

**EFEITOS DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR EM ARTÉRIAS DE RESISTENTES DE RATAS
HIPERTENSAS E OVARIECTOMIZADAS**

Fabício Bragança da Silva

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA, AGOSTO DE 2019.

FABRÍCIO BRAGANÇA DA SILVA

**EFEITOS DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR EM ARTÉRIAS DE RESISTENTES DE RATAS
HIPERTENSAS E OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Rodrigues de Abreu

**VITÓRIA
2019**

Silva, Fabrício Bragança da 1976

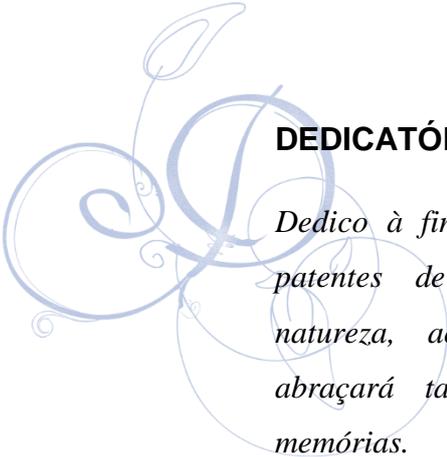
Efeitos do ácido elágico sobre a reatividade vascular em artérias de resistentes de ratas hipertensas e ovariectomizadas [Vitória] 2019

xviii, 96p., 29,7cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2019)

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Rodrigues de Abreu

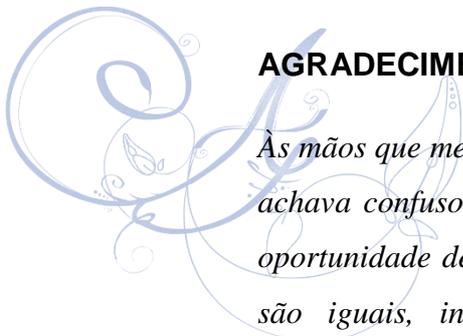
Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

1. Ovariectomia. 2. Hipertensão. 3. Ácido elágico. 4. Reatividade vascular 5. Artérias de resistência 6. Estresse Oxidativo.

A decorative graphic consisting of several overlapping, swirling blue lines that form a circular, vine-like pattern. The lines are thin and elegant, creating a sense of movement and grace. It is positioned behind the text, partially framing it.

DEDICATÓRIA

*Dedico à finitude das coisas, que nos põe
patentes de nossa pequenez perante a
natureza, ao obscuro esquecimento que
abraçará tanto esta obra como nossas
memórias.*



AGRADECIMENTOS

Às mãos que me guiaram – mesmo quando por vezes me achava confuso – escrevendo a história e dando-me a oportunidade de vivenciar que para Ele as trevas e luz são iguais, incapazes de ocultar-me à sua face. Obrigado Deus! – “Minhas fontes estão todas em ti” (Salmo 87.7).

Às minhas raízes e os ramos irmãos. Minha essência e o que sou vêm do que é nutrido por vós. Afeto tamanho que palavras apenas não são justa retribuição. Assim, essa conquista é de vocês e por você. Obrigado mãe, irmãos e sobrinhos!

À voz precisa e sempre presente. A orientação que me abraçou mais do que como um aluno, um amigo. Obrigado Prof.^a Dr.^a Gláucia Rodrigues de Abreu por todo suporte e direcionamento para que minha vida dentro destas paredes fosse possível.

Às centelhas instigantes do conhecimento, que nos momentos onde meu raciocínio se mostrava ainda imaturo, estavam lá, acendendo a luz de novos caminhos. Obrigado Walckira e Erick pela contribuição imprescindível nesta obra!

Às mentes sábias, tão generosas, que responderam prontamente ao meu convite, e como bússola direcionaram melhores rumos para as ideias aqui inscritas. Obrigado Prof.^a Dr.^a Alessandra Simão Padilha, Prof.^a Dr.^a Gírlândia Alexandre Brasil Amorim, Prof^o Dr^o Helder Mauad e Prof. Dr.^o José Geraldo Mill, por comporem minha banca examinadora!

À técnica, que mostrou ser mais que uma ferramenta necessária, uma mão amiga – verdadeiros amigos. Obrigado Wender (Dr. Rouver)! Obrigado Anderson (Dr. Anderson)! Mãos parceiras, mãos amigas.

À minha casa. Das alegrias, das desavenças, dos projetos, das divergências, do muito, do pouco... de uma única salinha apertada e pequena construímos nossa amizade, enquanto nosso laboratório assim também crescia. Obrigado, Simone, Mariana, Erick, Vinícius, Bruno, Cíntia, Renata e Katiane! Vocês foram o meu lar na UFES e serão sempre meus irmãos pra vida.

Aos tesouros mais valiosos que encontrei nesta pós-graduação. Se tudo mais tivesse sido frustrado, ainda assim, meu sentimento de realização não se abalaria. A vocês meus amigos, todos. Vocês são minha melhor conquista.

Muito obrigado!





*A mim foi dada a realidade como dádiva –
dura; fria; agridoce.*

*Agora, só me resta a velhice e a morte lenta de
todos os meus sonhos.”*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. As doenças cardiovasculares no sexo feminino	20
1.1.1. O papel do estrogênio na regulação do sistema cardiovascular	23
1.2. A Disfunção endotelial como um importante pilar no desenvolvimento das DCV .	28
1.2.1. O Óxido Nítrico	30
1.2.2. Hipertensão Arterial e Disfunção Endotelial.....	33
1.3. Estresse oxidativo	36
1.4. Terapias antioxidantes e DCV	39
1.4.1. O Ácido Elágico	41
2. Hipótese	45
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo Geral.....	46
3.2. ObjetivoS EspecíficoS	46
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1. Animais experimentais	47
4.2. Protocolos experimentais.....	47
4.2.1. Ovariectomia	48
4.2.2. Tratamento com ácido elágico.....	49
4.2.3. Terapia de reposição hormonal com estrogênio	49
4.2.4. Reatividade Vascular.....	49
4.2.5. Avaliações Hemodinâmicas	51
4.2.6. Estudo da Expressão Proteica.....	52
4.2.7. Detecção “in situ” da produção vascular de ânion superóxido e óxido nítrico .	54
4.2.8. Determinação do percentual de participação estimada do óxido nítrico no relaxamento vascular	56
4.3. Análise estatística	56

5. RESULTADOS	57
5.1. Dados ponderais e hemodinâmicos	57
5.2. Reatividade vascular.....	60
5.2.1. Reatividade vascular após bloqueio com L-NAME	61
5.2.2. Participação relativa do óxido nítrico no relaxamento dependente do endotélio	66
5.3. Análises de fluorescência “ <i>in situ</i> ”	67
5.3.1. Quantificação do Óxido Nítrico	67
5.3.2. Quantificação do Ânion Superóxido	68
5.4. Western blotting	69
5.4.1. Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial	69
5.4.2. Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial fosforilada no resíduo de Ser1177.....	70
5.4.3. Expressão da Superóxido dismutase.....	71
5.4.4. Expressão da Catalase	73
6. DISCUSSÃO	74
6.1. Influência do tratamento com ácido elágico sobre a pressão arterial	74
6.2. Influência do tratamento com ácido elágico sobre a resistência vascular	76
6.2.1. Influência do tratamento com ácido elágico sobre o óxido nítrico.....	78
6.3. Influência do tratamento com ácido elágico sobre o estresse oxidativo e o sistema antioxidante	80
7. CONCLUSÕES	84
8. REFERÊNCIAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Números de mortes pelas principais causas entre a população mundial, em todas as faixas etárias, no ano de 2018.	18
Figura 2. Relação entre os principais fatores e as mortes por doenças cardiovasculares no mundo em 2018.	19
Figura 3. Diferenças sexuais na mortalidade por doenças cardiovasculares entre 1997 e 2017.	21
Figura 4. Diferenças sexuais na prevalência da hipertensão arterial em indivíduos ≥ 20 anos:.....	23
Figura 5. Os receptores de estrogênio: localização e efeitos sobre o sistema cardiovascular.	25
Figura 6. Ação genômica e não genômica do estrogênio (E2).....	27
Figura 7. Base fisiopatológica das doenças cardiovasculares em mulheres relacionada à depleção hormonal.....	28
Figura 8. Endotélio como um dispositivo de entrada-saída.	29
Figura 9. Estrutura básica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e esquema de catálise de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$).	31
Figura 10. Via NOS-NO em leitos vasculares em condições de saúde e doença.....	32
Figura 11. Mecanismos de controle do tônus vascular em artérias de animais normotensos (A) e hipertensos (B), mostrando a diferença do balanço entre os fatores de relaxamento e constrição.....	35
Figura 12. Representação das respostas adaptativas do organismo mediante o balanço entre a produção e controle das espécies reativas (ER).....	37
Figura 13. Ação esquemática do sistema antioxidante enzimático sobre as espécies reativas de oxigênio.	38
Figura 14. Proporção de mortes relacionadas aos riscos dietéticos em razão do número total, ajustadas pela idade (A), e a especificação do número de morte por principais causas correspondentes aos riscos alimentares em nível global em 2017 (B). Adaptado de: Global Burden Disease, 2019.	40
Figura 15. Fórmula estrutural do ácido elágico. Em destaque estão os grupos fenólicos (fundo amarelo) e lactonas (fundo azul).....	42

Figura 16. Biotransformação do ácido elágico (A) e perfil de absorção e atividade antioxidante (B).....	43
Figura 17. Fluxograma dos protocolos experimentais	48
Figura 18. Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria mesentérica para a realização de estudos de reatividade vascular in vitro.	50
Figura 19. Análise da curva de relaxamento à acetilcolina entre os diferentes grupos.	60
Figura 20. Curva de relaxamento ante e depois da inibição com o inibidor N ω -nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) nos diferentes grupos.	62
Figura 21. Percentual estimado da contribuição do óxido nítrico no relaxamento vascular nos diferentes grupos, em relação a seu efeito sobre os dados de: A) área sob a curva (ASC) e B) resposta máxima (E _{máx.}).....	67
Figura 22. Determinação “in situ” do óxido nítrico em artérias mesentéricas de ratas SHR pelo método de fluorescência a 4,5-diaminofluoresceína (DAF).....	68
Figura 23. Determinação “in situ” da produção de ânion superóxido em artérias mesentéricas de ratas SHR ovariectomizadas, pelo método de fluorescência pela oxidação do dihidroetídeo (DHE).	69
Figura 24. Expressão da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) (n=5).	70
Figura 25. Expressão da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase fosforilada no resíduo de Ser1177 (p-eNOS) (n=5) em razão da expressão da enzima óxido nítrico sintase total (eNOS) (n=5).....	71
Figura 26. Expressão da isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (SOD2) (n=6).	72
Figura 27. Expressão da enzima catalase (n=6).	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças sexuais sobre o quantitativo de mortes e prevalência das doenças cardiovasculares.....	22
Tabela 2. Fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) em artérias de resistência.	30
Tabela 3. Dados ponderais do peso corporal e uterino e medidas da pressão arterial e frequência cardíaca dos diferentes grupos.	59
Tabela 4. Análise da área sob a curva (ASC), resposta máxima ($E_{máx.}$) e sensibilidade à acetilcolina (LogEC_{50} [ACh]) antes e depois do inibidor N ω -nitro-arginina-metil-ester (L-NAME).	65

LISTA DE ABREVIATURAS

DCV	Doenças cardiovasculares
IAM	Infarto agudo do miocárdio
DAC	Doença arterial coronariana
AVE	Acidente vascular encefálico
RE- α	Receptores de estrogênio alfa
RE- β	Receptores de estrogênio beta
GPER	Receptor de estrogênio acoplado a uma proteína G
CMLV	Células do músculo liso vascular
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
NO	Óxido nítrico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ACh	Acetilcolina
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
p-eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial fosforilada no resíduo de Ser1177
sGC	Gualinato ciclase solúvel
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
EDHF	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
SOD2	Superóxido dismutase mitocondrial
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
SHR	Ratos espontaneamente hipertensas
DAF	Diaminofluoresceína
DHE	Dihidroetídeo

SHAM	Ratas tratadas com veículo, usadas como controle
OVX	Ratas ovariectomizadas tratadas com veículo
OAE	Ratas ovariectomizadas e tratadas com ácido elágico
OE2	Ratas ovariectomizadas e tratadas com 17- β estradiol
OAE+E2	Ratas ovariectomizadas e tratadas com ácido elágico e 17- β estradiol
ASC	Área sob a curva
E _{máx}	Resposta máxima
L-NAME	N ω -nitro-L-Arginina Metil Éster
EPM	Erro padrão da média

RESUMO

O período da pós-menopausa é tido como um marco para surgimento de doenças crônicas não transmissíveis das quais se destacam as doenças cardiovasculares. Nesse contexto, a hipertensão arterial e a disfunção endotelial formam a base dos principais fatores de risco e agravos. A introdução de nutracêuticos como alternativas terapêuticas tem chamado a atenção de pesquisadores por apresentarem resultados promissores. Dentre eles se destaca o ácido elágico, um fitoquímico com potentes propriedades antioxidantes, encontrado em frutas, plantas e nozes. Portanto o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do tratamento com ácido elágico sobre a reatividade vascular de artérias de resistência em um modelo experimental de hipertensão e menopausa. Para tanto, 40 ratas SHR foram avaliadas durante 4 semanas e separadas em 5 grupos de acordo com o tratamento: SHAM, tratadas com veículo (carboximetilcelulose); OVX, castradas e tratadas com veículo; OAE, castradas e tratadas com ácido elágico (10 mg/Kg/dia); OE2, castradas e tratadas com estrogênio (1g/Kg/dia); OAE+E2, tratadas com ácido elágico e estrogênio. Anéis da artéria mesentérica foram mantidas *in vitro* e submetidos a testes de força de contração na ausência e presença do inibidor da enzima óxido nítrico sintase para registro do efeito dos tratamentos e a participação do óxido nítrico (NO). Amostras dos vasos foram colhidos para análises bioquímicas. A castração produziu uma elevação da pressão arterial (PAM: 190,4 ± 4,4 mmHg); efeito que não ocorreu nos grupos tratados com ácido elágico (PAM: 165,7 ± 1,4 mmHg, p<0,05), estrogênio (PAM: 166,9 ± 2,4 mmHg, p<0,05) ou conjugados (PAM: 163,5 ± 1,5 mmHg, p<0,05). Nestes grupos também evidenciou-se uma maior biodisponibilidade do NO (DAF: OAE= 2825 ± 169 UA / E2= 2763 ± 176 UA / OAE+E2= 2479 ± 134 UA, p<0,05) e uma menor concentração de ânion superóxido (DHE: OAE= 4554 ± 448 UA / E2= 5811 ± 491 UA / OAE+E2= 6351 ± 478 UA, p<0,05), em relação ao grupo OVX (DAF: 1591 ± 79 UA / DHE: 11124 ± 1235 UA). O tratamento exclusivo com ácido elágico também se mostrou capaz de aumentar a síntese das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (0,30 ± 0,02, p<0,05) e catalase (0,49 ± 0,07, p<0,05) em relação aos animais OVX (SOD: 0,19 ± 0,03 / catalase: 0,25 ± 0,03) e não diferenciando-se dos demais grupos. Os resultados nos levam a deduzir que, na ausência da reconhecida ação cardioprotetora do estrogênio, o ácido elágico supre seus efeitos de forma efetiva em leitos vasculares de resistência, configurando-se como uma proposta promissora no controle dos danos cardiovasculares da hipertensão e disfunção endotelial.

ABSTRACT

The postmenopausal period is considered a milestone for the emergence of chronic noncommunicable diseases, including cardiovascular diseases. In this context hypertension and endothelial dysfunction form the basis of the main risk factors and injuries. The introduction of nutraceuticals as therapeutic alternatives has attracted the attention of researchers for presenting promising results. These include ellagic acid, a phytochemical with potent antioxidant properties found in fruits, plants, and nuts. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effects of ellagic acid treatment on vascular reactivity of resistance arteries in an experimental model of hypertension and menopause. Therefore 40 SHR rats were evaluated for 4 weeks and separated into 5 groups according to treatment: vehicle-treated SHAM (carboxymethylcellulose); OVX, castrated and vehicle treated; OAE, castrated and treated with ellagic acid (10 mg / kg / day); OE2, castrated and treated with estrogen (1g / kg / day); OAE + E2, treated with ellagic acid and estrogen. Mesenteric artery rings were maintained in vitro and subjected to contraction strength tests in the absence and presence of the nitric oxide synthase enzyme inhibitor to record the effect of treatments and the participation of nitric oxide (NO). Vessel samples were taken for biochemical analysis. Castration produced an increase in blood pressure (MAP: 190.4 ± 4.4 mmHg); effect that did not occur in groups treated with ellagic acid (MAP: 165.7 ± 1.4 mmHg, $p < 0.05$), estrogen (MAP: 166.9 ± 2.4 mmHg, $p < 0.05$) or conjugates (MAP: 163.5 ± 1.5 mmHg, $p < 0.05$). These groups also showed higher NO bioavailability (DAF: OAE = 2825 ± 169 UA / E2 = 2763 ± 176 UA / OAE + E2 = 2479 ± 134 UA, $p < 0.05$) and a lower superoxide anion concentration. (DHE: OAE = 4554 ± 448 UA / E2 = 5811 ± 491 UA / OAE + E2 = 6351 ± 478 UA, $p < 0.05$) relative to the OVX group (DAF: 1591 ± 79 UA / DHE: 11124 ± 1235 UA). Exclusive ellagic acid treatment was also able to increase the synthesis of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (0.30 ± 0.02 , $p < 0.05$) and catalase (0.49 ± 0.07 , $p < 0.05$) compared to OVX animals (SOD: 0.19 ± 0.03 / catalase: 0.25 ± 0.03) and not different from the other groups. The results lead us to deduce that, in the absence of the recognized cardioprotective action of estrogen, ellagic acid effectively meets its effects on resistance vascular beds, constituting a promising proposal in the control of cardiovascular damage of hypertension and endothelial dysfunction.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) tem encabeçado as estatísticas de morbimortalidade do mundo moderno, destacando as mudanças dos paradigmas epidemiológicos de saúde para as doenças crônicas não transmissíveis¹ com números relevantes, principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento²⁻⁴. Dados da plataforma *OurWorldInData.org*, que reúne os registros das principais fontes científicas do mundo sobre tendências epidemiológicas de longo prazo, resumizam que em 2018 as DCV foram responsáveis por 17,65 milhões de mortes, projetando-se muito acima das demais causas entre a população mundial (FIGURA 1)⁵.

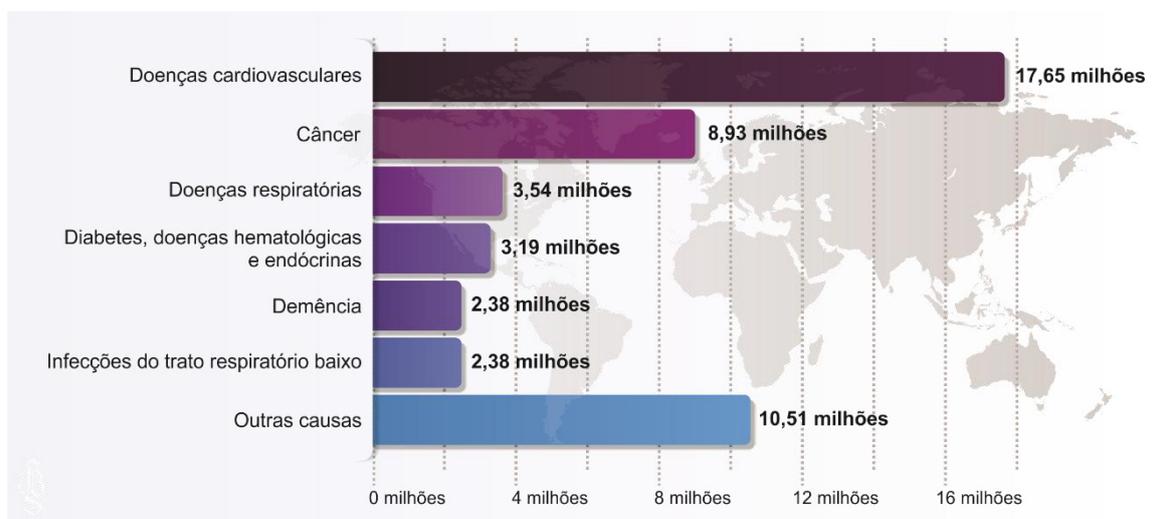


Figura 1. Números de mortes pelas principais causas entre a população mundial, em todas as faixas etárias, no ano de 2018. Dados compilados da *OurWorldInData.org*. Disponível em: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>.

