO contendo 20 µg de etinilestradiol e 100 µg de levonorgestrel é bem tolerado e não provoca aumento do peso corporal, e foram observadas alterações comparáveis no peso nas mulheres do grupo ACO e placebo, desde a linha de base e ao longo dos seis ciclos de tratamento, no mesmo desenho experimental.

Em modelo animal, Edelman *et al.* (2011) observaram que a administração de ACO contendo etinilestradiol e levonorgestrel em macacos rhesus fêmeas adultas diminuiu os parâmetros de peso e percentual de gordura corporal nos grupos com IMC normal e obeso, sendo mais expressivo nas fêmeas obesas, resultante do aumento do metabolismo basal, sem influenciar na ingestão alimentar, níveis de atividade física e percentual de massa magra.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que a administração de ACO composto por EE e DRSP por 65 dias de experimento, preveniu o aumento do peso corporal e do estoque de gordura mesentérica nos camundongos fêmeas alimentadas com HFD por 65 e 30 dias. Por outro lado, aumentou o peso do estômago nas fêmeas do grupo ACO.

O estradiol possui efeito anorexígenos, por ações no sistema nervoso central, suprimindo o apetite, conseqüentemente, reduzindo a ingestão alimentar (ROEPKE, 2009). Em roedores, também atua modulando a homeostase energética a nível de hipotálamo, devido a sua interação com os receptores de estrogênio alfa (ER α), ou por alterações na excitabilidade neuronal nos núcleos hipotalâmicos e na expressão de genes de sinalização de outros hormônios moduladores, acarretando o aumento na taxa metabólica basal, diminuição da adiposidade e peso corporal (ROEPKE, 2009; XU e LÓPEZ, 2018). As ações periféricas do estradiol envolvem a regulação da termogênese do tecido adiposo marrom, da diferenciação e distribuição de tecido adiposo (LÓPEZ e TENA-SEMPERE, 2015).

O EE, sendo um estrogênio exógeno, mimetiza as ações do estradiol pelo mesmo mecanismo, a partir da interação com os receptores ER α e receptores de estrogênio beta (ER β) nos tecidos, e por se tratar de um derivado do estrogênio endógeno, possui alterações estruturais que o torna 100 vezes mais ativo (DICKSON e EISENFELD, 1981; STANCZYK et al., 2013). Em contrapartida, por meio da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o EE pode induzir a retenção hídrica, ganho de peso e aumento da pressão arterial (KRATTENMACHER, 2000).

O aumento no ganho de peso, atribuído ao uso de anticoncepcionais, especificamente os ACO, pode estar relacionado ao aumento da retenção hídrica, somado a ativação da via mineralocorticoide e seu efeito sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a um possível aumento do apetite e da ingestão alimentar (EDELMAN et al., 2011).

Diferente das progestinas clássicas, a DRSP possui uma potente atividade antimineralocorticoide, e regula a excreção de sódio e água, por meio do antagonismo aos receptores mineralocorticoides (RM), e a sua propriedade antiandrogênica neutraliza a ação do estrogênio sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona, reduzindo a retenção hídrica, em um efeito compensatório (KRATTENMACHER, 2000).

Estudos demonstraram que a via mineralocorticoide está excessivamente ativa na obesidade, causando disfunções metabólicas, aumento na diferenciação e proliferação adiposa, com consequente hipertrofia de adipócitos (INFANTE et al., 2019). O bloqueio farmacológico de RM é capaz de inativar vias críticas da diferenciação de adipócitos, exibindo um efeito anti-adipogênico, inibindo a expansão clonal e a plasticidade funcional do adipócito, afetando o controle transcricional da conversão adiposa, prevenindo o ganho de peso. Em cultura de adipócitos, o antagonismo promovido pela DRSP aumentou a conversão de tecido adiposo branco em marrom nos depósitos de gordura subcutânea e visceral, diminuindo a autofagia nesse tecido, aumentando sua atividade metabólica (ARMANI et al., 2014; CAPRIO et al., 2011; MAMMI et al., 2016).