Estima-se que a cada ano mais de sete milhões de pessoas no mundo sofrerão um infarto agudo do miocárdio (IAM), com uma taxa aproximada de mortalidade de 10%, e cerca de cinco milhões e meio poderão ser vítimas fatais de acidente vascular encefálico⁶⁻⁸. Em uma recente análise retrospectiva de 2.721 pacientes europeus, internados com diagnóstico primário de IAM, foi constatado que, após um ano, cerca de 18% morreram em decorrência de algum evento cardíaco (2,3% por um novo IAM), gerando um gasto per capita médio de €3.523,27 com tratamentos. E entre os re-infartados este custo médio foi de €19.570,70⁹.

Estes números deixam evidente que as DCV detêm o título de maior problema de saúde pública no mundo. Em grande parte, eles apoiam-se sobre a complexidade na prevenção e controle dos casos e seu importante potencial incapacitante, quando não letal ¹⁰⁻¹². Doenças como IAM e o acidente vascular encefálico são exemplos contundentes, por estarem associadas a múltiplos fatores de riscos (biológicos, socioeconômicos e psicossociais), e estes, por sua vez, moldados por particularidades étnicas e culturais ¹³⁻¹⁵. Dentre os fatores de risco, a hipertensão arterial é de longe a condição clínica que está mais associada à fisiopatologia das doenças do aparelho circulatório ¹⁶, além de ser a comorbidade presente na maioria das causas de morte (FIGURA 2) ⁵.

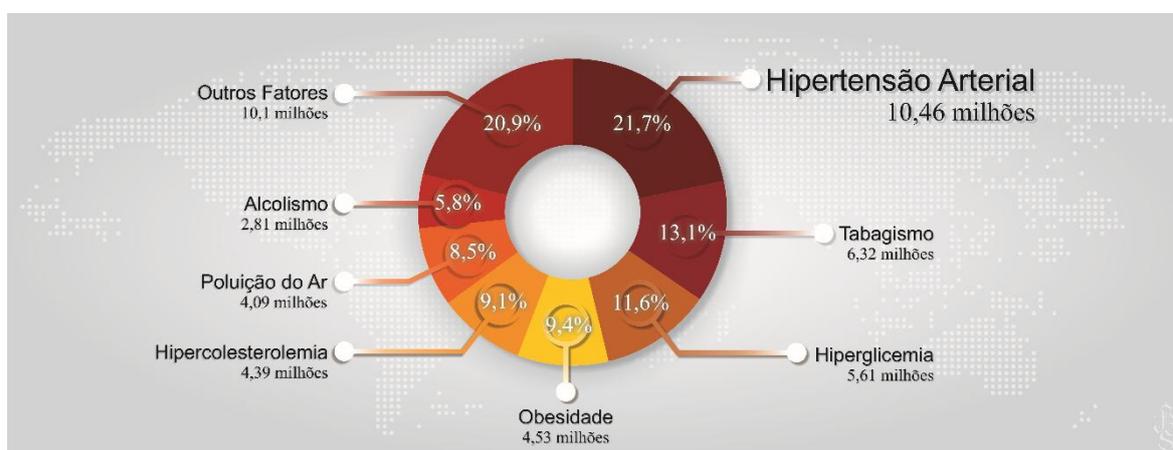


Figura 2. Relação entre os principais fatores e as mortes por doenças cardiovasculares no mundo em 2018. Dados compilados do *Institute for health metrics and evaluation* da *University of Washington*. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/#>.

Somados ao acidente vascular isquêmico e hemorrágico e do IAM, a insuficiência cardíaca, a doença renal crônica, a doença vascular periférica, a doença senil e os registros de morte prematura são agravos também reportados como desfechos possíveis da hipertensão ¹⁷. Dados clínicos sustentam que o aumento da incidência de tais prognósticos guarda estreita relação com a elevação dos níveis pressóricos. Em uma análise dos 30 anos de publicações do *Framingham Heart Study*, estimou-se que um aumento de 20 mmHg na pressão arterial sistólica, ou até mesmo uma pressão arterial diastólica com níveis inferiores a 70 mmHg, associado um pressão sistólica alta, foi compatíveis com o risco aumentado de desenvolvimento de doença arterial coronariana; e que a taxa de incidência desta doença em homens e mulheres hipertensos com idade entre 45 e 62 anos, cresce cerca de 32,5% e 15,8%, respectivamente ¹⁸. De igual forma, os pacientes classificados

como hipertensos pelo *Dallas Heart Study* apresentavam uma massa ventricular esquerda maior do que aqueles classificados como normotensos, com uma taxa de incidência acumulativa de eventos cardiovasculares igualmente maior, num período de dez anos ¹⁹.

1.1. AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES NO SEXO FEMININO

Para se entender melhor a dimensão do impacto das DCV, antes de tudo, faz-se necessário distinguir que homens e mulheres possuem comportamentos epidemiológicos e biológicos distintos no que se refere a fisiopatologia, diagnóstico, terapêutica e taxas de mortalidade.

Nas últimas duas décadas, os registros de mortes por DCV entre homens e mulheres traçaram taxas aparentemente divergentes até a primeira metade deste período, com uma queda relativamente acentuada dos números na população feminina (de 220,86 casos por 100.000 habitantes, em 1997, para cerca de 209,31, em 2007). Mas, logo em seguida, os registros anuais retomaram gradativamente seu crescimento, colocando as mulheres novamente em um patamar de ascensão, fechando o período de análise, no ano de 2017, com uma inscrição de 221,88 (por 100.000 habitantes) entre mulheres, *versus* 243,74 de casos entre os homens, no ano de 2017 ⁵ (FIGURA 3-A).

Embora o volume absoluto das mortes por DCV seja mais expressivo na população masculina, sua prevalência relativa sobre o número total de mortes revela um dado importante sobre a população feminina que não pode ser negligenciado. Entre os anos de 1997 e 2017, as mortes por DCV representam em média 27,7% dos registros entre os homens e 30,6% entre as mulheres, evidenciando a magnitude do problema nesta população (FIGURA 3-B).

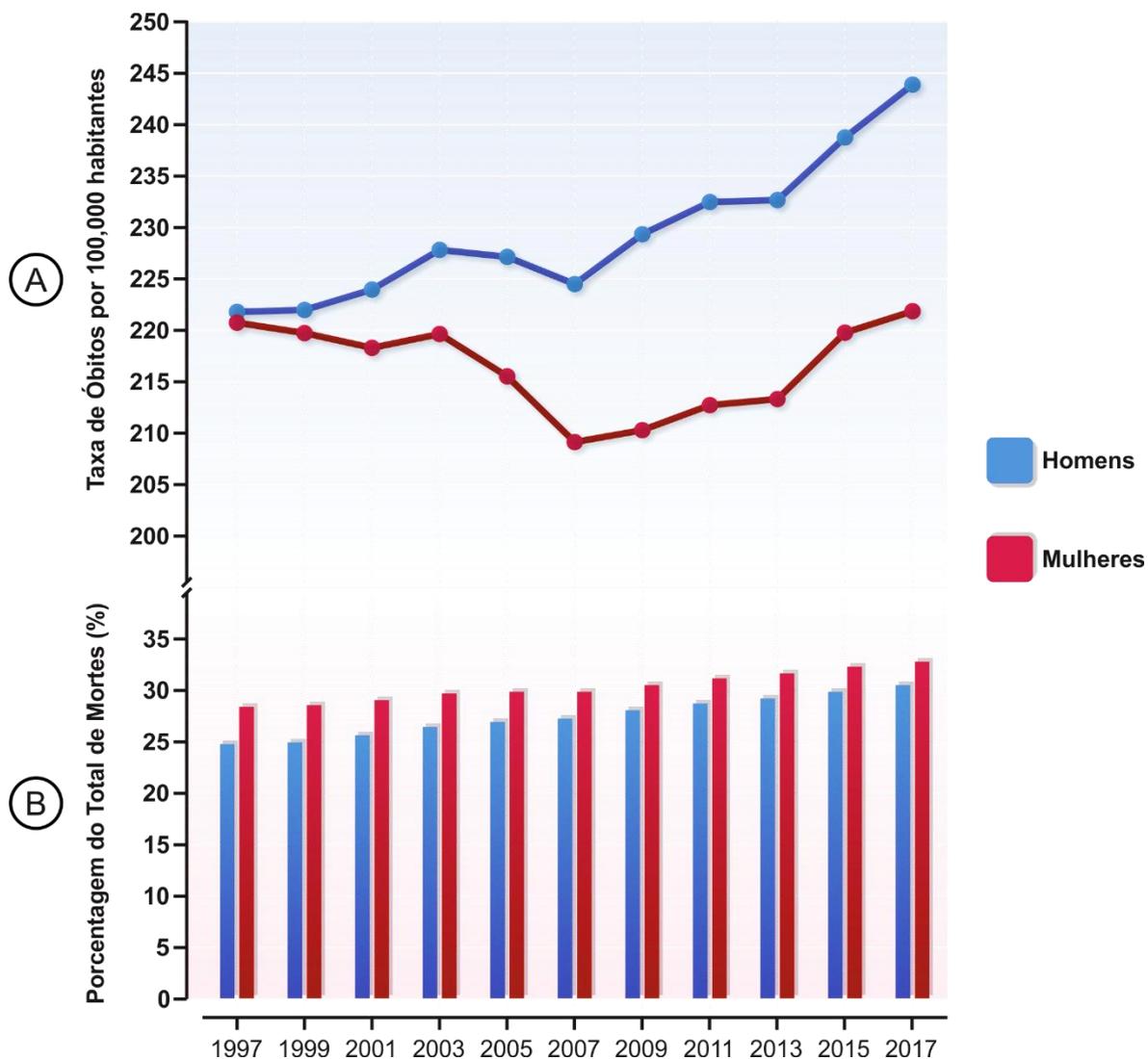


Figura 3. Diferenças sexuais na mortalidade por doenças cardiovasculares entre 1997 e 2017. Taxa de óbitos por 100.000 habitantes (A) e o percentual das mortes por doenças cardiovasculares sobre o número total de mortes (B). Dados compilados do *Institute for Health Metrics and Evaluation* da Universidade de Washington. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/#>.

A severidade das DCV em mulheres é pertinente ao se constatar também que aproximadamente um terço das mulheres correm o risco de desenvolver uma DCV até os 40 anos, ou morrer em decorrência da doença ao longo da vida²⁰. Doenças cardíacas isquêmicas e acidente vascular encefálico são alguns exemplos de DCV mais prevalentes em mulheres (TABELA 1). Recentemente, foi reportado que mulheres com IAM, particularmente as mais velhas (≥ 65 anos), tiveram mais complicações sistêmicas e apresentavam um maior volume e índice de massa ventricular esquerda em decorrência do IAM quando comparadas aos homens²¹. Embora neste estudo as mulheres não demonstrassem alteração na fração de ejeção ventricular esquerda em relação aos homens,

foi constatado que estas exibiram uma incidência de insuficiência cardíaca pós IAM significativamente maior ao final do período de avaliação.

Tabela 1. Diferenças sexuais sobre o quantitativo de mortes e prevalência das doenças cardiovasculares.

Diferenças Sexuais nas Mortes por Doenças Cardiovasculares		
Doenças Cardiovasculares em Geral		
♀		♂
1 em 3	Risco vitalício remanescente para DCV até os 40 anos de idade	2 em 3
421.918	Mortes causadas por DCV e cardiopatia congênita*	391.886
211,6	Taxa de mortalidade por DCV ajustada por idade por 100.000*	300,3
42.7000.000 (35%)	Prevalência de DCV >20 anos**	39.900.000 (37,4%)
Doença Arterial Coronariana		
♀		♂
190.301	Mortes causadas por DAC*	216.050
95,7	Taxa de mortalidade por DAC ajustada por idade por 100.000*	165,4
7.500.000 (6,1%)	Prevalência de DAC** >20 anos	8.800.000 (8,3%)
5.000.000 (4,0%)	Prevalência de angina pectoris** >20 anos	4.000.000 (3,8%)
Acidente Vascular Encefálico		
♀		♂
81.841	Mortes resultantes de AVC*(todas as idades)	54.111
41,3	Taxa de mortalidade por AVC ajustada por idade por 100 000	42,5
4.200.000 (3,3%)	Prevalência de AVC** >20 anos	2.800.000 (2,7%)
Insuficiência Cardíaca		
♀		♂
2.600.000 (2,0%)	Prevalência de insuficiência cardíaca** >20 anos	3.100.000 (3,0%)

Abreviaturas: Doenças cardiovasculares, DCV; Doença arterial coronariana, DAC; Acidente vascular encefálico, AVE. *dados de 2007 **dados de 2008. Adaptado de Mosca et al (2011).

Tanto em homens quanto em mulheres a hipertensão arterial apresenta-se como o principal fator de risco cardiovascular; no entanto, também resguardam suas particularidades. Num estudo avaliando população norte americana em diferentes décadas, observou-se que mulheres ao longo dos anos tem se igualado a os homens na prevalência percentual da hipertensão arterial (FIGURA 4-A), e este é um fenômeno que se acentua à medida que os indivíduos envelhecem, onde, mulheres acima dos 65 anos passam a exibir uma prevalência relativa de hipertensão maior do que os homens (FIGURA 4-B)²².

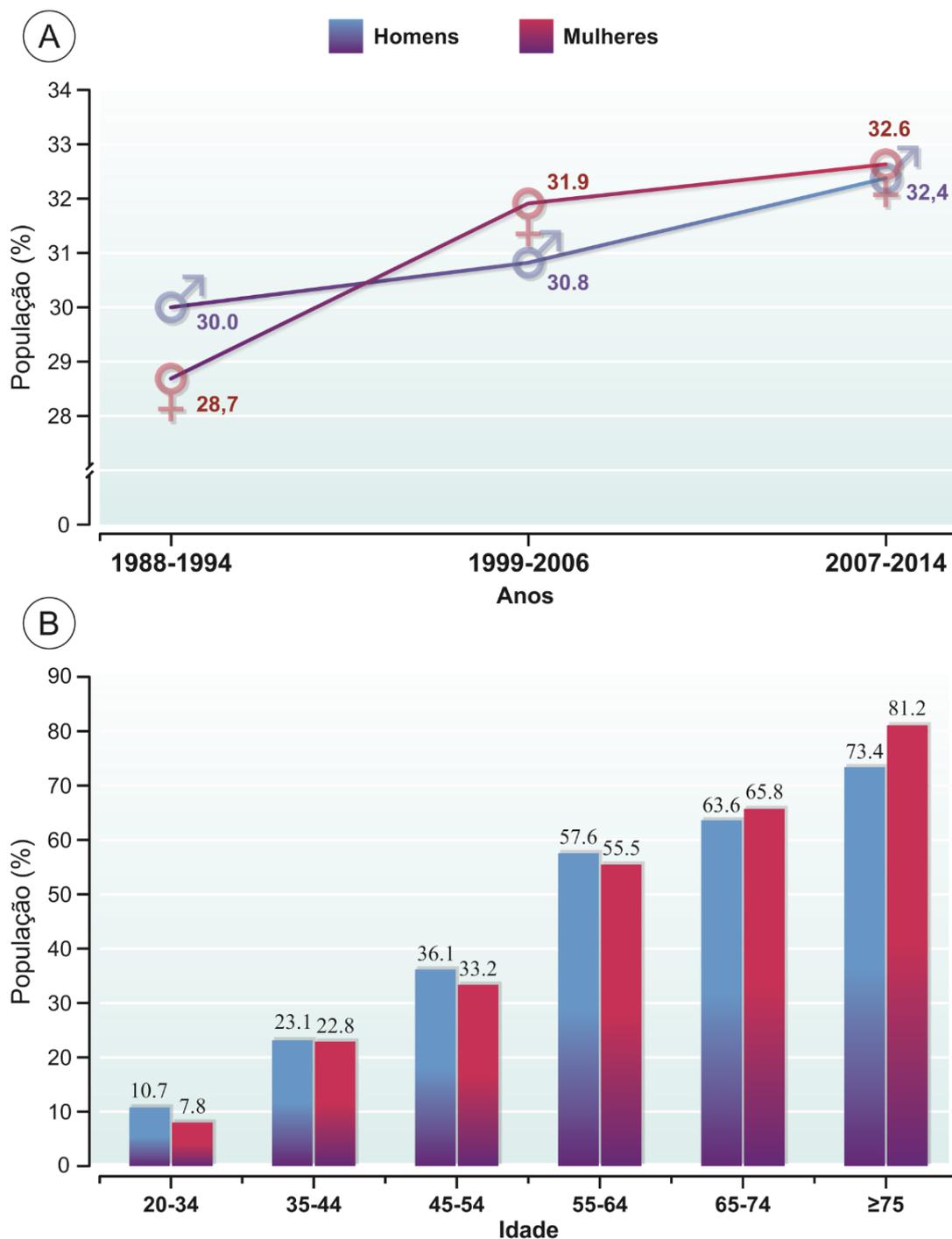


Figura 4. Diferenças sexuais na prevalência da hipertensão arterial em indivíduos ≥ 20 anos: A) tendência de prevalência ajustada por idade; B) prevalência por faixas etárias (2011-2014). Adaptado de Benjamin et al., 2018.

1.1.1. O papel do estrogênio na regulação do sistema cardiovascular

Tal discrepância do perfil cardiovascular das mulheres em relação aos homens, bem como sua plasticidade durante os ciclos vitais, tem aguçado o interesse científico de dissecar seus

contrastes biológicos, o que culminou na estabelecida faculdade cardioprotetora conferida aos hormônios sexuais femininos ²³⁻²⁶. Evidências demonstraram que os estrógenos, principalmente o estrogênio (mais especificamente o 17- β estradiol), têm influência incisiva sobre o sistema cardiovascular, mediando respostas importantes no controle neurológico e hemodinâmico; moderação do perfil lipídico, da inflamação e do estresse oxidativo ²⁷⁻²⁹.

As bases biológicas que compõem os efeitos cardioprotetores do estrogênio são construídas sobre a interação do hormônio com seus receptores. Atualmente, são reconhecidos três receptores de estrogênio francamente envolvidos com o sistema cardiovascular – os receptores de estrogênio alfa (RE- α) e beta (RE- β), e o receptor de estrogênio acoplado a uma proteína G (GPER) ³⁰.

Os receptores RE- α e RE- β fazem parte de uma subfamília de receptores nucleares, aos quais tradicionalmente são atribuídas as principais funções na determinação das diferenças fenotípicas nas fêmeas, bem como sua eficácia característica sobre o sistema cardiovascular ²⁸. Ambos os receptores foram descritos como constituintes da membrana plasmática de diversas células, estando presentes também no citoplasma e núcleo de cardiomiócitos, células do músculo liso vascular (CMLV) e células endoteliais dos mamíferos ²⁷. Também foi comprovada a presença destes receptores em células do sistema nervoso central, em núcleos específicos de controle da pressão arterial relacionados ao sistema renina-angiotensina-aldosterona ³¹. Em suma, a presença dos receptores de estrogênio nos sítios citados desencadeia efeitos benéficos ao sistema circulatório, como sua ação antiaterosclerótica, anti-inflamatória, vasodilatadora e outras mais (FIGURA 5).