A partir de um estudo multicêntrico aberto, Parsey e Pong (2000) analisaram mudanças no peso corporal de 333 mulheres, no final de seus ciclos menstruais,

que ingeriram diariamente o ACO contendo DRSP 3 mg/EE 30 µg por 21 dias, e placebo até completar 28 dias do ciclo, por 13 ciclos. Houve uma perda de peso significativa no sexto ciclo e uma tendência à perda de peso no primeiro, terceiro e nono ciclo, assim como menor retenção hídrica para todos os grupos citados. No entanto, no décimo terceiro ciclo, foi observado aumento no ganho de peso. Reforçando esses achados, um estudo realizado com 80 mulheres, tratadas com EE e DRSP ou EE e Levonorgestrel, avaliou o ganho de peso no ciclo pré-tratamento, seis ciclos de tratamento e no ciclo pós-tratamento. Os grupos tratados com DRSP e EE apresentaram perda de peso corporal médio do pré-tratamento até o sexto ciclo, enquanto o grupo com levonorgestrel teve aumento de peso (OELKERS et al., 1995). Portanto, sugere-se que as ações obesogênicas da dieta hiperlipídica sobre o peso corporal e estoque de gordura mesentérica, nos camundongos fêmeas que consumiram por 30 e 65 dias em nosso experimento, foram inibidas pela administração diária do ACO contendo EE e DRSP.

Quanto ao maior peso do estômago observado nas fêmeas do grupo ACO, não há estudos na literatura que descrevam a influência dos hormônios ovarianos sobre o peso de órgãos dos sistemas biológicos. No entanto, pode-se considerar um processo de hipertrofia da camada muscular do estômago, induzida pela administração de ACO.

A partir da avaliação histomorfométrica, evidenciamos alterações na porção secretora e não secretora da mucosa gástrica nas fêmeas alimentadas com HFD e tratadas com ACO. A ingestão de HFD diminuiu significativamente a camada de queratina que reveste a mucosa. A administração isolada de ACO não promoveu alterações sobre esta estrutura, no entanto, não foi capaz de impedir o efeito da dieta no grupo AH30, que também apresentou hipotrofia.

Desordens dermatológicas, em especial, envolvendo processos de queratinização, como a hiperqueratose plantar, queratose pilar, queratose folicular escamosa e paraqueratose granular, são comumente observadas em indivíduos obesos. Sabendo que os níveis de leptina estão substancialmente elevados na obesidade, em resposta ao aumento da adiposidade, e que foram identificados receptores desse hormônio em fibroblastos e queratinócitos, somado a estudos que demonstraram uma regulação positiva da leptina na cicatrização de feridas, foi

evidenciada a sua influência sobre a fisiologia da pele (YOSIPOVITCH; DEVORE; DAWN, 2007).

Existem diversos tipos de queratina, que exercem função protetiva contra lesões epiteliais, e atuam como reguladores da inflamação e imunidade nos epitélios as quais revestem. Portanto, modificações na expressão e montagem de queratina são indícios de processos patológicos (SEQUEIRA *et al.*, 2018).

A isoforma Krt76 é a queratina responsável pelo revestimento das camadas não proliferativas de diferenciação nos epitélios estratificados humanos e de camundongos, especificamente, o epitélio oral e a região escamosa do estômago (porção não secretora) (COLLIN *et al.*, 1992). A hipotrofia da camada de queratina observada nas fêmeas que receberam o ACO e ingeriram HFD, pode ter relação com uma diminuição da expressão de Krt76 no epitélio não secretor. No entanto, a avaliação da espessura da queratina não é suficiente para afirmar o efeito de hormônios sexuais e da obesidade sobre o processo de queratinização, podendo utilizar o método de imuno-histoquímica para a avaliação da expressão da Krt76.

Sequeira *et al.* (2018) demonstraram que camundongos que não expressam Krt76 são mais suscetíveis à carcinogênese nos locais onde essa proteína é expressa, não devido a uma formação defeituosa na barreira epitelial, mas pela regulação positiva na expressão de citocinas pró-tumorais, como interleucina-6 e interleucina-10. Se a administração de ACO e HFD diminuiu a espessura da camada de queratina por menor expressão ou supressão de Krt76, as citocinas estariam desreguladas, em especial as pró-tumorais, consequentemente, os camundongos tratados estariam mais suscetíveis ao desenvolvimento de câncer gástrico.

Gejima *et al.* (2007) reportaram pela primeira vez a presença de ER α na porção não secretora gástrica, sugerindo que o estrogênio desempenha um papel sobre a proliferação e diferenciação do epitélio escamoso queratinizado. A partir desse achado, pode-se considerar que o componente estrogênico do ACO ao se ligar a ER α é capaz de promover alterações estruturais, e nossos resultados demonstraram que a administração de ACO induziu atrofia do epitélio, enquanto sua associação com HFD por 65 dias promoveu hipertrofia dessa estrutura, o que não foi observado

nas fêmeas AH30, que apresentaram um perfil semelhante às ACO, podendo ser um efeito protetor limitado ao tempo de exposição dos animais à dieta.