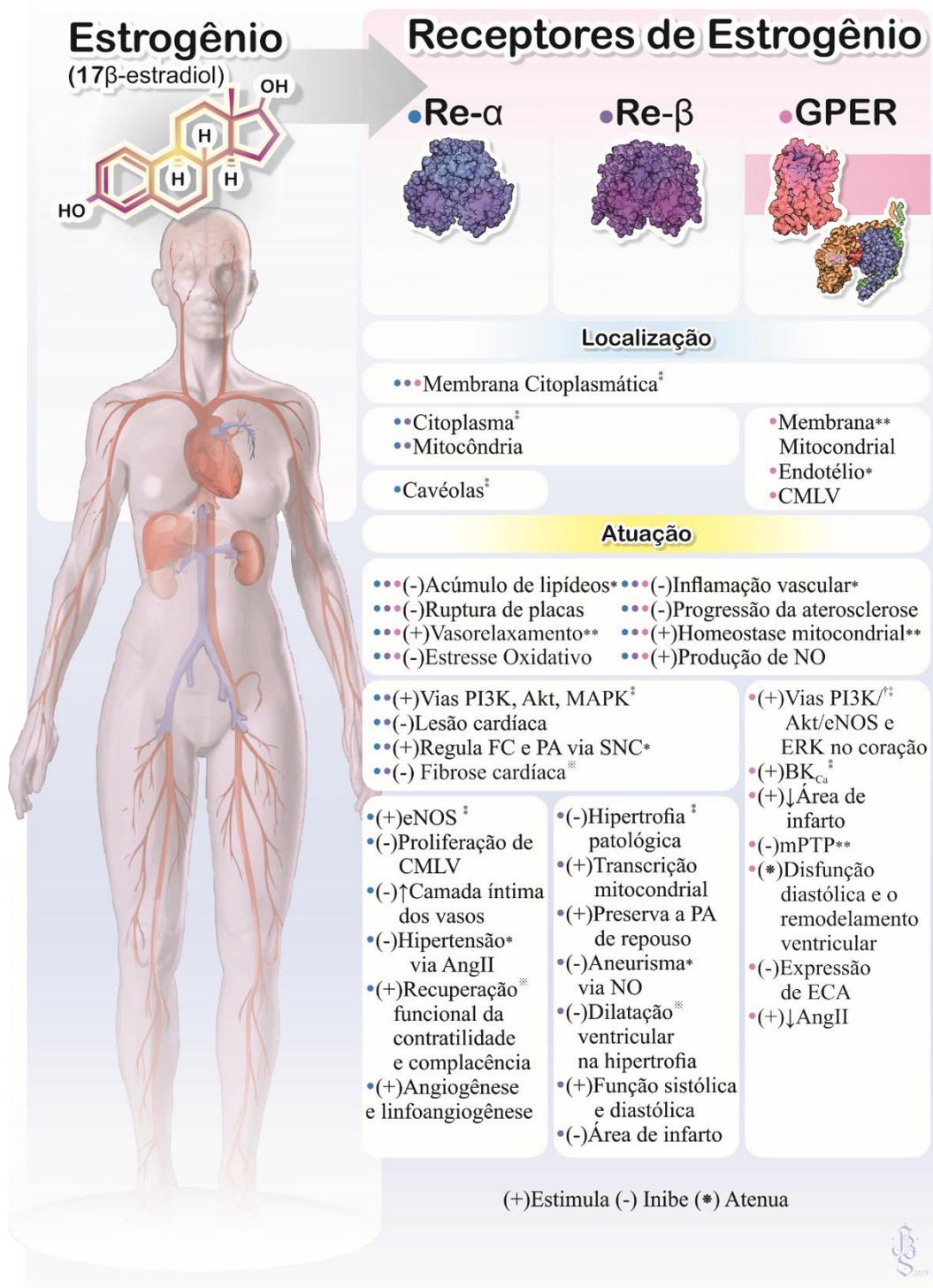


Figura 5. Os receptores de estrogênio: localização e efeitos sobre o sistema cardiovascular. Abreviações: GPER, receptor de estrogênio acoplado a proteína G; NO, óxido nítrico; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; CMLV, célula do músculo liso vascular; FC, frequência cardíaca; PA, pressão arterial; SNC, sistema nervoso central; PI3K, fosfoinositídeo 3-quinase; Akt, proteína quinase B; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; ERK, quinase regulada por sinalização extracelular; BK_{Ca}, canal de potássio de larga condutância ativado por cálcio; mPTP, poro de transição de permeabilidade mitocondrial; ECA, enzima conversora de angiotensina; AngII, angiotensina II. Baseado em: ^{*}Boese et al., 2007 ³²; ^{**}Iorga et al., 2017 ²⁸; [‡]Knowlton e Lee, 2012 ²⁵; [†]Deschamps e Murph, 2009 ³³; [‡]Lee et al. 2014 ³⁴; [‡]Dworatzek e Mahmoodzadeh, 2017 ³⁵.

Já o GPER faz parte de uma classe de receptores denominados GPCR (receptor acoplado a proteína G), primeiramente descrito como um receptor órfão (sem um ligante endógeno conhecido), o qual mais tarde foi classificado com GPR30 (um GPCR específico com afinidade ao estrogênio) ^{36,37}, e atualmente é reconhecido como o genuíno terceiro receptor de estrogênio de ação rápida ³⁸. Sua proeminente ação cardioprotetora tem sido estudada nos últimos anos e lhe são atribuídas diferentes propriedades, como um mediador da vasodilatação independente do endotélio (por ativação de canais de potássio de larga condutância ativados por cálcio e canais de potássio voltagem dependentes), um atenuador da disfunção diastólica e remodelamento cardíaco ²⁵, e um modulador da resposta inflamatória em modelos experimentais ³⁹ (FIGURA 5).

Duas são as vias estabelecidas ao estrogênio responsáveis por modular a resposta de sinalização intracelular mediante a ativação de seus receptores: 1) a via genômica, via clássica de efeitos a longo prazo; 2) e a via não-genômica, via de efeitos rápidos. Em ambas foram identificados resultados cardiovasculares positivos na síntese de substâncias importantes à saúde das células, como o aumento na produção de óxido nítrico (NO) e a redução das espécies reativas de oxigênio (EROs) ²⁸ (FIGURA 6).

Com a redução ou ausência sistêmica do estrogênio, como ocorrido na menopausa, pós-menopausa ou ovariectomia bilateral, fica evidente a perda de seus mecanismos cardioprotetores ou uma adaptação das funções celulares de forma a provocar sensível prejuízo ao sistema ^{26,40,41}. Uma vez instaurada esta condição, as mudanças inicialmente ocorrem no microambiente celular, que em associação aos demais fatores de risco, interferem na homeostase da unidade tecidual. Centralizando a fisiopatologia destes eventos, a disfunção endotelial e o estresse oxidativo são apontados como importantes mecanismos de desequilíbrio, causando, por exemplo, o aumento da rigidez da parede vascular, por remodelamento estrutural do tecido, que por fim, viabiliza o surgimento das DCV ou o agravamento de problemas já existentes ⁴²⁻⁴⁴ (FIGURA 7).

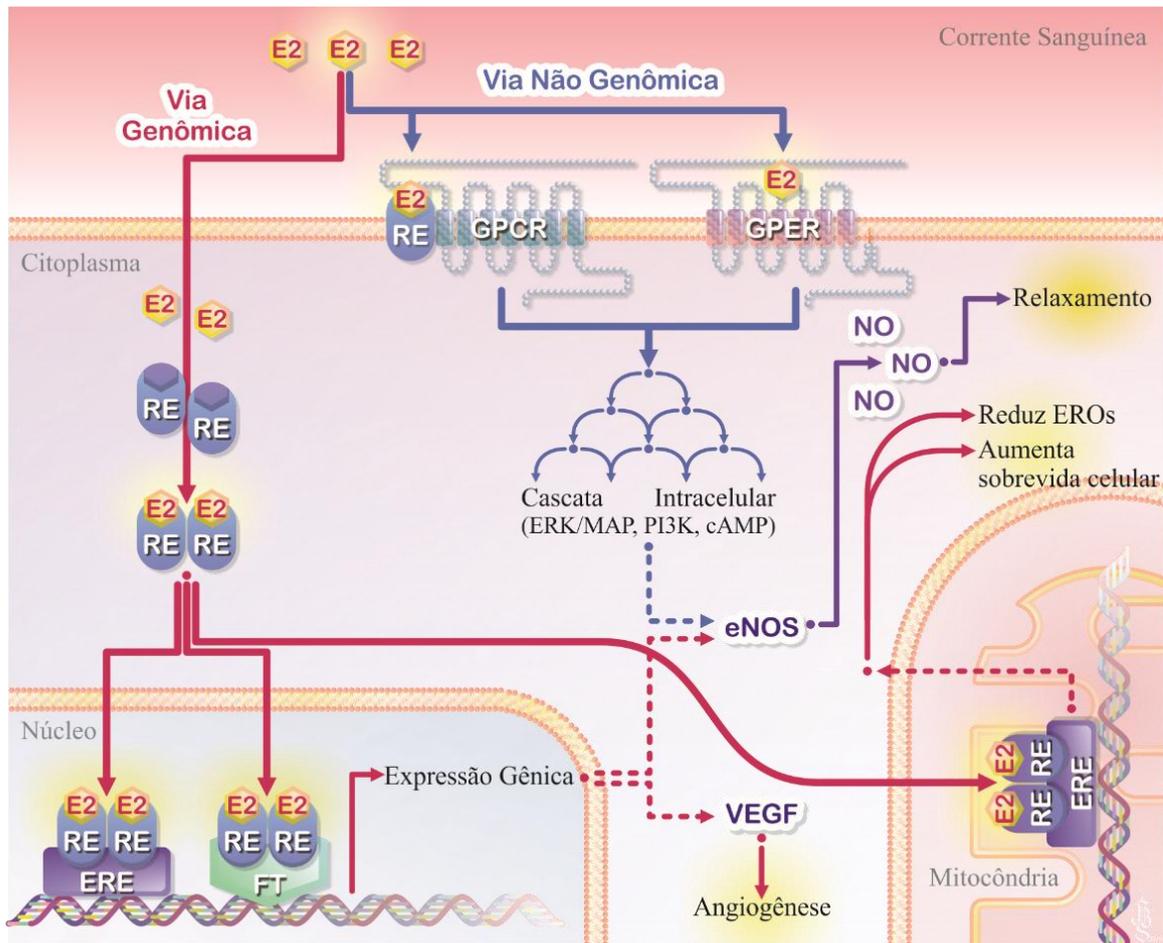


Figura 6. Ação genômica e não genômica do estrogênio (E2). E2 pode regular a expressão gênica e a atividade de moléculas de sinalização por ligação aos seus receptores (RE) das vias genômicas e/ou não genômicas. Na regulação genômica (setas vermelhas), a ligação de E2 ao RE promove a formação de homo/hetero dímeros, translocando-se para o núcleo e ligando-se diretamente a elementos de resposta estrogênica (ERE), ou a fatores de transcrição (FT) que regulam a transcrição de seus genes alvo, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator pro-angiogênico. Na regulação não-genômica (setas azuis), a ligação do E2 aos REs e ao GPER na membrana plasmática leva à ativação das vias MAPK / ERK / PI3K / cAMP, que induz a ativação da eNOS, um potente mediador da vasodilatação. O E2 também se liga à REs localizados na membrana mitocondrial, melhorando sua função, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumentando a sobrevivência celular. Abreviaturas: ERK, proteína quinase ativada por sinal extracelular; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K, fosfoinositido 3-quinase; cAMP, adenosina monofosfato cíclico. Adaptado de Iorda et al., 2017.

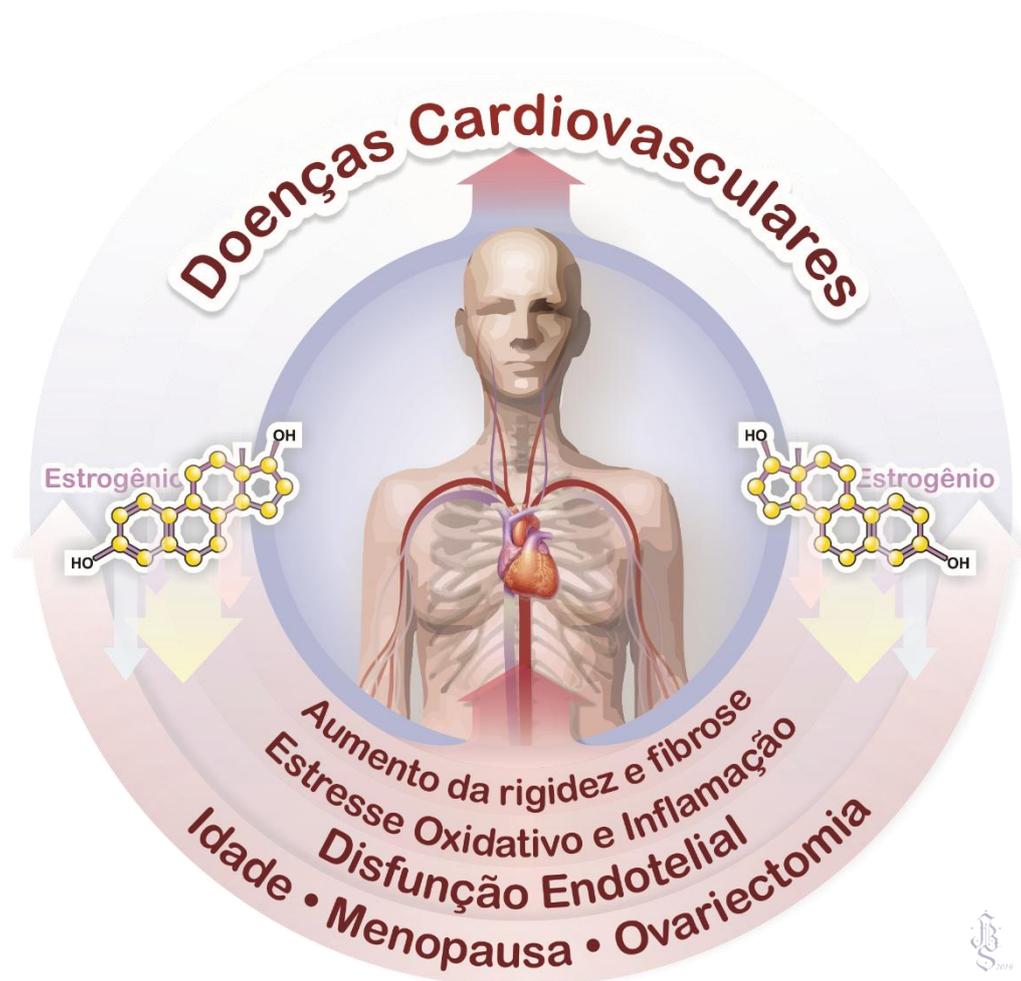


Figura 7. Base fisiopatológica das doenças cardiovasculares em mulheres relacionada à depleção hormonal. Fonte: o autor.

1.2. A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL COMO UM IMPORTANTE PILAR NO DESENVOLVIMENTO DAS DCV

Durante algum tempo o endotélio vascular foi considerado uma mera barreira física entre o lúmen e as demais camadas dos vasos e os tecidos por eles assistidos. No entanto, evidências contundentes transcenderam este conceito provando ser este um conjunto de células altamente ativas, com o *status* de órgão endócrino/parácrino capaz de influenciar inúmeros processos homeostáticos, como o controle do tônus vascular, do trânsito de células e nutrientes, a manutenção da viscosidade sanguínea e a formação de novos vasos

De fato, o endotélio, além de descrito como uma estrutura dinâmica, é considerado um órgão heterogêneo, dada sua diversidade fenotípica nos espaços que ocupa e no tempo de maturação de suas células. Estas possuem propriedades não lineares e complexas que não podem ser desassociadas do contexto de todo organismo, comparando-se a um sistema que capta estímulos do microambiente local e os respondem de maneira a não apenas manter a saúde, mas também ditar a natureza focal de doenças vasculares ou de órgãos adjacentes ⁴⁷ (FIGURA 8). Desta forma, é permissível dizer que o endotélio está envolvido com todos os processos fiso/patológicos, seja como um determinante primário ou como uma fonte de estímulos colaterais.

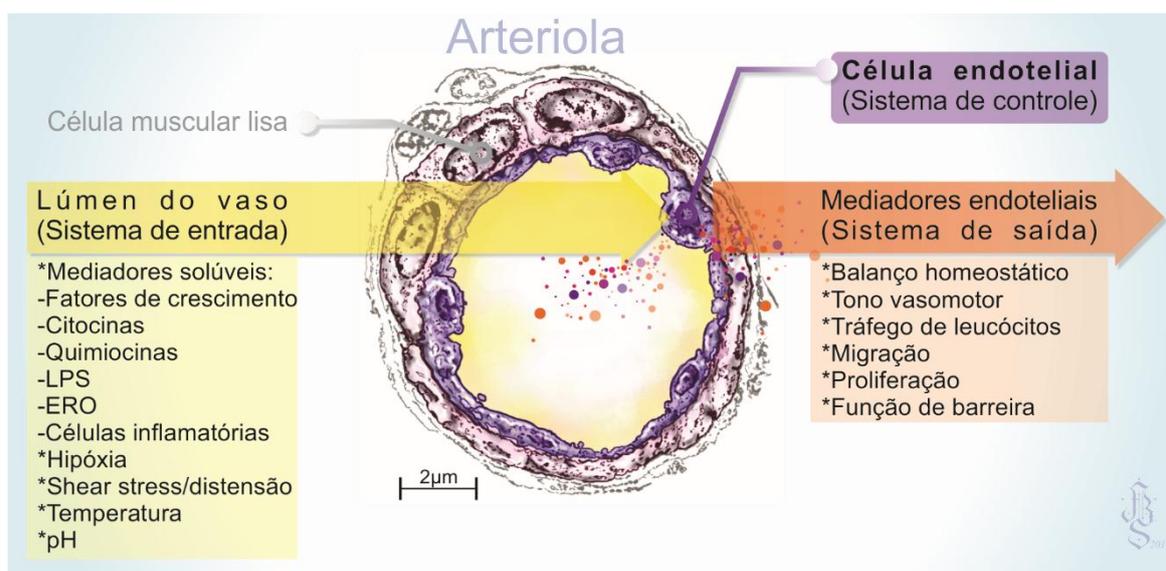


Figura 8. Endotélio como um dispositivo de entrada-saída. Os estímulos (sistema de entrada) surgem do ambiente extracelular; e as respostas (sistema de saída) manifestam-se como o fenótipo celular; o ponto de ajuste representa as propriedades intrínsecas da célula endotelial (sistema de controle). LPS, lipopolissacarídeo; EROs, espécies reativas de oxigênio. Adaptado: Aird, 2004.

A constatação de Furchgott e Zawadzki, nos anos 80, de que o endotélio era capaz de regular o tônus vascular em resposta a acetilcolina (ACh), direcionou o rumo das pesquisas sobre o sistema cardiovascular, levando à descobertas de que estas células são responsáveis por produzir e liberar poderosas substâncias vasoativas, denominadas fatores de relaxamento derivados do endotélio e fatores constritores derivados do endotélio (TABELA 2) ^{48,49}. Quando a capacidade das células endoteliais de liberar os vasodilatadores (com destaque para o NO) é reduzida, e em particular se a produção dos

vasoconstritores está aumentada, instala-se uma condição classificada como disfunção endotelial; e ao que parece ser, este é o marco inicial na cadeia de eventos danosos ao sistema cardiovascular, reconhecida como um preditor de DCV ⁴⁸.

Tabela 2. Fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) em artérias de resistência.

EDRFs	EDCFs
Óxido nítrico (NO)	Endotelina-1
Prostaciclina (PGI ₂)	Angiotensina II
Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF):	Tromboxano A ₂ (TxA ₂)
- Íons potássio (K ⁺)	Prostaglandina H ₂
- Junções gap Mio-endoteliais	Espécies reativas de oxigênio (EROs)
- Ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)	
- Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	

Adaptado: Kang, 2014.

1.2.1. O Óxido Nítrico

Neste balanço da regulação exercida pelo endotélio, o NO se apresenta como uma molécula de papel crucial, uma vez que é responsável por desencadear não somente o relaxamento das células musculares lisas, mas também por regular sua proliferação, inibir a agregação plaquetária, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), interferir na liberação/ação dos fatores constritores endoteliais e reduzir a expressão de moléculas de adesão, afetando a fixação de monócitos e plaquetas no leito vascular ⁵⁰. Além de regular a homeostase vascular, o NO também age como um neurotransmissor (pela via de sinalização da guanilato ciclase solúvel), regulando a transcrição gênica e a tradução de mRNA (por exemplo, ligando-se a elementos responsivos ao ferro), ou ainda leva a modificações pós-traducionais (por exemplo, ribosilação de ADP) ⁵¹.

O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), da qual são identificadas três isoformas: neuronal (nNOS ou NOS-1), induzível (iNOS ou NOS-2) e endotelial (eNOS ou NOS-3), que em suas formas ativas são reconhecidas como dímeros, mas que de fato

são estruturas tetraméricas constituídas por dois monômeros de NOS associados à dois monômeros de calmodulina. Possuem em seu domínio redutase os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), e em seu domínio oxidase os cofatores (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (BH_4) e protoporfirina IX (heme), que em conjunto catalisam a conversão dos substratos de L-arginina, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e oxigênio em NO, citrulina e NADP⁵². A figura 9 traz a representação molecular da isoforma endotelial da enzima, em diferentes conformações, e os processos esquemáticos de síntese do radical NO (quando a enzima está acoplada, ou seja, de posse de todos os cofatores) ou de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (quando em sua versão desacoplada ou monomérica).