Diferente do epitélio queratinizado, a administração de ACO isoladamente não induziu alterações na histomorfometria do epitélio secretor, mas quando associado ao consumo de HFD por 30 e 65 dias, observou-se uma retração e um aumento na espessura do epitélio, respectivamente. Sugere-se que o aumento do epitélio secretor nas fêmeas AH65, assim como nas CH65, esteja relacionado à ingestão de HFD e, apesar dos hormônios ovarianos desempenharem atividades gastroprotetoras, o ACO não foi eficiente em antagonizar o efeito da dieta sobre esse parâmetro.

Um estudo demonstrou que camundongos alimentados com HFD exibiram um aumento nas células-tronco e de genes pluripotentes, hiperplasia devido a expressão e sinalização exacerbada de leptina, e atrofia das glândulas gástricas, em um processo inflamatório mediado pela dieta, predispondo a gastrite atrófica. Morfologicamente, houve aparecimento de estruturas similares a criptas intestinais, com perda de células parietais evidenciado pela redução de marcador H+K+ATPase e a expressão Muc2, uma mucina intestinal, indicando a transição de um epitélio para outro, em um evento denominado de metaplasia intestinal, similar à humana. Essa característica é comumente associada a maioria dos carcinomas gástricos humanos (INAGAKI-OHARA *et al.*, 2016).

No modelo experimental de Hirata *et al.* (2017), a HFD causou lesões mitocondriais que acarretaram a perda de células parietais, responsáveis pela secreção de fator intrínseco e ácido clorídrico, dando início à metaplasia. Nesse contexto, o excesso de peso corporal pode ser um cofator para o desenvolvimento de câncer gástrico e para o aumento dos níveis de leptina circulante, tendo em vista que sua secreção é proporcional aos estoques de gordura. Esse hormônio regula positivamente a proliferação e migração celular e inibe a apoptose, contribuindo com a progressão tumoral (FRIED *et al.*, 2000; INAGAKI-OHARA *et al.*, 2016).

Fisiologicamente, a integridade da mucosa é garantida pela presença de células epiteliais que produzem bicarbonato, muco, fosfolipídios, prostaglandinas e proteínas de choque térmico, além de possuir um mecanismo de renovação celular

contínuo a partir de células progenitoras proliferativas (LAINE *et al.*, 2008). Nesse contexto, estudos apontaram que os hormônios ovarianos também contribuem para a estabilidade da mucosa gástrica, desempenhando um papel gastroprotetor. A presença de receptores ER α e ER β nas células parietais sugerem que o estrogênio pode atuar como um modulador da secreção gástrica, tendo apresentado resultados positivos na prevenção de úlcera péptica e, embora o mecanismo não esteja bem elucidado, acredita-se que esse hormônio aumente a produção e estabilidade do muco (AGUWA, 1984).

Ambos os hormônios, estrogênio e progesterona, são capazes de atuar sobre a motilidade e esvaziamento gástrico, que ocorre a partir da tensão das fibras musculares em resposta a sinais humorais, como colecistocinina e secretina, bem como à demanda energética (GARTNER, 2002). Em ensaios *in vivo*, foi demonstrado que a progesterona afeta rapidamente a atividade contrátil da musculatura lisa gástrica, por meio da inibição da via Rho quinase II, e diminui o esvaziamento gástrico (AL-SHBOUL *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2002; F. WANG, 2003).

O estrogênio, por sua vez, retarda o esvaziamento gástrico e induz um maior relaxamento das células lisas, provavelmente pelo aumento de óxido nítrico e GMPc (AL-SHBOUL *et al.*, 2018; COŞKUN *et al.*, 1995). Adicionalmente, Matsubara *et al.* (2004) identificou o estrogênio como um modulador negativo da expressão de grelina no estômago de ratas que apresentaram aumento nos níveis desse hormônio após ovariectomia, o que contribui para uma diminuição da secreção de ácido gástrico e da motilidade (MASUDA *et al.*, 2000).

A estrutura responsável pela motilidade gástrica é o músculo liso, portanto, modificações estruturais irão afetar diretamente a fisiologia digestiva. E ao avaliar os impactos da associação de ACO e HFD na camada muscular da mucosa, evidenciamos que a administração de ACO atrofiou a muscular da mucosa, e sua associação com HFD induziu aumento desse parâmetro. O consumo de HFD nas fêmeas controle não hipertrofiou a camada muscular da porção não secretora, portanto, a sua combinação com EE e DRSP foi potencialmente danosa à estrutura que auxilia na motilidade gástrica, o que pode impactar no esvaziamento do pré-estômago.

Na porção secretora, o tratamento com ACO não induziu modificações na camada muscular da mucosa e, quando associado à HFD, foi capaz de inibir o efeito da dieta que, isoladamente, promove aumento de sua espessura. Vale destacar que ratos obesos alimentados com HFD possuem um esvaziamento gástrico lento em relação aos eutróficos (LI *et al.*, 2011), então supõe-se que ao impedir a ação da dieta sobre a muscular da mucosa, o ACO melhora a motilidade gástrica.

A administração contínua de ACO composto por EE e DRSP em camundongos fêmeas em idade reprodutiva impediu o ganho de peso e o aumento no estoque de gordura mesentérica induzidos pelo consumo de HFD. Por sua vez, seu uso isolado aumentou o peso do estômago. Fêmeas tratadas com ACO e HFD por 65 dias apresentaram hipertrofia do epitélio da porção secretora e não secretora gástrica. O consumo a curto e a longo prazo de HFD, somado à ingestão de ACO, contribuiu para a hipertrofia da camada muscular da mucosa na porção secretora e não secretora gástrica. O tratamento com EE e DRSP atrofiou o epitélio e a camada muscular na túnica mucosa da porção não secretora gástrica nas fêmeas do grupo ACO.

A associação de ACO com HFD por 30 dias diminuiu a espessura da queratina na porção não secretora, o que alerta para a significativa perda de proteção contra lesões mecânicas nesta região, apesar do aumento da camada muscular. Observou-se um perfil semelhante nas fêmeas que ingeriram ACO e HFD por 65 dias. Portanto, o uso de ACO em condições obesogênicas promove alterações morfológicas na mucosa gástrica.

8 CONCLUSÃO

A administração de anticoncepcional combinado oral, composto por etinilestradiol e drospirenona, impediu o ganho de peso induzido pelo consumo de dieta hiperlipídica, provocou aumento do peso do estômago nas fêmeas que receberam apenas o contraceptivo e alterações histomorfométricas que podem comprometer a atividade fisiológica gástrica.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUWA, C. Effects of exogenous administration of female sex hormones on gastric secretion and ulcer formation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, 104(1–2), 79–84, 1984. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90371-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90371-6)
- AL-SHBOUL, O.; MUSTAFA, A.; AL-HASHIMI, F. Non-genomic effects of progesterone on Rho kinase II in rat gastric smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, 49(0), 55–62, 2013. <https://doi.org/10.1540/jsmr.49.55>
- AL-SHBOUL, O et al. Effect of progesterone on nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling and contraction in gastric smooth muscle cells. **Biomedical Reports**, 2018a. <https://doi.org/10.3892/br.2018.1161>
- AL-SHBOUL, O et al. Estrogen relaxes gastric muscle cells via a nitric oxide- and cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanism: A sex-associated differential effect. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2018b. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6406>
- Armani, A et al. Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. **The FASEB Journal**, 28(8), 3745–3757, 2014. <https://doi.org/10.1096/fj.13-245415>
- BERENSON, B.; RAHMAN, M. Changes in weight, total fat, percent body fat, and central-to-peripheral fat ratio associated with injectable and oral contraceptive use. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 200(3), 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.12.052>
- BLACK, A et al. No. 329-Canadian Contraception Consensus Part 4 of 4 Chapter 9: Combined Hormonal Contraception. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, 39(4), 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2016.10.005>
- BOORMAN, G. A et al. (Ed.). Boorman's Pathology of the Rat: Reference and Atlas. **Academic Press**, 2017.
- BORNSTEIN, S. R et al. Endocrine and metabolic link to coronavirus infection. **Nature Reviews Endocrinology**, 16(6), 2020. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0353-9>
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília: Departamento de Análise de Situação de Saúde; 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf. Acesso em: 07/09/21.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : Rename 2020**. Brasília : Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_medicamentos_rename_2020.pdf. Acesso em: 19/10/2021.
- BRYNHILDSEN, J. Combined hormonal contraceptives: prescribing patterns, compliance, and benefits versus risks. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, 5(5), 2014. <https://doi.org/10.1177/2042098614548857>
- BURTON, B. T et al. Health implications of obesity: an NIH Consensus Development Conference. **International Journal of Obesity**, 9(3), 1985.