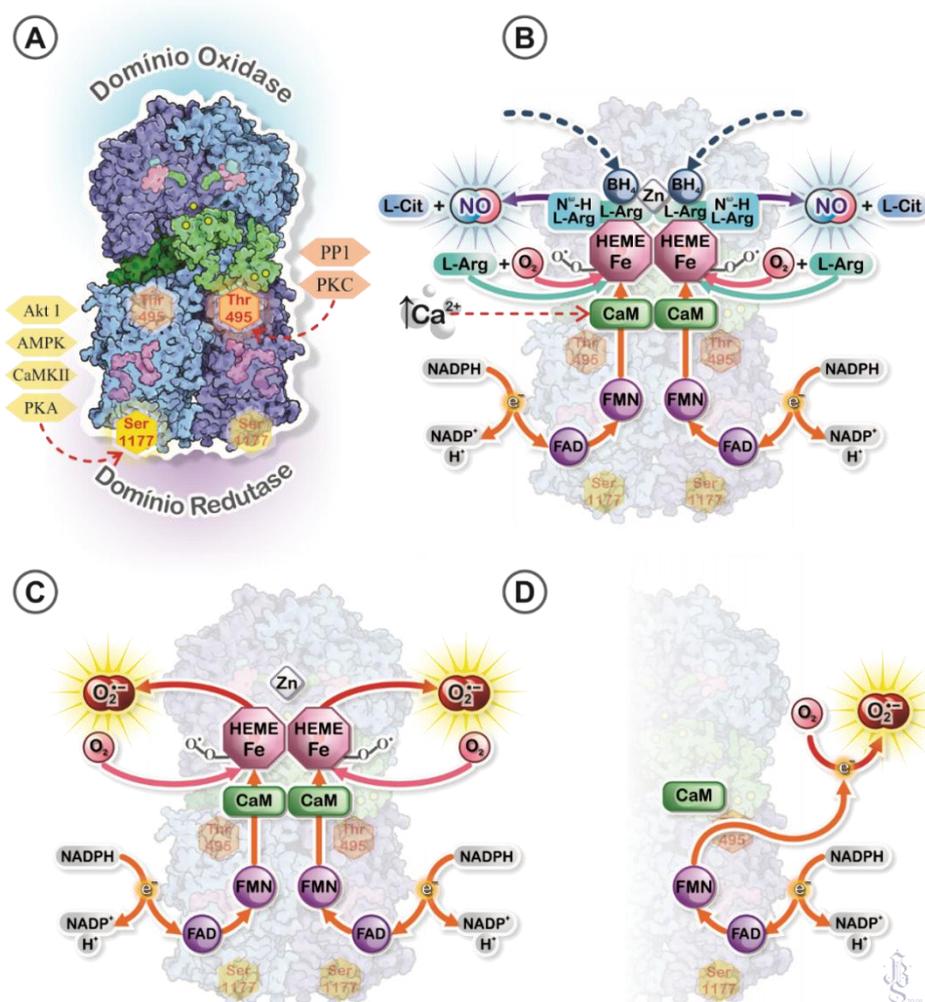
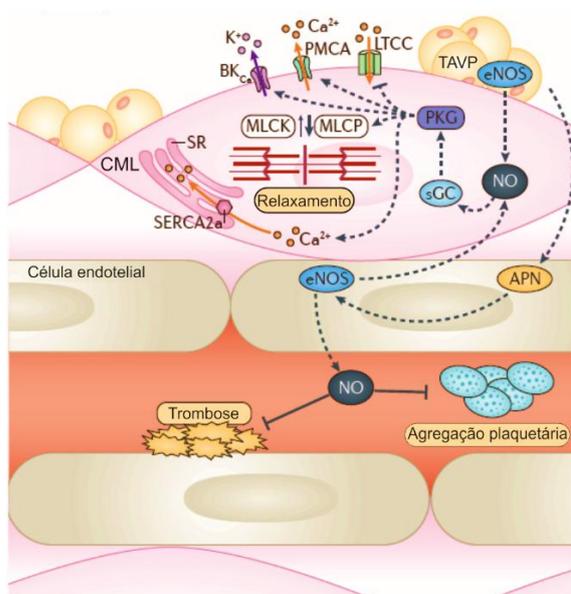


Figura 9. Estrutura básica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e esquema de catálise de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A) Representação da molécula de eNOS. Os dímeros (estruturas em azul claro e escuro) unidos pelas calmodulinas (estrutura em verde) ao centro dos domínios oxidase (fundo azul) e redutase (fundo magenta). O sítio de serina 1177

(regulação positiva - hexágono amarelo) e treonina 495 (regulação negativa - hexágono laranja) são ativados por proteínas quinases e fosfatase, respectivamente. **B)** Com o aumento do cálcio intracelular, na presença de substratos de L-arginina e cofator BH_4 suficientes, os dímeros de NOS intactos acoplados à sua porção heme (condição indispensável para a interação entre os domínios e para a transferência eletrônica entre os domínios das flavinas para o heme do monômero oposto e na redução de O_2), a enzima sintetiza NO. A L-citrulina (L-Cit) é formada como subproduto e a N° -hidroxi-L-arginina (N° -H L-Arg) é um composto intermediário na reação. **C)** As taxas de oxidação do NADPH são significativamente aumentadas em dímeros de NOS livres de substrato contendo a porção heme e desacoplados do cofator BH_4 , consistente com uma produção de $O_2^{\bullet-}$ mais eficaz. **D)** Os monômeros, e até mesmo os domínios isolados de redutase, são capazes de transferir elétrons do NADPH para as flavinas FAD e FMN, mas têm uma capacidade limitada para reduzir o oxigênio molecular em $O_2^{\bullet-}$, mas podem se ligar à calmodulina (CaM), que estimula a transferência de elétrons dentro do domínio da redutase. No entanto, os monômeros são incapazes de se ligar ao cofator BH_4 ou ao substrato L-arginina e não podendo catalisar a produção de NO. Akt 1, proteína RAC-alfa serina/treonina quinase 1; AMPK, proteína quinase ativada por 5'adenosina monofosfato; CaMKII, proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II; PKA, proteína quinase A; PP1, proteína fosfatase 1; PKC, proteína quinase C; Zn, zinco. Adaptado de Förstermann, 2006; Förstermann e Münzel, 2006; Förstermann e Sessa, 2011.

Em situações onde há comprometimento da síntese e/ou biodisponibilidade do NO, o endotélio passa a ter dificuldades em desempenhar suas funções cardioprotetoras, ou seja, a disfunção endotelial pode ser induzida por processos fisiopatológicos como por exemplo no aumento de produção de EROs (que leva ao estresse oxidativo) e no aumento de mediadores pró-inflamatórios, ambos, comuns na hiperlipidemia e hipertensão arterial ^{50,53} (FIGURA 10).

A) Fisiológico



B) Patológico

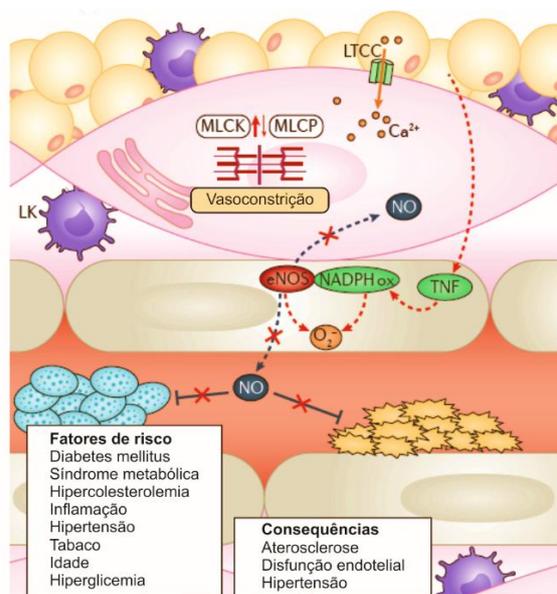


Figura 10. Via NOS-NO em leitos vasculares em condições de saúde e doença. **A)** Em condições fisiológicas, a liberação de óxido nítrico (NO) no lúmen do vaso pela enzima óxido nítrico sintase

endotelial (eNOS) nas células endoteliais inibe a agregação plaquetária e a trombose. Abluminalmente, o NO parácrino ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) para produzir cGMP e ativar a proteína quinase G (PKG) nas células do músculo liso (CML). O cGMP e o PKG contribuem para diminuir os níveis de Ca^{2+} intracelular, estimulando a sua recaptação pela ATPase-cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático (SERCA) e a sua extrusão através da ATPase transportadora de cálcio (PMCA) da membrana plasmática. Além disso, a PKG desencadeia o efluxo de K^+ pelo canal de potássio sensível a Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) para hiperpolarizar a célula, reduzindo assim a entrada de Ca^{2+} através do canal de cálcio do tipo L (LTCC). Finalmente, a PKG promove a desfosforilação da cadeia leve da miosina através da fosfatase associada (MLCP). Juntas, essas modificações medeiam o relaxamento vascular. O tecido adiposo perivascular (TAVP) contribui para este efeito em condições saudáveis, liberando NO e adiponectina (APN), que ativam a produção de NO em CML. **B)** Fatores de risco cardiovascular reduzem a biodisponibilidade do NO pelo desacoplamento da eNOS e ativação da NADPH oxidase (NADPH ox), resultando em produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). A biodisponibilidade reduzida do NO promove agregação plaquetária, trombose e vasoconstrição. O fator de necrose tumoral (TNF) produzido a partir do PVAT ativa ainda mais o NADPH ox. A Disfunção endotelial subsequente, a permeabilidade aumentada e a diapedese de leucócitos (LK) contribuem para o início da aterosclerose. MLCK, cinase de cadeia leve de miosina; SR, retículo sarcoplasmático. Fonte: Farah, Michel e Balligand, 2018.

1.2.2. Hipertensão Arterial e Disfunção Endotelial

A hipertensão é uma doença que guarda intrincada relação de causa/efeito com a disfunção endotelial, dado seu caráter multifatorial⁵⁴. Vanhoutte et al., em uma ampla revisão sobre a disfunção endotelial e as doenças vasculares, sumarizam que os experimentos em modelos de hipertensão essencial demonstraram que a hipertensão promove a disfunção endotelial de forma progressiva, mesclando fatores genéticos e ambientais de resposta inflamatória. Um exemplo pertinente de suas observações foi que em cepas hipertensas o envelhecimento correlacionou-se com um incremento na produção de prostaglandinas constritoras e, paralelamente, à medida progressiva da elevação pressórica sistêmica também correlacionou-se com um aumento na síntese de endoperóxidos e prostaciclina; além de demonstrarem uma hipersensibilidade congênita ao vasopressor tromboxanos⁴⁸.

De fato, o prejuízo na biodisponibilidade do NO está no cerne do desenvolvimento e progressão da hipertensão, mas ao mesmo tempo a doença traz em si outros fatores etiológicos que desencadeiam ou retroalimentam esta disfunção. Como exemplos temos o aumento da pressão de cisalhamento que, em detrimento da produção de NO, passa a agredir o leito vascular ativando vias oxidativas, como observado na aterosclerose^{55,56}; na deflagração do sistema renina-angiotensina o estímulo dos receptores de angiotensina do tipo 1, que pode potencializar a síntese de EROs pela NADPH oxidase intensificando o desequilíbrio⁵⁷; e de igual forma, a ativação de mediadores pró-inflamatórios e

vasoconstritores, ao fim de suas vias, também resultam na produção aumentada de $O_2^{\bullet-}$ e outras espécies reativas nocivas^{55,58}.

Com isso, pode-se definir que a homeostase do tônus vascular desenha vias tênues de equilíbrio entre relaxamento e contração, de forma que os vasos respondam a contento as necessidades do meio; porém, na hipertensão há um rearranjo tendencioso às vias constritoras (FIGURA 11). Componentes reguladores da síntese de NO como o cofator BH_4 e o substrato L-arginina, são essenciais no acoplamento e função da eNOS, contudo são sensíveis à oxidação. Uma vez desacoplada, a eNOS passa a ser uma fonte de $O_2^{\bullet-}$, e esta molécula altamente reativa por si só pode provocar ou induzir danos na estrutura e função das células, ou ainda pode ser convertida a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou formar peroxinitrito ($ONOO^-$), influenciando a expressão e atividade da arginase, enzima que diminui a biodisponibilidade da L-arginina. Contudo, o H_2O_2 é uma molécula bivalente, a qual em condições fisiológicas, ou seja, em baixas concentrações, está associada a funções endoteliais positivas em artérias de resistência, mediando, por exemplo, a ativação do sítio de serina 1177 na eNOS para formação de NO, e também atuando com um dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF), um agonistas dos mecanismos de vasodilatação arterial⁵⁹. Já o $ONOO^-$ é reportado como inibidor da síntese de prostaciclina, um inibidor de canais de potássio no músculo vascular e um agente oxidante do BH_4 ; bem com um ativador do sítio de serina 1177 que, diferente do sítio inibidor treonina 495, estimula o desacoplamento da eNOS⁵⁹⁻⁶¹.

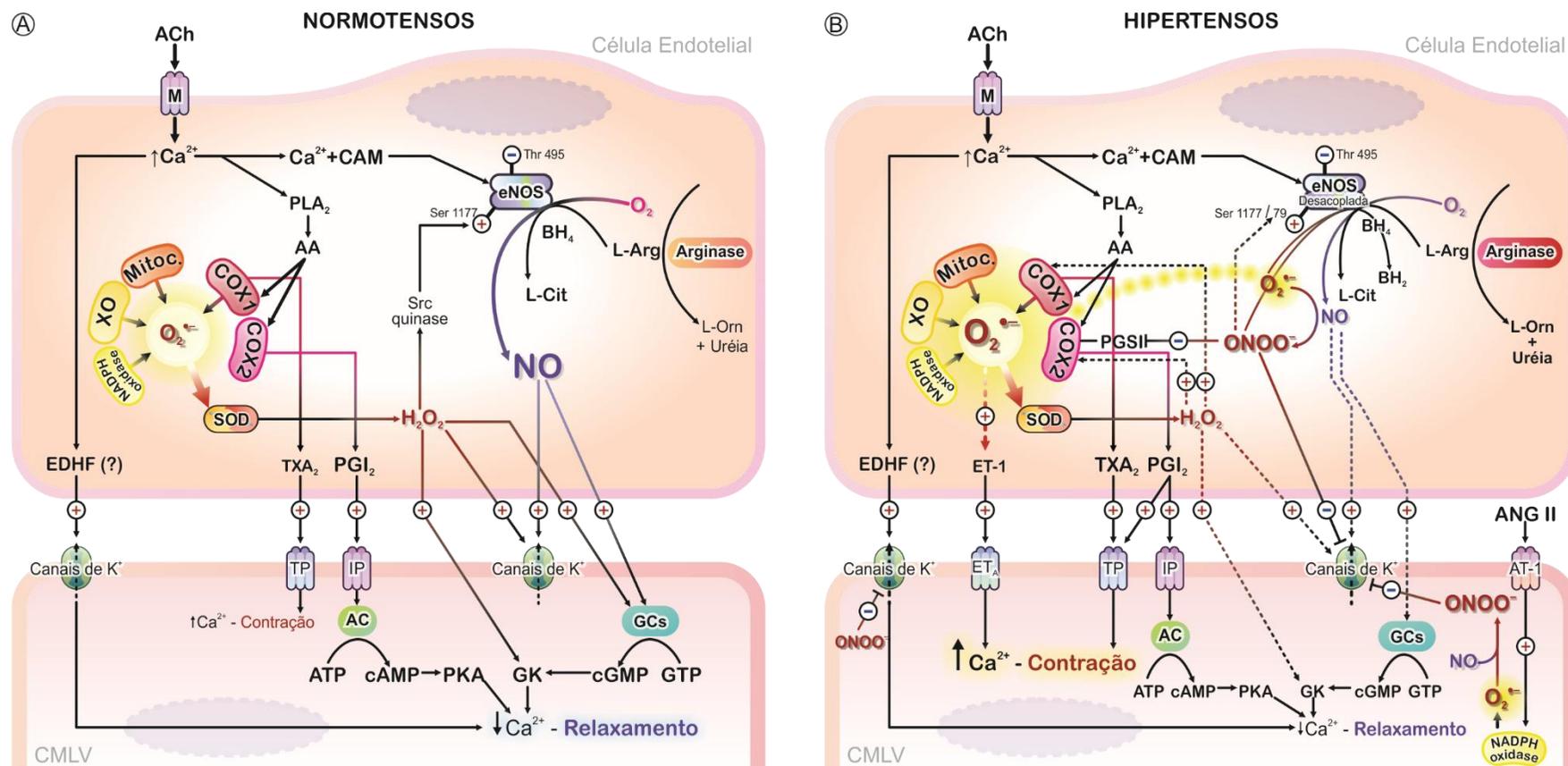


Figura 11. Mecanismos de controle do tônus vascular em artérias de animais normotensos (A) e hipertensos (B), mostrando a diferença do balanço entre os fatores de relaxamento e contração. ACh, acetilcolina; M, receptores muscarínicos; Ca^{2+} , íon cálcio, CaM, calmodulina; PLA₂, fosfolipase A₂; AA, ácido araquidônico; COX, cicloxigenase; PGSI, enzima inibidora da síntese da cicloxigenase; Mitoc., mitocôndria; XO, xantina oxidase; SOD, superóxido dismutase; TXA₂, tromboxano; PGI₂, prostaglandina; L-Arg, L-arginina; L-Cit, L-citrulina; L-Orn, L-ornitina; EDHF, fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio; TP, receptor de tromboxano; IP, receptor de prostaciclina; AC, adenilato ciclase; ATP, adenosina trifosfato; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; PKA, proteína quinase A; GK, guanilato quinase; cGMP, guanosina monofosfato cíclico; GTP, guanosina trifosfato; ET-1, endotelina; ET_A, receptor de endotelina; ANG II, angiotensina tipo 2; AT-1, receptor tipo 1 de angiotensina. Adaptado de: Silva et al., 2012.

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO

Por meio dos exemplos anteriores podemos constatar que a disfunção endotelial na hipertensão também está fortemente relacionada à outra condição de instabilidade orgânica, o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade do organismo de controlá-las^{62,63}. Inúmeras são as fontes e os tipos de espécies reativas⁶⁴⁻⁶⁶ e erroneamente são rotuladas como nocivas, mas fato é que elas são parte de processos inerentes aos organismos aeróbicos, principalmente as derivadas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN), produzidas naturalmente durante o metabolismo celular ou em resposta algum estímulo biológico^{67,68}. A regulação de suas concentrações é feita pelo sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase [SOD]; catalase; glutathione peroxidase [GPx] e glutathione reductase [GR]) e não enzimático (glutathione [GSH]; coenzima Q10, ácido alfa lipóico, entre outros), presentes no próprio organismo ou adquiridos pela dieta (a-tocoferol, β -caroteno, flavonoides elagitaninos e outros)⁶⁹⁻⁷¹. A evolução adaptativa do organismo ao estresse oxidativo depende do equilíbrio dos sistemas de produção e controle das espécies reativas, os quais determinam o ritmo da senescência, senilidade ou desenvolvimento e agravo de doenças^{72,73} (FIGURA 12).

Estruturas e processos biológicos do organismo, como a ação das enzimas NADPH oxidase e a xantina oxidase; bem como o metabolismo do ácido araquidônico, a oxirredução de metais de transição e a cadeia respiratória mitocondrial são fontes espontâneas de espécies reativas, que em circunstâncias patológicas sustentam o estresse oxidativo; sendo o $O_2^{\bullet-}$, na maioria das vezes, a molécula primordial na cadeia de eventos oxidantes^{74,75}. Uma vez estando biodisponíveis no meio, as EROs podem interagir com diferentes substâncias, propiciando danos à macromoléculas (ex.: proteínas, lipídeos e DNA) e perturbando os processos de sinalização dependentes de oxirredução na parede vascular^{48,76}. Neste ponto, fica a cargo do sistema antioxidante o controle das EROs que, em coordenação, transformam estas moléculas em substratos menos nocivos ou inócuos (FIGURA 13).