- CAPRIO, M et al. Antiadipogenic Effects of the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Drospirenone: Potential Implications for the Treatment of Metabolic Syndrome. **Endocrinology**, 152(1), 2011. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0674>
- CAREY, M. S.; ALLEN, R. H. Non-contraceptive uses and benefits of combined oral contraception. **The Obstetrician & Gynaecologist**, 14(4), 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1744-4667.2012.00126.x>
- CHAVES, J. de O. **Contraçetivos Orais Combinados e a Biologia da Insulina**. In A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2. Atena Editora, 2021. <https://doi.org/10.22533/at.ed.54721010412>
- CHEN, C et al. The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease (Review). **Oncology Letters**, 2019. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10983>
- COLLIN, C et al. Suprabasal marker proteins distinguishing keratinizing squamous epithelia: Cytokeratin 2 polypeptides of oral masticatory epithelium and epidermis are different. **Differentiation**, 51(2), 137–148, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1992.tb00690.x>
- CONEY, P et al. Weight change and adverse event incidence with a low-dose oral contraceptive: two randomized, placebo-controlled trials. **Contraception**, 63(6), 297–302, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(01\)00208-6](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(01)00208-6)
- COOPER, D. B.; MAHDY, H. **Oral Contraceptive Pills**. StatPearls [Internet], 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430882/>. Acesso: 20/01/2022.
- COŞKUN, J et al. Delayed gastric emptying in conscious male rats following chronic estrogen and progesterone treatment. **Research in Experimental Medicine**, 195(1), 49–54, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF02576773>
- DE ANDRADE, F.G.; FERRARI, O. **Atlas digital de histologia sistêmica**. Universidade Estadual de Londrina, 1ª ed., Londrina, 2020.
- DE BASTOS, M et al. Combined oral contraceptives: venous thrombosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2014. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010813.pub2>
- DE LEO, V et al. Hormonal contraceptives: pharmacology tailored to women's health. **Human Reproduction Update**, 22(5), 2016. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw016>
- DHONT, M. History of oral contraception. **The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**, 15(sup2), S12–S18, 2010. <https://doi.org/10.3109/13625187.2010.513071>
- DICKSON, R. B.; EISENFELD, A. J. 17 α -Ethinyl Estradiol is More Potent than Estradiol in Receptor Interactions with Isolated Hepatic Parenchymal Cells*. **Endocrinology**, 108(4), 1981. <https://doi.org/10.1210/endo-108-4-1511>
- DRAGOMAN, M. The combined oral contraceptive pill- recent developments, risks and benefits. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 28(6), 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.06.003>

- DU, D et al. Cellular and molecular mechanisms of 17 β -estradiol postconditioning protection against gastric mucosal injury induced by ischemia/reperfusion in rats. **Life Sciences**, 86(1–2), 30–38, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.11.001>
- EDELMAN, A et al. Combined oral contraceptives and body weight: do oral contraceptives cause weight gain? A primate model. **Human Reproduction**, 26(2), 330–336, 2011. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq335>
- ENDALIFER, M. L et al. The association between combined oral contraceptive use and overweight/obesity: a secondary data analysis of the 2016 Ethiopia Demographic and Health Survey. **BMJ Open**, 10(12), 2020. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-039229>
- ELLULU, M. S et al. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. **Archives of Medical Science**, 4, 851–863, 2017. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>
- FRANTZ, J.D et al. **Proliferative Lesions of the non-glandular and glandular stomach in rats**. In: Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP. Washington DC. 1-20. 1991.
- FRAUCHES, A et al. **O Sistema Nervoso Entérico**. In Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica (pp. 315–334). Editora Edgard Blücher, 2016. <https://doi.org/10.5151/9788580391893-13>
- FREITAS, G. C.; CARREGARO, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**. v. 43, n. 2, fev. 2013.
- FRIED, S. K et al. Regulation of Leptin Production in Humans. **The Journal of Nutrition**, 130(12), 3127S-3131S, 2000. <https://doi.org/10.1093/jn/130.12.3127S>
- GALLO, M. F et al. Combination contraceptives: effects on weight. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2014. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003987.pub5>
- GARTNER, K. The forestomach of rats and mice, an effective device supporting digestive metabolism in muridae (review). **Journal of Experimental Animal Science**, 42(1), 1–20, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0939-8600\(02\)80002-5](https://doi.org/10.1016/S0939-8600(02)80002-5)
- GEJIMA, K et al. **Expression of estrogen receptor- α protein in the rat digestive tract**. in vivo, v. 21, n. 3, p. 487-492, 2007.
- GHOSHAL, N. G.; BAL, H. S. Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. **Laboratory Animals**, 23(1), 21–29, 1989. <https://doi.org/10.1258/002367789780886911>
- HORVATH, S., SCHREIBER, C. A.; SONALKAR, S. (2000). **Contraception**. Endotext [Internet]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279148/>. Acesso: 20/02/2022.
- HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **PharmacoEconomics**, 33(7), 2015. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>
- IBRAHIM, H., TENGKU ISMAIL, T. A.; HASHIM, N. Comparison of body weight among hormonal and non-hormonal users in a Malaysian cohort. **Journal of Taibah**

University Medical Sciences, 14(1), 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2018.11.012>

IGNACIO, D. L et al. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 53(3), 310–317, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000300003>

INAGAKI-OHARA, K et al. Leptin receptor signaling is required for high-fat diet-induced atrophic gastritis in mice. **Nutrition & Metabolism**, 13(1), 7, 2016.
<https://doi.org/10.1186/s12986-016-0066-1>

INFANTE, M et al. **Adipocyte Mineralocorticoid Receptor** (pp. 189–209), 2019.
<https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.10.005>

INMAN, W. H. W et al. Thromboembolic Disease and the Steroidal Oral Contraceptives. A Report to the Committee on Safety of Drugs. **BMJ**, 2(5703), 1970.
<https://doi.org/10.1136/bmj.2.5703.203>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa nacional de saúde: 2019: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde : Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro, 2020.

IVERSEN, L. et al. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 216(6), 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.02.002>

JUNOD, S. W. Women's Trials: The Approval of the First Oral Contraceptive Pill in the United States and Great Britain. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, 57(2), 2002. <https://doi.org/10.1093/jhmas/57.2.117>

JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J. **Histologia básica, texto e atlas**. Rio de Janeiro. 12ª edição, 2013.

KATOH, M. Trefoil factors and human gastric cancer (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, 2003. <https://doi.org/10.3892/ijmm.12.1.3>

KATZENELLENBOGEN, B. S. Estrogen Receptors: Bioactivities and Interactions with Cell Signaling Pathways1. **Biology of Reproduction**, 54(2), 287–293, 1996.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod54.2.287>

KHALILI, H. Risk of Inflammatory Bowel Disease with Oral Contraceptives and Menopausal Hormone Therapy: Current Evidence and Future Directions. **Drug Safety**, 39(3), 2016. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0372-y>

KHALILI, H et al. Association Between Long-term Oral Contraceptive Use and Risk of Crohn's Disease Complications in a Nationwide Study. **Gastroenterology**, 150(7), 2016. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.041>

KRATTENMACHER, R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. **Contraception**, 62(1), 29–38, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(00\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(00)00133-5)

- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, 135(1), 41–60, 2008. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.030>
- LESKO, S. M et al. Evidence for an increased risk of Crohn's disease in oral contraceptive users. **Gastroenterology**, 89(5), 1985. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(85\)90207-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(85)90207-0)
- LI, J.; MA, W.; WANG, S. Slower gastric emptying in high-fat diet induced obese rats is associated with attenuated plasma ghrelin and elevated plasma leptin and cholecystokinin concentrations. **Regulatory Peptides**, 171(1–3), 53–57, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.07.004>
- LIDEGAARD, Ø. Smoking and use of oral contraceptives: Impact on thrombotic diseases. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 180(6), 1999. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(99\)70696-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(99)70696-4)
- LIU, C. Y et al. Effects of progesterone on gastric emptying and intestinal transit in male rats. **World Journal of Gastroenterology**, 8(2), 338, 2002. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i2.338>
- LÓPEZ, M.; TENA-SEMPERE, M. Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 26(8), 411–421, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.003>
- MADDOX, A et al. Gastric and Oesophageal Emptying in Obesity. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 24(5), 593–598, 1989. <https://doi.org/10.3109/00365528909093095>
- MAMMI, C et al. A novel combined glucocorticoid-mineralocorticoid receptor selective modulator markedly prevents weight gain and fat mass expansion in mice fed a high-fat diet. **International Journal of Obesity**, 40(6), 964–972, 2016. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.13>
- MATSUBARA, M et al. Estrogen modulates ghrelin expression in the female rat stomach. **Peptides**, 25(2), 289–297, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.12.020>
- MASUDA, Y et al. Ghrelin Stimulates Gastric Acid Secretion and Motility in Rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 276(3), 905–908, 2000. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3568>
- MIRON, I. Gastrointestinal Motility Disorders in Obesity. **Acta Endocrinologica (Bucharest)**, 15(4), 497–504, 2019. <https://doi.org/10.4183/aeb.2019.497>
- MODY, S. K.; HAN, M. Obesity and Contraception. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, 57(3), 2014. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000047>
- MOORMAN, P. G et al. Oral Contraceptives and Risk of Ovarian Cancer and Breast Cancer Among High-Risk Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Oncology**, 31(33), 2013. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.48.9021>
- MUSHREF, M.; Srinivasan, S. Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility. **Annals of Translational Medicine**, 1(2), 14, 2013. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2012.11.01>