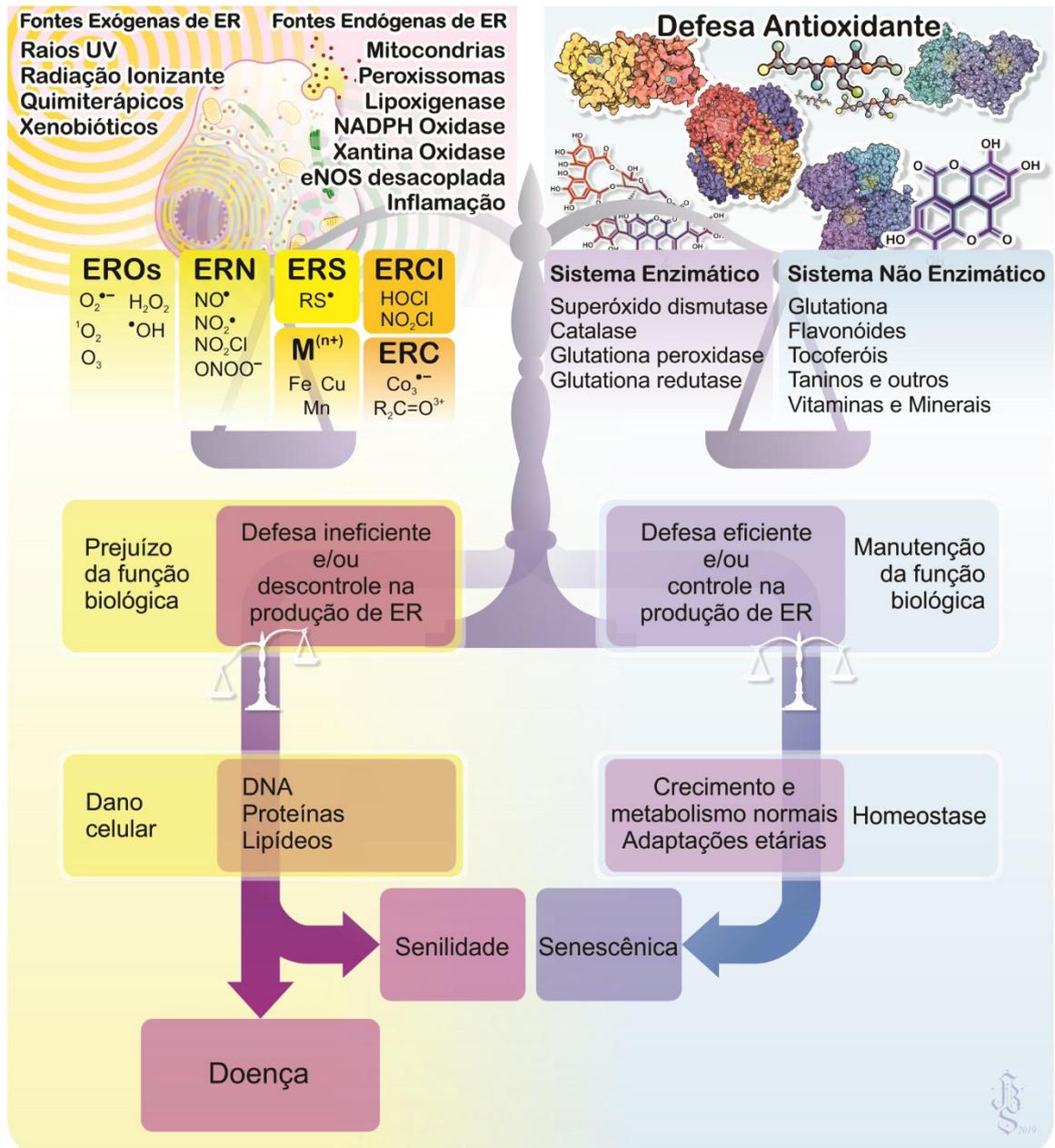


Figura 12. Representação das respostas adaptativas do organismo mediante o balanço entre a produção e controle das espécies reativas (ER). EROs, espécies reativas de oxigênio; ERN, espécies reativas de nitrogênio; ERS, espécies reativas de enxofre, ERCI, espécies reativas de cloro; $M^{(n+)}$, metais de transição; ERC, espécies reativas de carbono. Adaptado: Vasconcelos et al., 2007.

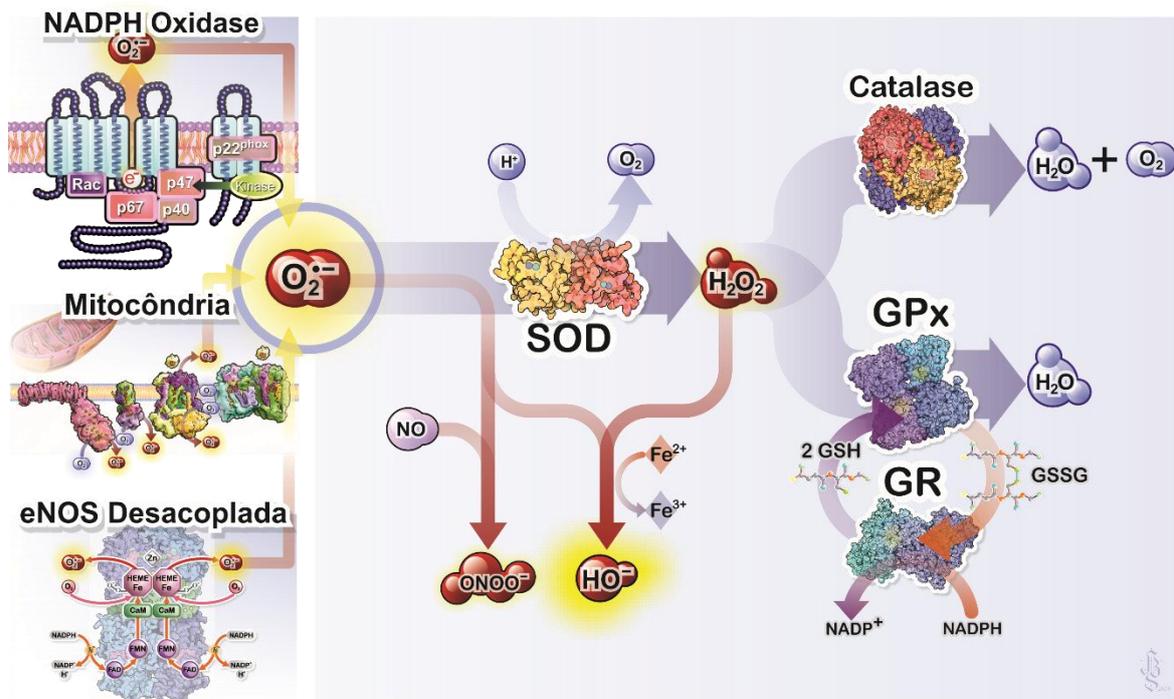


Figura 13. Ação esquemática do sistema antioxidante enzimático sobre as espécies reativas de oxigênio. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerado a partir dos processos fisiológicos ou patológicos de estruturas como a NADPH oxidase, cadeia respiratória mitocondrial e eNOS desacoplada é então captado pela enzima superóxido dismutase (SOD) que, por transferência de elétron, o transforma em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando uma molécula de oxigênio. Caso a enzima falhe, ou ânion esteja excedente no meio, o $O_2^{\bullet-}$ pode interagir com moléculas de óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) e/ou participar no ciclo de oxirredução do ferro (Fe^{n+}) e gerar radicais hidroxilas (HO^\bullet), potente agente oxidante. O H_2O_2 quando não recrutado a exercer funções essenciais será dismutado em uma molécula inócua de água (H_2O), seja pela ação da catalase (e neste processo uma molécula de O_2 também será formada) ou pela glutaciona peroxidase (GPx). Esta última, catalisa o H_2O_2 necessitando de duas moléculas de glutaciona (GSH) e neste processo a glutaciona oxidada (GSSG) será restaurada ao seu estado natural pela atividade da glutaciona redutase (GR), que oxida uma molécula de NADPH. Fonte: o autor.

Uma vez instalado o estresse oxidativo, as vias de sinalização dependentes das EROs, necessárias ao bom funcionamento das células, são desvirtuadas e, especificamente no endotélio, a cascata de sinalização vasoprotetora do NO é afetada, onde o $O_2^{\bullet-}$ excedente passa rapidamente a sequestrar o escasso NO, transformando-o em $ONOO^-$. Essa molécula, por si só, é um potente agente oxidante que dentre muitos danos, também interage como o cofator BH_4 , levando ao desacoplamento da eNOS, que passa a funcionar como uma enzima pró-oxidante (por reduzir o O_2 em $O_2^{\bullet-}$), efetivando a disfunção endotelial (FIGURA11) ⁷⁷.

Embora o estresse oxidativo na hipertensão seja um tema em franca expansão, muito se evidencia que sua principal influência sobre a pressão arterial se dê em nível vascular, onde, além de discorrer sobre a disfunção endotelial e sua influência no balanço de substâncias vasoativas, também incita a produção de fatores de crescimento e fibrose através da ativação de metaloproteinases de matriz (enzimas de reparação tecidual), o aumento do cálcio intracelular, a ativação do crescimento e vias de sinalização inflamatória e aumento da deposição de matriz extracelular, que redundam no remodelamento estrutural dos vasos, incrementando a disfunção endotelial ⁷⁸.

Mediante não só a este desaparecimento do sistema antioxidante endógeno, mas também os efeitos globais do estresse oxidativo nos organismos vivos, houve um aumento do interesse científico em pesquisas sobre substâncias antioxidantes exógenas, com um potencial apelo na descrição do seu auxílio no restabelecimento das funções orgânicas, seja na busca do entendimento de seu papel coadjuvante/essencial neste processo ou como propostas terapêuticas de fato ⁷⁹⁻⁸².

1.4. TERAPIAS ANTIOXIDANTES E DCV

A progressiva estatística dos casos de DCV e danos correlatos, contrapostos aos tratamentos clínicos e farmacológicos existentes, cada vez mais onerosos ⁸³, faz crescer o interesse por fontes terapêuticas de baixo custo, fácil acesso e de resultados efetivos equivalentes ou melhores. Num levantamento estatístico recente, publicado pela *The Lancet*, sobre a correlação entre o consumo dos principais alimentos/nutrientes em 195 países e o seu impacto na morbimortalidade por doenças crônicas não transmissíveis, constatou que os hábitos alimentares precários estão associados a tais enfermidades e potencialmente são os maiores contribuidores das taxas de mortes em todo mundo ⁸⁴. Os pesquisadores discutem que, diferente de muitos outros fatores de risco, o risco dietético pode afetar as pessoas independentemente da idade, sexo e desenvolvimento socioeconômico, e que o consumo elevado de sal, um baixo consumo de grãos e frutas estão interligados principalmente aos registros de óbitos por DCV (FIGURA 14).

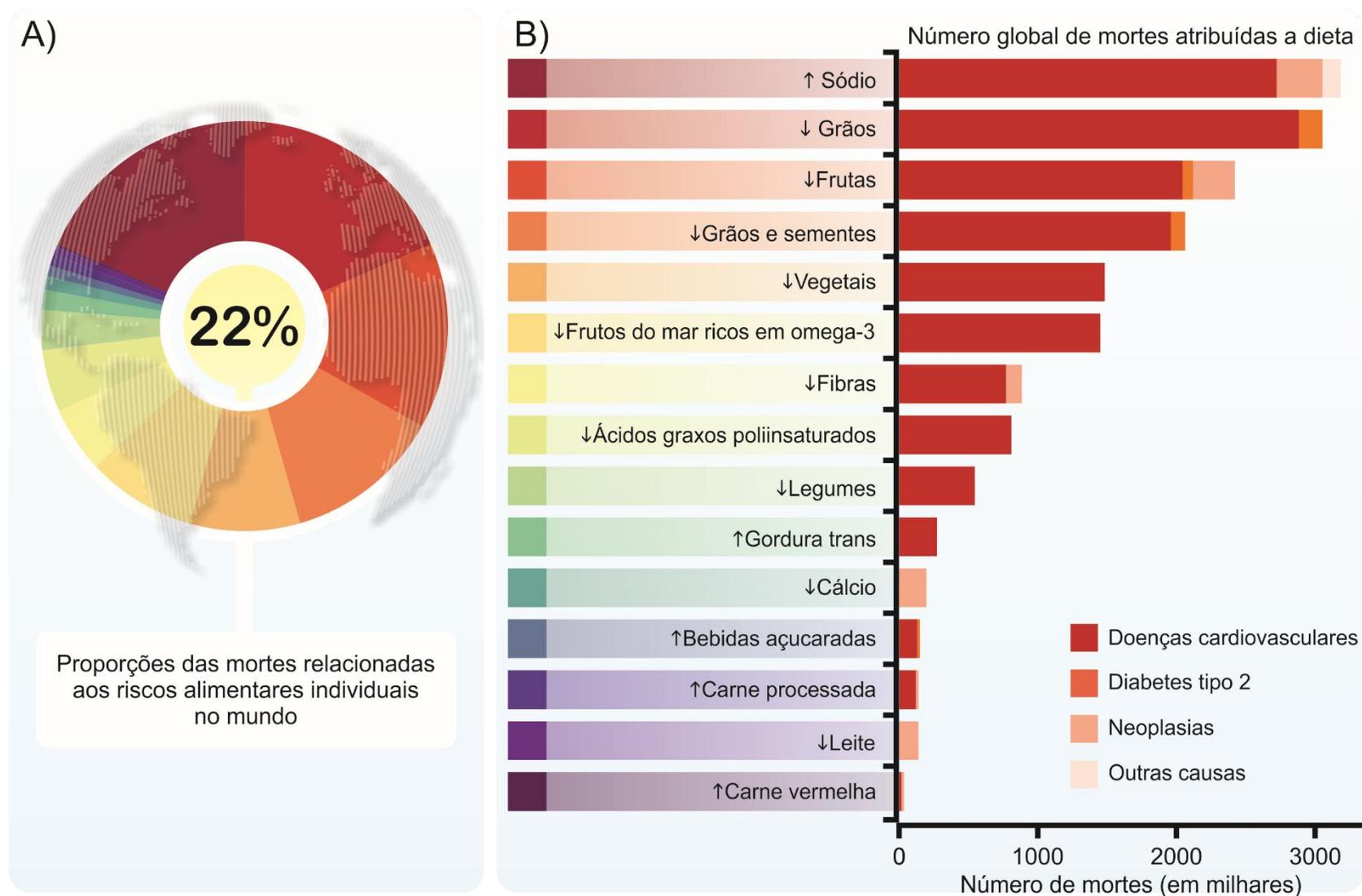


Figura 14. Proporção de mortes relacionadas aos riscos dietéticos em razão do número total, ajustadas pela idade (A), e a especificação do número de morte por principais causas correspondentes aos riscos alimentares em nível global em 2017 (B). Adaptado de: Global Burden Disease, 2019.

A vista destas evidências, parte da resposta aos problemas de saúde parece estar em uma das necessidades humanas mais básicas, a alimentação; ou mais acuradamente, a ingestão dos componentes nutricionais essenciais ao equilíbrio homeostático.

De fato, as pesquisas com alimentos naturais, seja o seu consumo na forma integral ou pela suplementação com seus compostos isolados, têm apresentado resultados significativos no que se diz respeito à interação de seus princípios ativos com estruturas e sistemas do corpo humano, moléculas com efetivas ações anti-inflamatórias, antioxidantes ou anti ou pró-apoptóticas ^{85,86}. A exemplo, foi demonstrado que o consumo de altas quantidades de polifenóis presentes em alimentos como cerejas, chocolate, café, maçãs e olivas está relacionado com uma menor incidência de eventos cardiovasculares em um período de dez anos de avaliação ⁸⁷.

Os efeitos dos flavonoides (principais polifenóis avaliados na pesquisa anterior) sobre a aterosclerose estão vinculados à redução do estresse oxidativo, hiperlipidemia e inflamação, e à melhora da função endotelial, pressão arterial e o metabolismo de lipídeos ⁸⁸. Substâncias derivadas da romã também demonstram ser capazes de reduzir o estresse oxidativo, a agregação plaquetária e a absorção lipídica pelos macrófagos, e influenciar positivamente a função endotelial, regular a pressão arterial em estudo *in vivo* e *in vitro*; além de estarem envolvidas em dados de menor nível pressórico e atenuação da aterosclerose em estudos clínicos ⁸². Neste último exemplo, os efeitos vasoprotetores foram atribuídos principalmente aos elagitaninos, mais especificamente ao ácido elágico, em primeira instância aos flavonoides e as antocianinas.

1.4.1. O Ácido Elágico

O ácido elágico é um fitoquímico da ordem dos polifenóis, derivado de elagitaninos mais complexos, encontrado naturalmente em frutas, nozes, chás, vinhos e plantas medicinais ^{89,90}. Estruturalmente é representado como uma molécula altamente estável termodinamicamente (FIGURA 15), com quatro anéis representando o domínio lipofílico e quatro grupos fenólicos e dois grupos lactonas (que podem atuar como doadores e receptores de ligação de hidrogênio, respectivamente) representando a parte hidrofílica ⁹¹.



Figura 15. Fórmula estrutural do ácido elágico. Em destaque estão os grupos fenólicos (fundo amarelo) e lactonas (fundo azul).

Os elagitaninos possuem uma ampla diversidade estrutural na natureza, e por serem compostos complexos, quando ingeridos, sofrem prontamente reações químicas, em que, da hidrólise de seu arcabouço, derivam outra gama de estruturas as quais efetivamente são responsáveis por seus benefícios à saúde ^{89,92}. Já a hidrólise de suas ligações de ésteres ocorrem de forma relativamente lenta, o que permite uma absorção gastrointestinal de ácido elágico prolongada ⁸⁶. No trato gastrointestinal, o ácido elágico livre é convertido em glucuronídeo de ácido elágico dimetilado, que é então metabolizado pela microbiota do cólon em urolitina A e B (principais produtos da biotransformação dos elagitaninos) (FIGURA 16); e uma vez incorporados à circulação entero-hepática, estes compostos ativos, dentre muitos aspectos, podem atuar como análogos hormonais ^{93,94}.

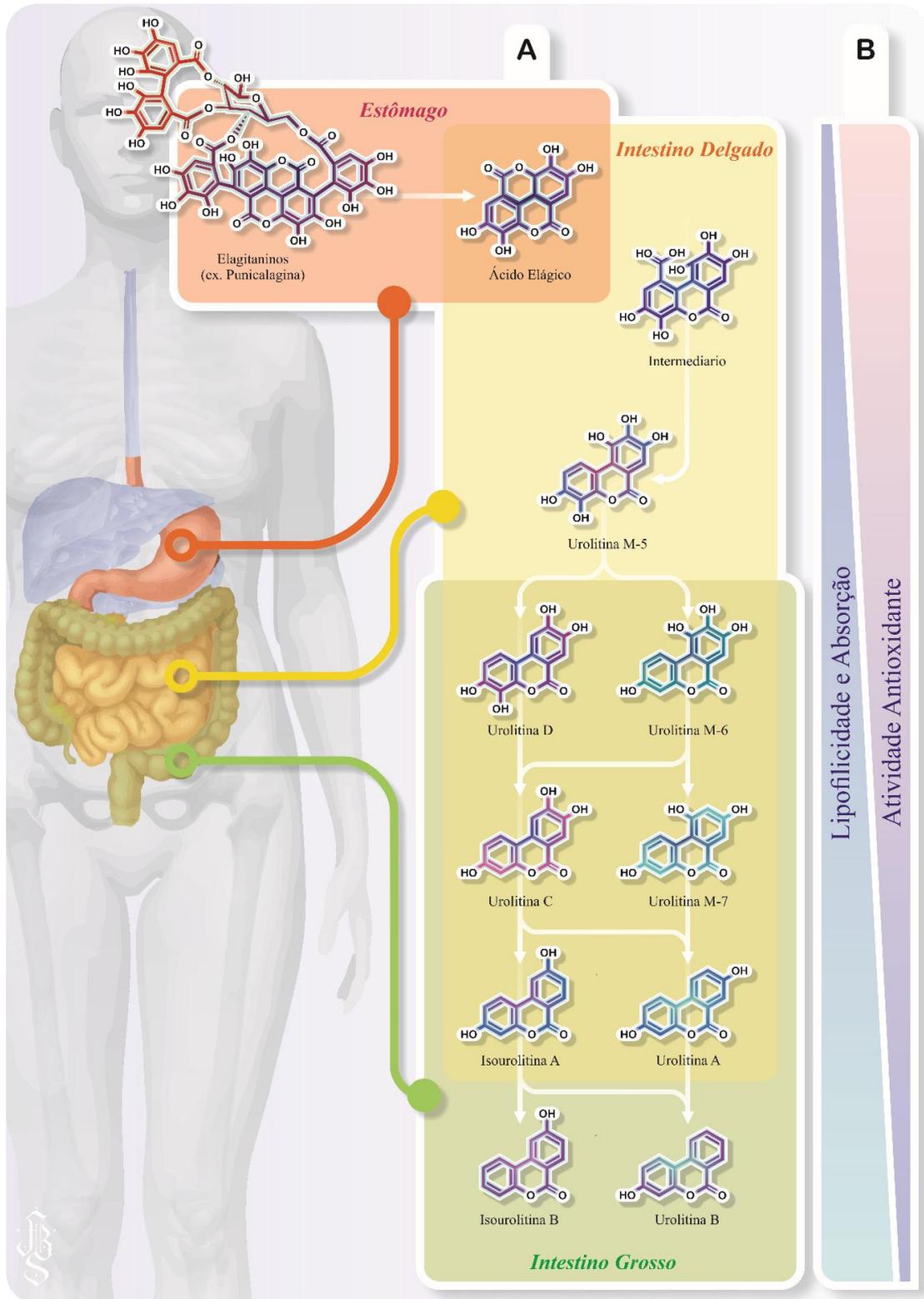


Figura 16. Biotransformação do ácido elágico (A) e perfil de absorção e atividade antioxidante (B). Adaptado de: Landete, 2011; Espín et al., 2013; Lipińska, Klewicka e Sójka, 2014.