- MUST, A. The Disease Burden Associated With Overweight and Obesity. **JAMA**, 282(16), 1999. <https://doi.org/10.1001/jama.282.16.1523>
- NAM, S. Y. Obesity-Related Digestive Diseases and Their Pathophysiology. **Gut and Liver**, 11(3), 323–334, 2017. <https://doi.org/10.5009/gnl15557>
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. National Heart, Lung and Blood Institute in cooperation with the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults: The Evidence Report. **NIH Publication**, n. 98-4083, 1998. Disponível em: http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/ob_gdlns.pdf. Acesso em: 07/09/21.
- OELKERS, W et al. Effects of a new oral contraceptive containing an antiminerlocorticoid progestogen, drospirenone, on the renin-aldosterone system, body weight, blood pressure, glucose tolerance, and lipid metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 80(6), 1816–1821, 1995. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.6.7775629>
- OLIVEIRA, C. A. R. de et al. Combined oral contraceptive in female mice causes hyperinsulinemia due to β -cell hypersecretion and reduction in insulin clearance. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 190, p. 54-63, jun. 2019.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Contraceptive Use by Method 2019: Data Booklet**. Disponível em: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/documents/2020/Jan/un_2019_contraceptiveusebymethod_databooklet.pdf. Acesso em: 20/11/2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Obesity and overweight**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 06/09/21.
- ORTIZ, V. E.; KWO, J. Obesity: physiologic changes and implications for preoperative management. **BMC Anesthesiology**, 15(1), 2015. <https://doi.org/10.1186/s12871-015-0079-8>
- PARSEY, K. S.; PONG, A. An open-label, multicenter study to evaluate Yasmin, a low-dose combination oral contraceptive containing drospirenone, a new progestogen. **Contraception**, 61(2), 105–111, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(00\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(00)00083-4)
- POLY, T. N et al. Obesity and Mortality Among Patients Diagnosed With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Medicine**, 8, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.620044>
- RAMCHARAN, S et al. (1980). The Walnut Creek Contraceptive Drug Study. A prospective study of the side effects of oral contraceptives. Volume III, an interim report: A comparison of disease occurrence leading to hospitalization or death in users and nonusers of oral contraceptives. **The Journal of Reproductive Medicine**, 25(6 Suppl), 1980.
- REDMOND, G et al. (1999). Use of placebo controls in an oral contraceptive trial: methodological issues and adverse event incidence. **Contraception**, 60(2), 81–85, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(99\)00069-4](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(99)00069-4)

- REGIDOR, P. A. The clinical relevance of progestogens in hormonal contraception: Present status and future developments. **Oncotarget**, 9(77), 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26015>
- RENEHAN, A. G et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **The Lancet**, 371(9612), 569–578, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60269-X)
- RHODES, J. M et al. (1984). Colonic Crohn's disease and use of oral contraception. **BMJ**, 288(6417), 1984. <https://doi.org/10.1136/bmj.288.6417.595>
- RISK of thromboembolic disease in women taking oral contraceptives. A preliminary communication to the Medical Research Council by a Subcommittee. **BMJ**, 2(5548), 355–359, 1967. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5548.355>
- ROEPKE, T. A. Oestrogen Modulates Hypothalamic Control of Energy Homeostasis Through Multiple Mechanisms. **Journal of Neuroendocrinology**, 21(2), 141–150, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01814.x>
- RUBERTE, J et al. **MORPHOLOGICAL MOUSE PHENOTYPING: Anatomy, Histology and Imaging**. AMSTERDAM: ELSEVIER, 2017.
- SCHINDLER, A. E. Non-Contraceptive Benefits of Oral Hormonal Contraceptives. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, 11(1), 2012. <https://doi.org/10.5812/ijem.4158>
- SEQUEIRA, I et al. Immunomodulatory role of Keratin 76 in oral and gastric cancer. **Nature Communications**, 9(1), 3437, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05872-4>
- SITRUK-WARE, R. New progestagens for contraceptive use. **Human Reproduction Update**, 12(2), 2006. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi046>
- STACHENFELD, N. S et al. Effects of oral contraceptives on body fluid regulation. **Journal of Applied Physiology**, 87(3), 1999. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.3.1016>
- STANCZYK, F. Z.; ARCHER, D. F.; BHAVNANI, B. R. (2013). Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. **Contraception**, 87(6), 2013. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2012.12.011>
- STEWART, M.; BLACK, K. Choosing a combined oral contraceptive pill. **Australian Prescriber**, 38(1), 2015. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2015.002>
- THE ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP. Noncontraceptive health benefits of combined oral contraception. **Human Reproduction Update**, 11(5), 2005. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi019>
- TOKUNAGA, A et al. Estrogen and Progesterone Receptors in Gastric Cancer. **Cancer**, 57(7), 1376–1379, 1986. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19860401\)57:7<1376::AID-CNCR2820570722>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19860401)57:7<1376::AID-CNCR2820570722>3.0.CO;2-Z)
- TRENOR, C. C et al. Hormonal Contraception and Thrombotic Risk: A Multidisciplinary Approach. **Pediatrics**, 127(2), 347–357, 2011. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2221>

- TSCHOP, M et al. Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity. **Diabetes**, 50(4), 707–709, 2011. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.4.707>
- TYLER, E. T. ORAL CONTRACEPTION AND VENOUS THROMBOSIS. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, 185(2), 131, 1963. <https://doi.org/10.1001/jama.1963.03060020091034>
- TYRER, L. Introduction of the pill and its impact. **Contraception**, 59(1), 1999. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(98\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(98)00131-0)
- VERDICH, C et al. Effect of obesity and major weight reduction on gastric emptying. **International Journal of Obesity**, 24(7), 899–905, 2000. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801250>
- VIGITEL BRASIL 2019: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019. Ministério da Saúde. Brasília, 2020. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco.pdf. Acesso em: 07/09/21.
- VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. V. E. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. *Femina*, v. 39, n. 3, mar. 2011.
- WANG, F. Action of progesterone on contractile activity of isolated gastric strips in rats. **World Journal of Gastroenterology**, 9(4), 775, 2003. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i4.775>
- WANG, Y.; BEYDOUN, M. A. The Obesity Epidemic in the United States Gender, Age, Socioeconomic, Racial/Ethnic, and Geographic Characteristics: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. **Epidemiologic Reviews**, 29(1), 2007. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxm007>
- WANNMACHER, L. Anticoncepcionais orais: o que há de novo. OPAS/OMS - Ministério da Saúde. Vol. 1, Nº 1. Brasília, 2003.
- WOLIN, K. Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G. A. Obesity and Cancer. **The Oncologist**, 15(6), 556–565, 2010. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0285>
- WOOD, A. J. J.; BAIRD, D. T.; GLASIER, A. F. (1993). Hormonal Contraception. **New England Journal of Medicine**, 328(21), 1993. <https://doi.org/10.1056/NEJM199305273282108>
- WRIGHT, R. A.; KRINSKY, S.; FLEEMAN, C et al. Gastric emptying and obesity. **Gastroenterology**, 1983;84:747-51
- WU, Y. K.; BERRY, D. C. Impact of weight stigma on physiological and psychological health outcomes for overweight and obese adults: A systematic review. **Journal of Advanced Nursing**, 74(5), 1030–1042, 2018. <https://doi.org/10.1111/jan.13511>
- XU, Y.; LÓPEZ, M. Central regulation of energy metabolism by estrogens. **Molecular Metabolism**, 15, 104–115, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.012>

YOSIPOVITCH, G.; DEVORE, A.; DAWN, A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. **J Am Acad Dermatol.**, 56(6), p. 901-16, 2007. doi: 10.1016/j.jaad.2006.12.004

ZHAO, X. H. Expression of estrogen receptor and estrogen receptor messenger RNA in gastric carcinoma tissues. **World Journal of Gastroenterology**, 9(4), 665, 2003. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i4.665>

10 ANEXO (documento do comitê de ética)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ



Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus UFRJ-Macaé (CEUA-Campus UFRJ-Macaé)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização dos efeitos da utilização ininterrupta de anticoncepcionais orais sobre a adiposidade, homeostase da glicose e morfofunção do pâncreas endócrino, de tecidos-alvo da insulina e trato reprodutivo em camundongos fêmeas submetidas à dieta hiperlipídica", registrada com o nº MAC039, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rosane Aparecida Ribeiro e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus UFRJ-Macaé, em reunião de 09/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/02/2017 a 09/02/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss/Camundongo
Nº de animais	80
Peso/Idade	35-60 g/ 30-150 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério de Experimentação de Roedores no NUPEM