O consumo de alimentos ricos em ácido elágico ou elagitaninos tem sido associado a inúmeros benefícios à saúde em estudos experimentais e clínicos, sendo caracterizado como compostos bioativos nutraceuticos ⁹⁴. Atividade antioxidante, antibiótica, anti-inflamatória e antitumoral são exemplos reportados à estes compostos, além de evidências benéficas na prevenção da obesidade, doenças neurodegenerativas, câncer e DCV ⁹⁵⁻⁹⁷.

O sistema cardiovascular em interação com os elagitaninos se beneficia principalmente por seus efeitos antioxidantes, onde evidências apontam uma proteção contra partículas oxidadas de lipoproteínas ⁹⁸⁻¹⁰⁰ e a oxidação dos lipídeos de membrana ¹⁰¹⁻¹⁰³; e, ainda, como um inibidor das EROs ^{92,104}. Também, e não menos importante, o ácido elágico tem se mostrado um modulador das respostas celulares dos vasos, como melhora incisiva nos parâmetros de coagulação ^{82,105}, resposta inflamatória ^{106,107} e performance vasomotora ^{108,109}. No entanto, os mecanismos envolvidos nestes efeitos ainda não foram exauridos por pesquisas. Exatamente por se tratar de um composto dietético, muitos questionamentos envolvendo a mensuração de sua biotransformação, absorção, distribuição e concentração nos tecidos alvos deixam lacunas a serem preenchidas com relação se seus efeitos biológicos ocorrem de maneira direta ou indireta. Com isso, justifica-se a necessidade de um incremento das atuais evidências e um aprofundamento das bases biomoleculares de seus resultados.

Neste sentido, a maioria dos trabalhos *in vivo*, descritos até o presente momento, se debruçam sobre experimentos em espécimes machos, e muitos são voltados para as áreas da oncogênese, distúrbios metabólicos e processos inflamatórios ^{89,110}. No entanto, mesmo que o interesse sobre os efeitos cardiovasculares dos elagitaninos seja pertinente, poucos são os experimentos voltados para este sistema e tão pouco são os que incluem as fêmeas ⁸⁶.

Portanto, mediante todo o exposto, esta pesquisa se dispôs a investigar os efeitos do ácido elágico sobre a vasomotricidade dependente do endotélio, em vasos de resistência, num modelo de privação estrogênica de ratas espontaneamente hipertensas (SHR).

2. HIPÓTESE

Embora o interesse por pesquisas correlacionando os hábitos alimentares e as doenças crônicas não transmissíveis seja amplamente difundido, e as investigações dos efeitos biológicos de seus compostos nutricionais sejam temas cada vez mais emergentes, há um consenso de que muitas lacunas ainda se encontram em aberto.

Grande parte do real impacto do uso de determinados nutrientes sobre os dados estatísticos de saúde não foram totalmente apurados e os mecanismos moleculares das diferentes substâncias bioativas não são totalmente compreendidos. Ainda, à medida que a expectativa de vida populacional aumenta, as discrepâncias de gênero, idade e sexo também são destacadas como variáveis importantes para uma discussão mais acurada dos dados.

É bem estabelecido que homens e mulheres têm suas particularidades na fisiologia dos sistemas orgânicos e na fisiopatologia dos mesmos, sobretudo no que se diz respeito ao sistema cardiovascular. E como descrito anteriormente, também são inúmeros os fitocomponentes dietéticos que tem demonstrado efeitos promissores, dentre os quais queremos destacar o ácido elágico. No entanto, a quantificação de seu real valor à saúde é um tema a ser lapidado e incluso nesta discussão.

Com isso, a hipótese é de que o tratamento com o ácido elágico seja capaz de proteger o leito vascular dos danos causados pela hipertensão, em associação a deficiência estrogênica, pela manutenção da função endotelial.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com ácido elágico sobre a reatividade vascular dependente do endotélio de artérias de resistência em ratas espontaneamente hipertensas (SHR).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento com ácido elágico sobre:

- a) Os dados hemodinâmicos de pressão arterial e frequência cardíaca;
- b) A reatividade vascular dependente do endotélio e a modulação endotelial do NO;
- c) Os parâmetros antioxidantes, pela expressão das enzimas superóxido dismutase mitocondrial e Catalase;
- d) A disfunção endotelial, pela expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial e seu quociente fosforilado;
- e) Os níveis de produção de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no leito vascular mesentérico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização desta pesquisa, foram solicitados ao biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) ratos SHR, fêmeas, com dez semanas de vida e peso corporal entre 120 e 140 gramas. Os animais foram separados aleatoriamente em cinco grupos de oito indivíduos e identificados de acordo com os tratamentos:

1. Ratas tratadas com veículo (carboximetilcelulose), usadas como controle (SHAM);
2. Ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (OVX);
3. Ratas ovariectomizadas e tratadas com ácido elágico (OAE);
4. Ratas ovariectomizadas e tratadas com 17- β estradiol (OE2);
5. Ratas ovariectomizadas e tratadas com ácido elágico e 17- β estradiol (OAE+E2).

Os tratamentos tiveram duração de quatro semanas.

Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas (4/1) sob condições de temperatura (22-24°C), umidade (40-60%) e luminosidade (12 h claro e 12 h escuro) controlados; bem como lhes foi possibilitado livre acesso a água e ração (Labina[®], Purina do Brasil).

Esta pesquisa foi realizada pelo Laboratório de Regulação Neuro-Humoral da Circulação, sob registro nº 56/2016 do Conselho de Ética em Pesquisa com Animais do Centro biomédico da UFES, e seus experimentos foram conduzidos conforme o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, seguindo as normas do manual de biossegurança. As eutanásias foram feitas por meio de guilhotina e os animais foram descartados apropriadamente em freezers instalados no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

4.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O fluxo cronológico dos protocolos experimentais contou com quatro semanas de tratamento, período compreendido entre sete dias após a ovariectomia até a eutanásia dos

animais. A síntese dos eventos prévios e subsequentes está representada na figura 17. Após, segue-se o detalhamento técnico dos mesmos.

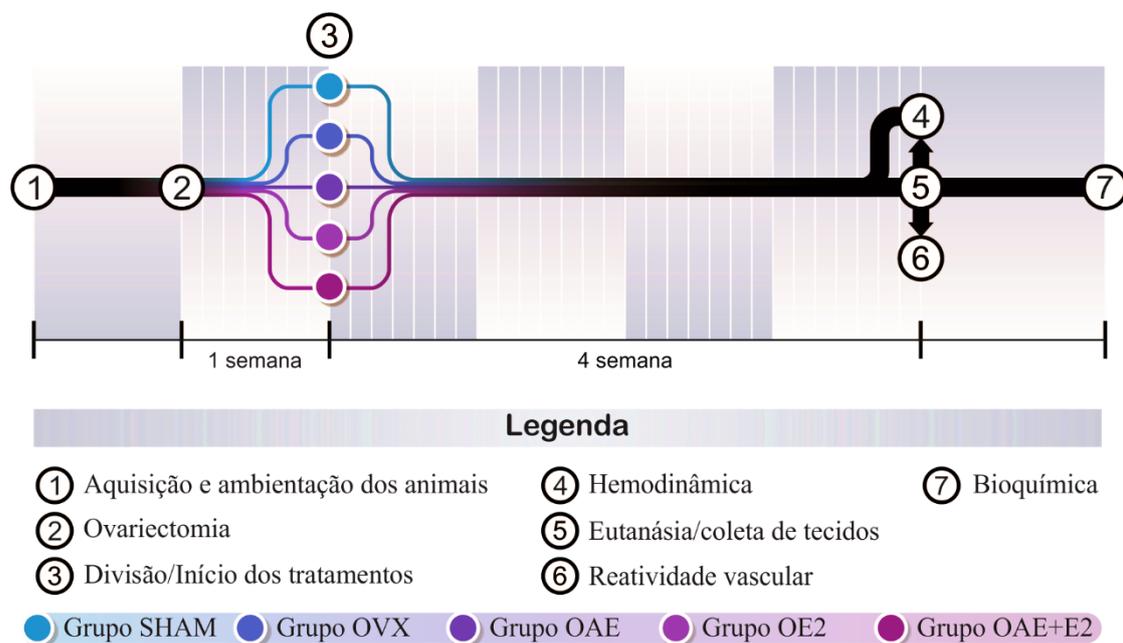


Figura 17. Fluxograma dos protocolos experimentais

4.2.1. Ovariectomia

O procedimento de ovariectomia performou a técnica descrita por Hernández et al.¹¹¹, em que os animais foram anestesiados e sedados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) e, logo após, incisões sequencias sobre a pele e o músculo, de aproximadamente 1 a 1,5 cm, foram feitas na região intermédia entre o rebordo costal e a coxa, para exposição da cavidade peritoneal. O ovário foi exteriorizado e extirpado e a trompa uterina foi laqueada com fio cirúrgico, seguindo a sutura dos tecidos cisionados. Estes procedimentos foram realizados bilateralmente em todos os animais, exceto no grupo SHAM, no qual os ovários foram preservados. As cirurgias ocorreram em dias intercalados para cada grupo e os tratamentos com a terapia antioxidante e reposição hormonal tiveram início após transcorrido sete dias da mesma.

Para a comprovação do sucesso das ovariectomias, ao término dos tratamentos e após a eutanásia, os úteros foram dissecados e secos em estufa (100 °C, por 24 horas) e então

pesados. Os resultados foram expressos pelo quociente aritmético mediante a correção do peso seco do útero pelo comprimento da tíbia:

$$\frac{\text{Peso (mg)}}{\text{Tíbia (mm)}} = \text{Peso corrigido (mg/mm)}$$

4.2.2. Tratamento com ácido elágico

O ácido elágico (Sigma-Aldrich, Brasil), apresentado na forma liofilizada ($\geq 95\%$) extraído da casca da romãzeira (*Punica granatum*), foi diluído em carboximetilcelulose, à proporção de 10 mg/mL. Para cada animal, foram administrados uma dose de 10 mg/kg/dia de AE, por sondagem gástrica, com volumes máximos não excedendo a 0,35 mL, durante 4 semanas¹¹² (com adaptações).

4.2.3. Terapia de reposição hormonal com estrogênio

Para a reposição hormonal, foi diluído 1mg de estradiol (Libbs Farmacêutica Ltda) em 5ml de carboximetilcelulose e administrado via sondagem gástrica uma dose de 1mg/kg/dia, durante quatro semanas¹¹³ (com adaptações).

4.2.4. Reatividade Vascular

4.2.4.1. Dissecção das artérias mesentéricas

Passado o período de tratamento, os animais foram decapitados com guilhotina e por meio de uma incisão no mediastino, à altura do abdômen, o leito mesentérico foi exposto e posto em uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4° C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11). Em seguida, os vasos foram dissecados e segmentos de terceira ramificação foram isolados e limpos de tecido adiposo antes de seguir para a avaliação da função vascular, segundo a técnica descrita por Dal-Ros et al.¹¹⁴. Secções vasculares transversais de aproximadamente dois mm de comprimento foram feitas com o auxílio de

um microscópio de dissecação. Em seguida, os anéis mesentéricos foram montados em um miógrafo segundo a técnica descrita por Mulvany & Halpern ¹¹⁵, em que dois fios de tungstênio (40 μm de diâmetro) são inseridos no lúmen das artérias e montados em um miógrafo para vasos de resistência, onde são realizados os estudos de tensão isométrica (*Danish Myo Tech*, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). A montagem segue com um dos fios sendo acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permite o estiramento das artérias. O miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema para aquisição (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) de dados e este a um computador (Figura 6). Durante todo esse processo as artérias foram mantidas em solução de Krebs (2,5 mmol de Ca^{2+}) e aeradas com carbogênio, a 37 °C. Uma vez acopladas ao sistema, as artérias foram deixadas em repouso por 30 minutos para estabilização antes de performar os experimentos de reatividade.

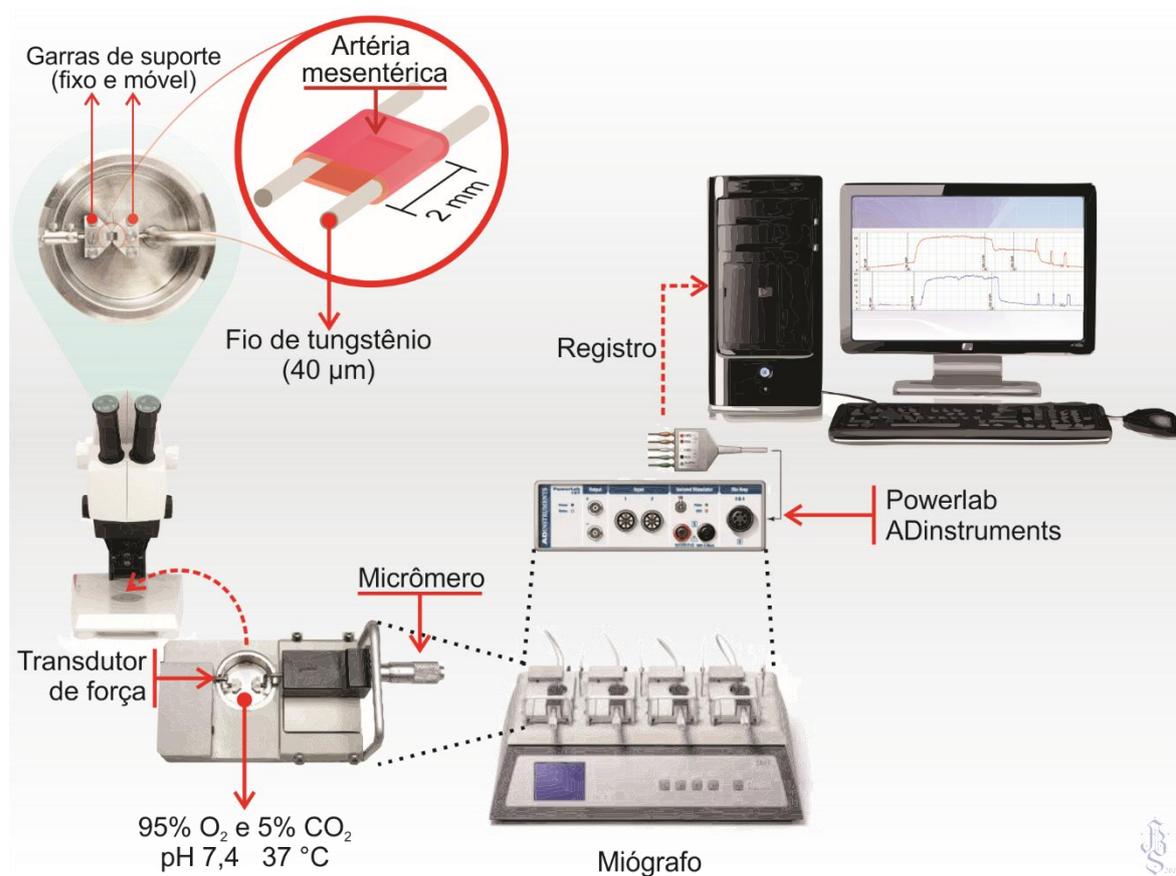


Figura 18. Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria mesentérica para a realização de estudos de reatividade vascular in vitro.

4.2.4.2. Avaliação da função vascular mesentérica

Para avaliar a reatividade vascular das artérias mesentéricas nos diferentes grupos experimentais, seguiu-se os protocolos:

- I. Avaliação da integridade funcional do endotélio: A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista dos receptores muscarínicos (ACh). Para tal, os anéis de artérias mesentéricas foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M (3 μ M). Uma vez atingido o platô, uma dose única de ACh, na concentração de 10^{-5} M (10 μ M), foi aplicada e observada a reação. Foram consideradas viáveis as amostras que apresentavam um relaxamento superior a 80% da resposta máxima de contração.
- II. Os anéis foram lavados quatro vezes com solução de Krebs e novamente seguiu-se 30 minutos de repouso.
- III. O registro da função vascular então de fato foi performedo mediante uma nova pré-contração com fenilefrina, seguindo desta vez a administração de concentrações cumulativas de ACh (1nM a 100 μ M) para a observação da curva concentração-resposta sobre o reflexo vascular.
- IV. Com objetivo de avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora da ACh, uma nova curva concentração-resposta à ACh (1 nM a 100 μ M) foi realizada após o uso de um inibidor inespecífico da NOS, N ω -nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, 300 μ M), adicionado à cuba 30 minutos antes.

4.2.5. Avaliações Hemodinâmicas

Após completo o ciclo de tratamento, os animais foram anestesiados com mistura de quetamina (70 mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, BRASIL) por via intraperitoneal e submetidos à cirurgia para cateterismo ventricular esquerdo como descrito anteriormente^{116,117}. A área de dissecação foi depilada à altura do pescoço e feita uma pequena incisão na pele para acesso a artéria carótida direita e introdução de um cateter de polietileno (PE 50) preenchido com salina e heparina no lúmen do vaso até a aorta, ascendendo ao ventrículo esquerdo. Um transdutor de pressão (TRI 21, Leticia Scientific Instruments, Espanha) conectado a extremidade livre do cateter transformava o

estímulo mecânico em estímulo elétrico. O estímulo era amplificado (Powerlab/4SP ML750, ADInstrument, Australia) e transmitido a um computador para processamento digital do registro de pressão. A frequência cardíaca (FC) foi obtida através do número de pulsos arteriais por minuto, além da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM).

4.2.6. Estudo da Expressão Proteica

4.2.6.1. Western blotting para detecção da expressão proteica

A técnica de *Western Blotting* foi utilizada para determinar a influência do tratamento com ácido elágico sobre a expressão de proteínas do sistema antioxidante enzimático e as frações inativas e fosforiladas da enzima óxido nítrico sintase. A expressão de todas as proteínas foi realizada em condição basal, ou seja, os tecidos arteriais foram coletados imediatamente após a eutanásia e conservados até o dia do experimento em freezer -80° C.

4.2.6.2. Extração e quantificação de proteínas e preparo das amostras

A homogeneização dos tecidos mesentéricos congelados foi realizada em tubos plásticos contendo tampão de lise (1% de Nonidet P40, 0,5% de Deoxicolato de Sódio, 0,1% de SDS, pH igual a 7,2). Por conseguinte, foi adicionado uma pílula composta por inibidores de proteases e EDTA (Sigma Fast, Sigma, EUA) para cada 10 mL de tampão de lise, Na₂VO₄ 1M e NaF 5M na proporção 1mL/100mg. As amostras foram centrifugadas por 40 segundos a uma velocidade de 6500 rpm, e em seguida centrifugados novamente durante 20 minutos a 14000 rpm, a 40° C (Eppendorff, Alemanha). O pellet formado foi descartado e a concentração proteica do sobrenadante foi então quantificada pelo método de Lowry¹¹⁸, utilizando-se espectrofotômetro com absorvância de 750 nm. Comparou-se a concentração proteica das amostras com uma curva de albumina sérica bovina (BSA), em concentrações conhecidas, utilizada como padrão. A leitura da curva e de todas as amostras foi feita em triplicata. Preparou-se alíquotas contendo o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, além do tampão de amostra (Lammeli 5X) (4 mL de Tris-HCl 1,5M pH 6.8, 10 mL de glicerol, 5 mL de β-mercaptoetanol, 2 g de SDS, 1mL de 1% azul de

bromofenol). Todas as alíquotas foram padronizadas para um volume final de 15 μ L completando o volume de cada uma com água Milli-Q, quando necessário. As amostras depois de preparadas foram aquecidas a 95° C durante cinco minutos.

4.2.6.3. Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida a 10% (gel de corrida: 0,5 M Tris HCl pH:6,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) e 10% (gel de entrada: 1,5 M Tris HCl pH: 8,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed). Após a preparação dos géis, os mesmos foram imersos em um tampão de corrida para eletroforese (25 mM de Tris HCl ,190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e foi realizado o carregamento com as amostras nos respectivos géis. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas para a separação das proteínas pelo peso molecular (PowerPac TM HC, BioRad, CA, EUA). Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno - PVDF (Merck Millipore, EUA) em um sistema de transferência molhado. Para isso, o gel, a membrana e o papel filtro foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução de tampão de transferência que foi mantida em aproximadamente 4° C durante todo processo de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, e Metanol 20%), com corrente constante de 100 V por 1:30 horas.

4.2.6.4. Incubação com anticorpos primários e secundários

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,6), com o objetivo de evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas pelo período de 4 horas à 4°C, sob agitação, em TBS-T adicionado com os anticorpos primários policlonal anti-rabbit para a isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase – SOD2 (Diluição 1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), monoclonal anti-mouse para a enzima catalase (Diluição 1:2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), monoclonal anti-rabbit para a eNOS (Diluição 1:2000, Santa Cruz *Biotechnology*, CA, EUA) e monoclonal anti-

rabbit para a p-eNOS (Diluição 1:2000, Santa Cruz *Biotechnology*, CA, EUA), proteína que foi utilizada como controle. Depois disso, as membranas foram lavadas três vezes, sob agitação, com solução TBS-T para remoção do excesso de anticorpo primário e possível ligação inespecífica. A solução de TBS-T foi trocada a cada 10 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação com os anticorpos secundários conjugadas a enzima fosfatase alcalina anti-mouse IgG (Diluição 1:3000, Abcam, *Cambridge*, MA, EUA), ou um anticorpo anti-rabbit IgG (Diluição 1:7000, Santa Cruz *Biotechnology*, CA, EUA).

4.2.6.5. Detecção das proteínas

A detecção das bandas das proteínas de interesse foi realizada por meio da adição de uma solução de nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (NBT/BCIP *system* – Invitrogen, CA, EUA). Para a quantificação da densidade das bandas foi utilizado o software ImageLab (BIO-RAD *Laboratories*, CA, EUA), e os resultados foram calculados utilizando a relação entre a densidade das proteínas de interesse corrigidas pela intensidade da proteína utilizada como controle (β -actina). Para os resultados da p-eNOS, a concentração foi representada pelo quociente aritmético em relação a concentração total da e-NOS.

4.2.7. Detecção “in situ” da produção vascular de ânion superóxido e óxido nítrico

4.2.7.1. Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo

Para verificar a influência do tratamento por quatro semanas com ácido elágico sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$, foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do corante fluorescente oxidativo dihidroetídeo (DHE). Este é um derivado do etídio que, quando em contato com $O_2^{\bullet-}$, é oxidado, transformando-se em brometo de etídio (2-E+OH) e, posteriormente, ligando-se ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha, viabilizando a inferência da produção “in situ” de radical superóxido¹¹⁹. Os segmentos de artéria mesentérica foram limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-HEPES (em

mM: 130.0, NaCl; 5.6, KCl; 2.0, CaCl₂; 0.24, MgCl₂; 8.3, HEPES; e 11.0, glicose, em pH 7,4) com sacarose 30%. Em seguida, os segmentos foram transferidos para um meio de inclusão (Tissue-Plus[®] OCT Compound) e armazenados a -80 °C até a análise. Secções transversais foram feitas nas artérias por meio de um aparelho de criostato (modelo e marca, país), formando anéis com 10 µm de espessura, os quais foram fixados em lâminas gelatinizadas. Estas lâminas foram mantidas em estufa a 37 °C, por uma hora, para retirada do meio de inclusão. Após este procedimento, os cortes fixados foram incubados com tampão Krebs-HEPES em idênticas condições por 30 min, a 37 °C. Após, tendo o excesso de solução vertido e seco das lâminas, deu-se a incubação com DHE (2µM) em câmara úmida e protegida da luz, à uma temperatura de 37 °C por 30 minutos. A captura das imagens das secções de artéria mesentérica foi feita em um microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) com câmera fotográfica (Leica DFC 310 FX, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) de filtro 568 nm acoplada. O software MetaMorph foi utilizado para quantificação dos pontos fluorescentes detectados nas imagens, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias), normalizado pela intensidade do background.

4.2.7.2. Detecção da produção de óxido nítrico

A disponibilidade local de NO foi determinada utilizando 4,5- diaminofluoresceína (DAF-2). Os procedimentos envolvidos desde a coleta das amostras arteriais até os cortes das mesmas, seguem igualmente as condições descritas no protocolo de DHE. Em sequência, as artérias mesentéricas foram incubadas com tampão fosfato (0,1 M) contendo CaCl₂ (0,45M) em estufa a 37 °C, por 30 minutos, para remoção do meio de inclusão. Em seguida, as lâminas foram secas e incubadas com DAF-2 (8 µM) diluído em solução tampão nas mesmas condições de tempo e temperatura. Imagens digitais foram coletadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500 com a objetiva de 40x e câmera Leica DFC 310 FX (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA), usando a mesma configuração de imagem para controle e grupo tratado com ácido elágico. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software MetaMorph

4.2.8. Determinação do percentual de participação estimada do óxido nítrico no relaxamento vascular

Para estimar a participação relativa do NO no relaxamento à ACh em cada grupo, foi feito um cálculo aritmético entre os valores médios da área sob a curva (ASC) e da resposta máxima ($E_{máx.}$) de relaxamento sem o inibidor (curva controle) e após a administração do inibidor L-NAME, sob a seguinte fórmula:

$$\Delta\%NO = \sum_{\bar{x}}^n \left(\frac{Curva\ controle - Curva\ L-NAME}{Curva\ controle} \right) \times 100$$

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises descritivas das diferenças entre os grupos foi utilizado ANOVA de 1 via, e para a detecção das diferenças entre os tratamentos, em relação a concentração-resposta de ACh, foi usada a ANOVA de 2 vias. Em ambos os testes, foi performedo o *post test* de Tukey para correção das múltiplas comparações. Já a análise das diferenças intergrupos, utilizou-se o teste t para dados pareados. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. DADOS PONDERAIS E HEMODINÂMICOS

Os dados ponderais de peso corporal e peso uterinos são demonstrados na tabela 3. Em relação ao peso corporal inicial, não foram detectadas diferenças entre os grupos. Contudo, ao final do período experimental, foi observado ganho de peso corporal em todos os grupos, de forma que a presença do estrogênio endógeno ou da reposição hormonal permitiu que este aumento fosse significativamente menor entre os grupos SHAM, OE2 e OAE+E2 em comparação aos grupos OVX e OAE ($p < 0,05$). Ainda assim, na análise do cálculo de ganho absoluto, estas diferenças permanecem apenas com uma ressalva para o grupo OAE+E2, que demonstrou manter um ganho absoluto menor em relação ao grupo OAE ($p < 0,05$).

Em relação ao peso uterino, foi observado que todos os animais castrados se diferem do grupo SHAM ($p < 0,05$). No entanto, os grupos OAE e OVX, como esperado, apresentaram uma diminuição significativa do peso do útero, numa proporção respectiva de 1,209 mg e 1,226 mg a menos, respectivamente, em comparação ao grupo SHAM ($p < 0,05$). O peso do útero dos grupos OE2 e OAE+E2 também se mostraram diferentes comparados ao grupo SHAM, contudo, numa menor proporção de 0,696 mg e 0,527 mg, respectivamente ($p < 0,05$). Contudo, a reposição estrogênica com E2 foi capaz de estabelecer diferença significantes no peso do útero dos animais tratados, em que os valores se encontravam maiores nos grupos OE2 e OAE+E2 em comparação com os grupos OVX e OAE ($p < 0,05$), comprovando que os efeitos tróficos do E2 sobre o útero destes animais estavam presentes.

Os dados hemodinâmicos de pressão arterial e frequência cardíaca também são expressos na tabela 3. Neles, ficam notórios que a terapêutica com o ácido elágico e/ou estrogênio foram capazes de preservar a pressão arterial das ratas castradas (grupos OAE, OE2 e OAE+E2), evidenciando valores de pressão sistólica, diastólica e pressão arterial média semelhantes aos grupos SHAM, após quatro semanas. Diferentemente, o grupo OVX expressou valores pressóricos significativamente maiores, cerca de 21,0 mmHg de pressão sistólica, 15,5 mmHg de pressão diastólica e 17,4 de pressão arterial média a mais em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$), deixando evidente uma influência pressórica referente à castração. Estes valores tornam-se mais discrepantes se comparadas aos demais grupos

castrados e tratados, os quais exibem valores significativamente menores que o grupo OVX ($p < 0,05$), numa ordem média de 24,1 mmHg de pressão sistólica, 23,2 mmHg de pressão diastólica e 26,4 mmHg de pressão arterial média a menos.

Já os dados sobre frequência cardíaca não apontam diferenças significativas nos índices dos grupos castrados, em relação ao grupo SHAM. O que se constata é uma diferença entre os grupos OE2 e OVX, com uma interferência cronotrópica negativa da reposição hormonal, reduzindo os números de batimentos médios no grupo OE2 ($p < 0,05$).

		SHAM (n=8)	OVX (n=8)	OAE (n=8)	OE2 (n=8)	OAE+E2 (n=8)
Peso Corporal	Inicial (g)	155,6 ± 1,5	155,6 ± 3,7	154,4 ± 5,6	152,8 ± 5,7	160,4 ± 5,4
	Final (g)	189,6 ± 1,5 α	215,0 ± 2,4 α^*	205,6 ± 2,8 α^*	192,8 ± 4,1 $\alpha\#\circ$	192,1 ± 2,8 $\alpha\#\circ$
	Δ absoluto (g)	34,0 ± 2,5	59,4 ± 4,2 *	51,4 ± 4,4 *	40,0 ± 5,4 #	31,7 ± 4,2 $\#\circ$
Peso Útero/Comprimento Tibial (mg/mm)		1,47 ± 0,07	0,38 ± 0,02 *	0,38 ± 0,01 *	1,12 ± 0,06 $*\#\circ$	0,96 ± 0,08 $*\#\circ$
Pressão Arterial	Sist. (mmHg)	197,6 ± 4,6	218,6 ± 3,6 *	195,8 ± 1,7 #	195,4 ± 2,1 #	194,7 ± 1,7 #
	Diast. (mmHg)	150,0 ± 5,1	165,5 ± 5,0 *	140,6 ± 5,0 #	142,6 ± 2,7 #	137,3 ± 1,0 #
	PAM (mmHg)	173,0 ± 4,8	190,4 ± 4,4 *	165,7 ± 1,4 #	166,9 ± 2,4 #	163,5 ± 1,5 #
Frequência Cardíaca (bpm)		394,0 ± 16,0	408,4 ± 19,2	363,8 ± 12,4	343,8 ± 8,9 #	372,6 ± 4,4

Tabela 3. Dados ponderais do peso corporal e uterino e medidas da pressão arterial e frequência cardíaca dos diferentes grupos.

α comparado ao peso inicial; * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX; \circ comparado ao OAE; \bullet comparado ao OE2. Para análise das diferenças entre os grupos: ANOVA 1 vias, *post test* Tukey, $p < 0,05$. Para análise da diferença temporal nos pesos: Teste t pareado, $p < 0,05$.

5.2. REATIVIDADE VASCULAR

Os resultados das curvas de concentração-resposta à ACh deixam evidentes um relaxamento dependente do endotélio significativamente menor no grupo OVX, quando comparado aos demais grupos nos pontos centrais da curva (ACh 10^{-8} a 10^{-7} M) ($p < 0,05$), refletindo uma possível disfunção endotelial, induzida pela deficiência dos hormônios ovarianos. Entretanto, os tratamentos realizados nos grupos ovariectomizados (OAE, OE2 e OAE+E2), foram capazes de prevenir essa resposta, sendo significativamente maior quando comparados ao OVX, nos mesmos pontos da curva ($p < 0,05$), mostrando que o ácido elágico e/ou estrogênio foram capazes de preservar a função endotelial nesses animais após a ovariectomia, não se diferenciando do grupo SHAM ($p > 0,05$). O grupo OAE+E2 teve um relaxamento significativamente maior na concentração de ACh $10^{-8,5}$ M, em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), mas em seguida torna a parrear-se aos grupos SHAM, OAE e OE2 nas concentrações seguintes (FIGURA 19).

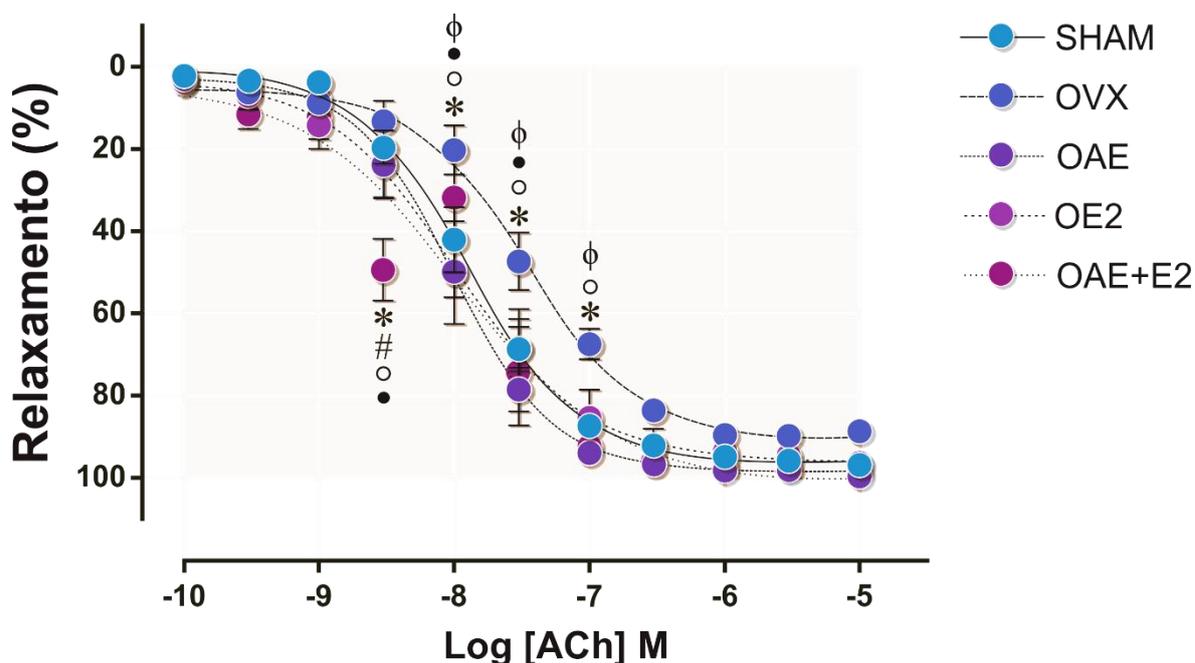


Figura 19. Análise da curva de relaxamento à acetilcolina entre os diferentes grupos. * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX; o comparado ao OAE; • comparado ao OE2; φ comparado ao OAE+E2. ANOVA 2 vias, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

5.2.1. Reatividade vascular após bloqueio com L-NAME

A dinâmica das curvas de relaxamento à ACh, antes e depois da inibição com L-NAME, pode ser melhor visualizada na figura 20. Os grupos SHAM (A), OAE (C) e OE2 (D) começaram a apresentar diferenças significativas na curva de relaxamento com L-NAME, em relação à curva controle, a partir da concentração de ACh 10^{-8} M ($p < 0,05$); ao passo que no grupo OVX (B) essa diferença só passa ser observada na concentração seguinte (ACh $10^{-7,5}$ M, $p < 0,05$) e no grupo OAE+E2 (E) na concentração anterior (ACh $10^{-8,5}$ M, $p < 0,05$). Estes dados evidenciam que tanto a ovariectomia como os tratamentos influenciaram na suscetibilidade aos efeitos da ACh nos tecidos isolados, necessária para desencadeamento da resposta vasomotora; seja na preservação, na antecipação ou no retardo do tempo de concentração-resposta dos mesmos.

Deste ponto em diante, a distinção no perfil sigmoidal das curvas com L-NAME progrediu entre os grupos, resguardando igualmente suas diferenças características das respectivas curvas controle. O grupo SHAM sustentou um deslocamento significativo para a direita da curva até a concentração de ACh $10^{-6,5}$ M ($p < 0,05$), igualando-se, em seguida, aos valores de sua curva controle, deixando uma diferença significativa entre a ASC ($p < 0,05$), sem alterar os a $E_{máx.}$ ($p > 0,05$). Isso deixa transparecer uma dependência parcial do NO na totalidade do relaxamento dependente do endotélio, neste grupo.

Já nos grupos OVX, OAE e OE2, as curvas de L-NAME mantêm diferenças significantes entre as curvas controle até a concentração final de ACh ($p < 0,05$), imprimindo uma menor razão na ASC ($p < 0,05$) e um prejuízo na $E_{máx.}$ ($p < 0,05$); o que evidencia uma maior dependência do NO nos efeitos globais e na magnitude da resposta vasodilatadora nestes grupos.

Diferencialmente, o grupo OAE+E2, além de ter demonstrado um relaxamento inicial à uma concentração menor de ACh, sua curva de inibição com L-NAME acaba exibindo essa diferença da curva controle também à uma concentração anterior aos demais grupos (ACh $10^{-8,5}$ M à ACh 10^{-7} M, $p < 0,05$); além de significativamente registrarem uma menor ASC ($p < 0,05$) e uma menor $E_{máx.}$ ($p < 0,05$) em relação à sua curva controle. Assim como no grupo SHAM, o grupo OAE+E2 transparece uma menor dependência do NO sobre o efeito total de relaxamento à ACh, mas ao mesmo tempo, em relação à curva controle,

expõe uma dependência relativa na magnitude de sua resposta, frente a concentração máxima da ACh.

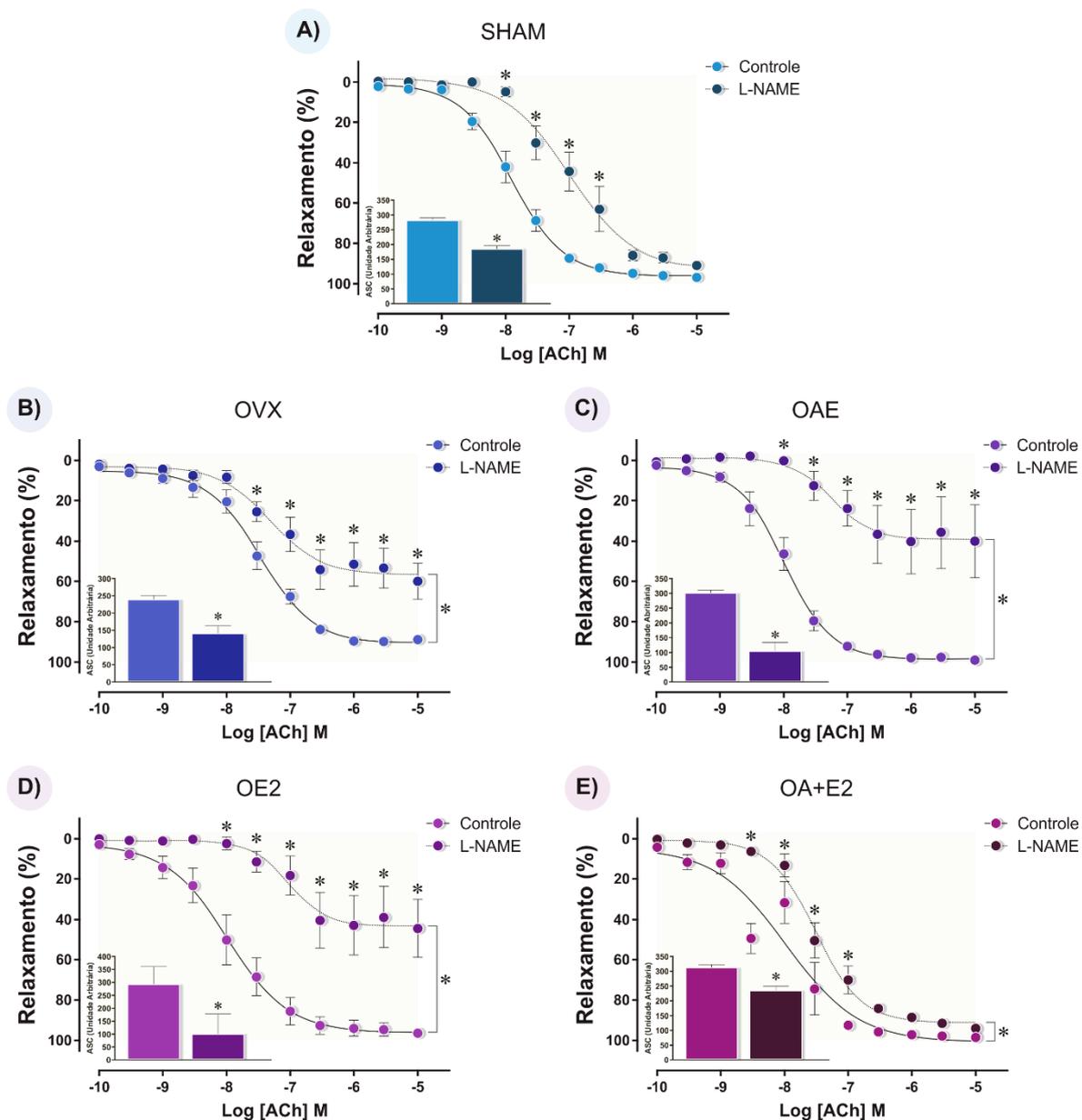


Figura 20. Curva de relaxamento ante e depois da inibição com o inibidor $N\omega$ -nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) nos diferentes grupos. * comparado a curva controle. Para análise entre as curvas: ANOVA 2 Vias, *post test* de Tukey, $p < 0,05$. Para análise da área sob a curva (ASC – canto inferior esquerdo de cada imagem) e resposta máxima (colchete entre as curvas): teste t pareado, $p < 0,05$.

A dissecção dos resultados da curva de relaxamento fomenta dados interessantes sobre as particularidades de cada grupo, com um destaque para a participação do ácido elágico

(TABELA 4). A análise da ASC nos grupos OVX, OAE, OE2 e OAE+E2 não se diferenciaram do grupo SHAM ($p > 0,05$), evidenciando que, independente do protocolo experimental, os resultados sobre a biodisponibilidade dos mediadores endoteliais foram efetivos para o delineamento da área total de relaxamento, em particular, para cada curva. Porém, os grupos OAE e OAE+E2 sinalizam por meio de sua ASC que o tratamento com ácido elárgico, além de ter sido capaz de preservar o efeito total da ACh, o fez de uma maneira significativamente maior do que o grupo OVX ($p < 0,05$), enquanto este não se difere dos grupos SHAM e OE2 ($p > 0,05$).

O mesmo comportamento também foi observado entre os grupos, no tocante aos dados de $E_{máx.}$ no relaxamento à ACh. Os grupos OAE, OE2 e OAE+E2 não se distinguiram do grupo SHAM ($p > 0,05$) e novamente os grupos OAE e OAE+E2 o fizeram em maior proporção ao grupo OVX ($p < 0,05$). Com isso, também se evidencia uma resposta mais efetiva sobre o relaxamento dependente do endotélio nos grupos tratados como ácido elárgico após a ovariectomia.

Quanto a análise da sensibilidade à ACh (LogEC_{50} [ACh]), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$), dando evidências de que a potência da resposta vasodilatadora à ACh não se altera independente do tratamento.

A tabela 4 também traça uma análise entre as curvas de relaxamento na presença de um inibidor inespecífico da NOS (L-NAME). Nos dados de ASC, encontrou-se que todos os grupos exibiram mudanças da resposta vasodilatadora em relação à suas respectivas referências basais (curva controle), com redução significativa das mesmas sob influência do L-NAME ($p < 0,05$). Este dado deixa nítido haver uma parcela importante de contribuição do NO na caracterização da biodisponibilidade total dos mediadores endoteliais em cada grupo, e ela pode ser melhor pontuada na comparação dos dados da curva de inibição entre os grupos. Neste sentido, o grupo OVX não se distinguiu do grupo SHAM ($p > 0,05$), o que se entende por uma contribuição equivalente do NO no delineamento da área total de efeito da ACh. Por outro lado, ficou evidente que nos grupos OAE e OE2 a inibição com L-NAME projetou uma ASC significativamente menor do que o grupo SHAM ($p < 0,05$); ou seja, nos grupos tratados exclusivamente com ácido elárgico ou estrogênio, a resposta vasodilatadora à ACh demonstrou ter uma maior dependência do NO na concepção total da ASC após ovariectomia. Todavia, na interação dos tratamentos, observa-se dados peculiares no grupo OAE+E2, em que este não apresentou uma ASC

diferente do grupo SHAM ($p > 0,05$), ao mesmo tempo que se distingue dos demais grupos, exibindo uma ASC significativamente maior (OVX, OAE e OE2, $p < 0,05$); com isso, depreende-se que a via de manutenção da vasodilatação pós ovariectomia, neste grupo, reflete uma menor dependência do NO.

Nos dados de $E_{m\acute{a}x}$, as informações projetadas sob influência do L-NAME revelam que os grupos OVX, OAE e OAE+E2 tiveram uma redução percentual significativa no relaxamento máximo à ACh, em proporção aos seus respectivos dados da curva controle ($p < 0,05$), enquanto o grupo SHAM manteve-se constante ($p > 0,05$). Tal observação, mostra que a eficácia da resposta à ACh nos animais castrados guarda relação de dependência do NO. Com isso, na análise entre grupos, diferenças percentuais, em comparação ao SHAM, foram significativamente menores nos grupos OVX, OAE, OE2 ($p < 0,05$), o que deixa transparecer nestes grupos a importância do NO na consumação dos efeitos de relaxamento à ACh após ovariectomia. Neste ponto, somente o grupo OAE+E2 apresentou valores semelhantes ao grupo SHAM ($p > 0,05$), mas, tal qual na ASC, também expressou uma $E_{m\acute{a}x}$ significativamente maior do que os grupos OVX, OAE e OE2 ($p < 0,05$); o que reforça a evidência de que o tratamento concomitante de ácido elágico e E2 evoca outras vias dependentes do endotélio nos animais ovariectomizados.

Quanto aos dados de LogEC_{50} [ACh] nas curvas com o inibidor L-NAME, apenas o grupo SHAM e os grupos tratados com ácido elágico (OAE e OAE+E2) apresentaram uma queda significativa dos valores absolutos em relação à curva controle ($p < 0,05$), deduzindo que nestes grupos, a sensibilidade à ação vasodilatadora da ACh, na parcela total dependente de NO, foi prejudicada pela inibição. Não obstante, diferenças significativas não foram detectadas na comparação dos resultados entre os grupos nas curvas controle e com L-NAME ($p > 0,05$), destacando que, embora haja algumas diferenças relacionadas ao NO entre as curvas de alguns grupos, de forma geral, a potência dos efeitos vasodilatadores induzidos pela ACh, não se diferem e indiretamente expõe uma plasticidade na manutenção desta resposta de forma particular entre os grupos.

		SHAM (n=8)	OVX (n=8)	OAE (n=8)	OE2 (n=8)	OAE+E2 (n=8)
ASC (UA)	Controle	280,7 ± 9,3	238,2 ± 13,5	300,3 ± 11,1 #	291,9 ± 24,6	311,4 ± 11,6 #
	L-NAME	184,0 ± 12,3 α	139,9 ± 22,9 α	103,4 ± 31,4 α*	98,7 ± 28,1 α*	233,9 ± 15,3 α#○●
E_{máx.} (%)	Controle	97,3 ± 0,5	97,3 ± 0,5	99,9 ± 1,0 #	97,3 ± 3,1	99,7 ± 1,0 #
	L-NAME	95,4 ± 3,8	61,2 ± 9,8 α*	47,6 ± 17,2 α*	52,2 ± 14,2 α*	93,7 ± 1,7 α#○●
LogEC50 [ACh] (M)	Controle	7,9 ± 0,1	7,5 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2
	L-NAME	7,0 ± 0,2 α	7,4 ± 0,4	7,2 ± 0,3 α	6,8 ± 0,7	7,5 ± 0,1 α

Tabela 4. Análise da área sob a curva (ASC), resposta máxima (E_{máx.}) e sensibilidade à acetilcolina (LogEC50 [ACh]) antes e depois do inibidor Nω-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME).

α comparado à curva controle; * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX; ○ comparado ao OAE; ● comparado ao OE2. Para análise entre os grupos: ANOVA de 1 via *pós-teste* de Tukey, p <0,05. Para a análise entre as curvas controle e L-NAME intragrupo: Teste t pareado, p <0,05.

5.2.2. Participação relativa do óxido nítrico no relaxamento dependente do endotélio

A estimativa percentual da contribuição do NO na resposta de relaxamento, refletida na quantificação total de sua biodisponibilidade e eficácia de seu efeito, expressos nos padrões da ASC e $E_{m\acute{a}x.}$, respectivamente, encontram-se representada na figura 20.

Os dados computados na ASC (FIGURA 21-A) manifestam que, de uma forma geral, a biodisponibilidade do NO presente nos diferentes grupos contribuiu igualmente para o relaxamento total evocado pela ACh, na ordem média de $40,4 \pm 9,1\%$ (OVX, $p > 0,05$), $64,1 \pm 11,1\%$ (OAE, $p > 0,05$), $64,3 \pm 10,5\%$ (OE2, $p > 0,05$) e $25,4 \pm 2,8\%$ (OAE+E2, $p > 0,05$) em relação ao grupo SHAM ($34,2 \pm 4,4\%$). Somente o grupo OAE+E2 apresentou um percentual significativamente menor que os grupos OAE e OE2 ($p < 0,05$), evidenciando que no tratamento conjugado a participação do NO não foi tão importante como para os grupos tratados exclusivamente com ácido elágico ou estrogênio.

Em contrapartida, os dados sobre a eficácia da $E_{m\acute{a}x.}$ à ACh (FIGURA 21-B) perfilaram nos grupos OVX e OAE+E2 um percentual de contribuição do NO semelhante ao grupo SHAM ($33,1 \pm 10,4\%$; $5,9 \pm 2,4\%$; $2,0 \pm 3,8\%$, respectivamente, $p > 0,05$). Contudo, nos grupos OAE e OE2 a diferença entre o percentual do vasodilatador NO na $E_{m\acute{a}x.}$ do grupo SHAM foi significativamente maior ($52,5 \pm 17,0\%$; $47,6 \pm 13,9\%$; $2,4 \pm 3,8\%$, respectivamente, $p < 0,05$), salientando que após a ovariectomia o ácido elágico, bem como o estrogênio, foram relevantes na consumação desta resposta. Por fim, o grupo OAE+E2 exibiu que em sua $E_{m\acute{a}x.}$ o percentual de contribuição do NO foi significativamente menor que no grupo OAE ($52,5 \pm 17,0\%$; $5,9 \pm 2,4\%$, respectivamente, $p < 0,05$). Deste modo, mais uma evidência se levanta de que entre os animais do grupo OAE a participação do NO tem uma relevância primordial, enquanto no grupo OAE+E2 esta não parece ser a principal via endotelial de relaxamento.

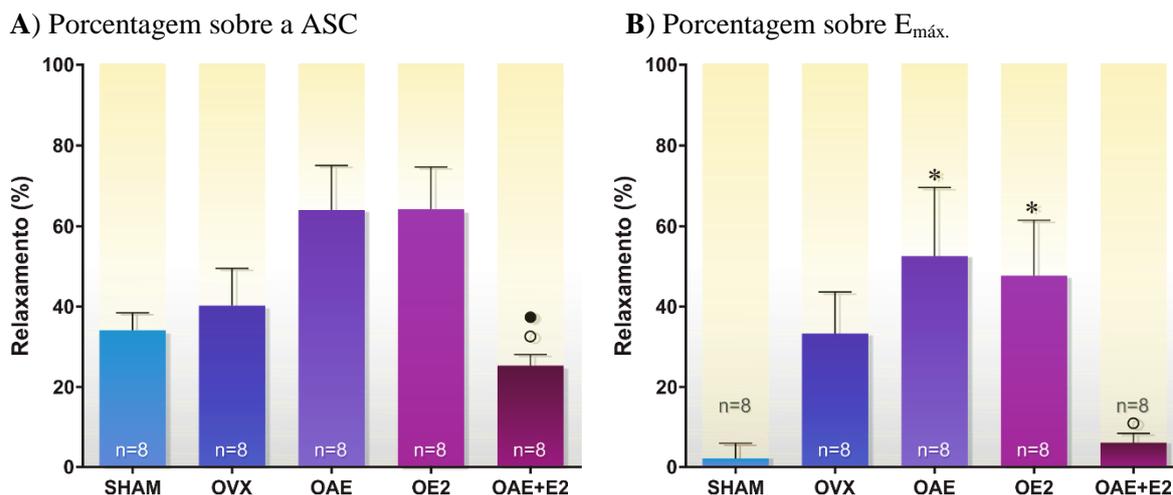


Figura 21. Percentual estimado da contribuição do óxido nítrico no relaxamento vascular nos diferentes grupos, em relação a seu efeito sobre os dados de: **A)** área sob a curva (ASC) e **B)** resposta máxima ($E_{máx.}$). * comparado ao SHAM; o comparado ao OAE; • comparado ao OE2. ANOVA de 1 via, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

5.3. ANÁLISES DE FLUORESCÊNCIA “*IN SITU*”

5.3.1. Quantificação do Óxido Nítrico

A quantificação da produção *in situ* de NO foi realizada pela análise de fluorescência com diaminofluoresceína e os resultados demonstraram uma redução significativa no grupo OVX em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$), enquanto que os tratamentos nos demais grupos impediram que a ovariectomia fizesse o mesmo. Desta forma, o ácido elágico, assim como o estrogênio, se mostraram eficientes na manutenção da biodisponibilidade do NO nos leitos mesentéricos no modelo experimental de hipertensão e menopausa (FIGURA 22).

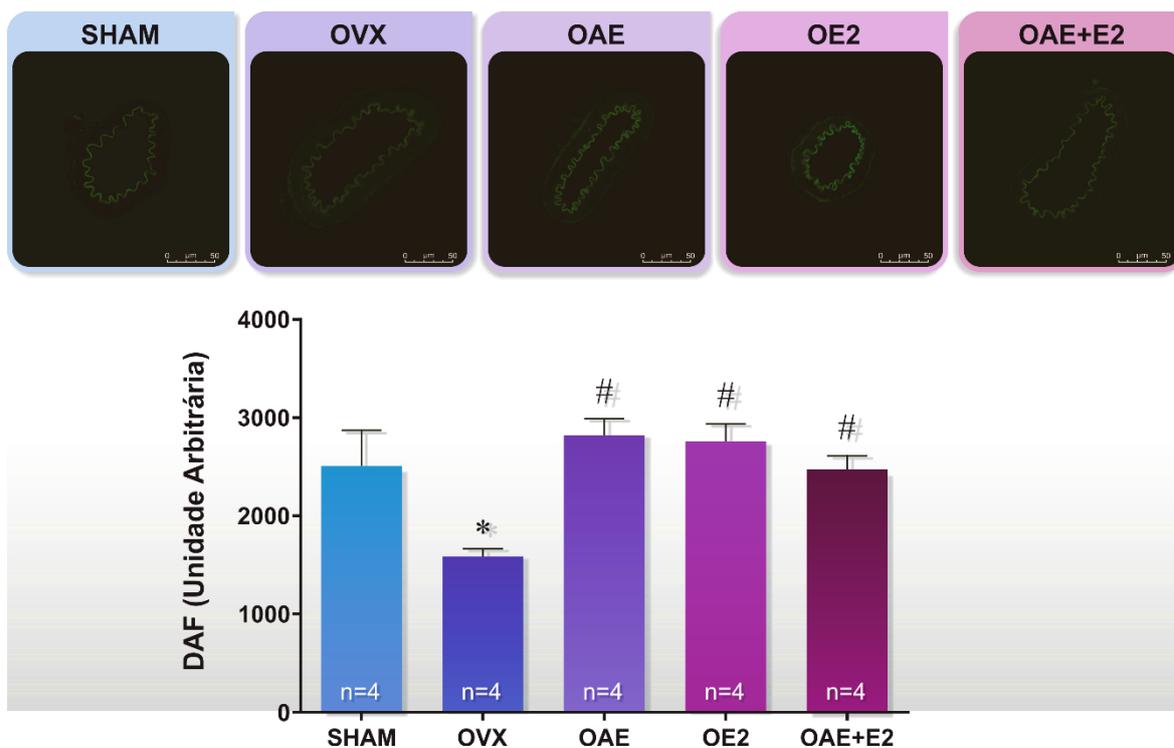


Figura 22. Determinação “*in situ*” do óxido nítrico em artérias mesentéricas de ratas SHR pelo método de fluorescência a 4,5-diaminofluoresceína (DAF). * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX. ANOVA de 1 via, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

5.3.2. Quantificação do Ânion Superóxido

Semelhantemente, foram avaliados os níveis de $O_2^{\bullet-}$ presente nos vasos, os quais deixaram evidentes que os tratamentos com ácido elágico e/ou estrogênio influenciaram significativamente no montante do ânion, de forma que estes não se diferenciaram do grupo SHAM, enquanto que no grupo OVX a fluorescência ao DHE foi significativamente maior do que no grupo SHAM e demais grupos ($p < 0,05$) (FIGURA 23). Desta forma, o ácido elágico, assim como o estrogênio, confirma atuar como um depurador das EROS nos vasos mesentéricos.

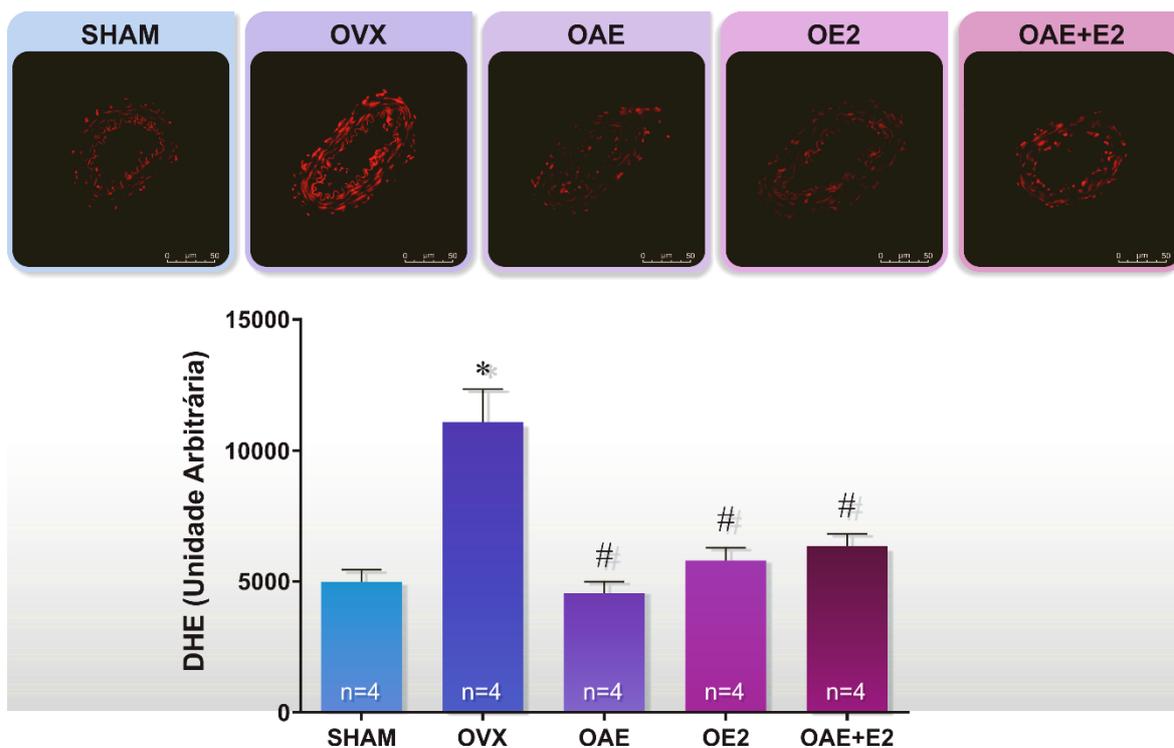


Figura 23. Determinação “*in situ*” da produção de ânion superóxido em artérias mesentéricas de ratas SHR ovariectomizadas, pelo método de fluorescência pela oxidação do dihidroetídeo (DHE). * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX. ANOVA de 1 via, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

5.4. WESTERN BLOTTING

5.4.1. Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial

Os dados de quantificação proteica da enzima eNOS, apresentados na figura 24, também transpareceram uma importante colaboração do ácido elágico na diferenciação dos valores expressos no grupo OAE em comparação com os grupos SHAM e OVX, em que neste a síntese enzimática foi significativamente maior do que em ambos ($0,49 \pm 0,07$; $0,16 \pm 0,03$; $0,23 \pm 0,07$, $p < 0,05$, respectivamente). Este fato ressalta que o ácido elágico foi relevante na manutenção das respostas fisiológicas após a ovariectomia. E isto é posto mais em evidência quando observado que no grupo OAE+E2 a expressão da eNOS é significativamente menor do que no grupo OAE ($0,13 \pm 0,06$; $0,49 \pm 0,07$, $p < 0,05$, respectivamente), enquanto que, de forma semelhante ao grupo OE2 ($0,26 \pm 0,07$), não se difere dos demais ($p > 0,05$).

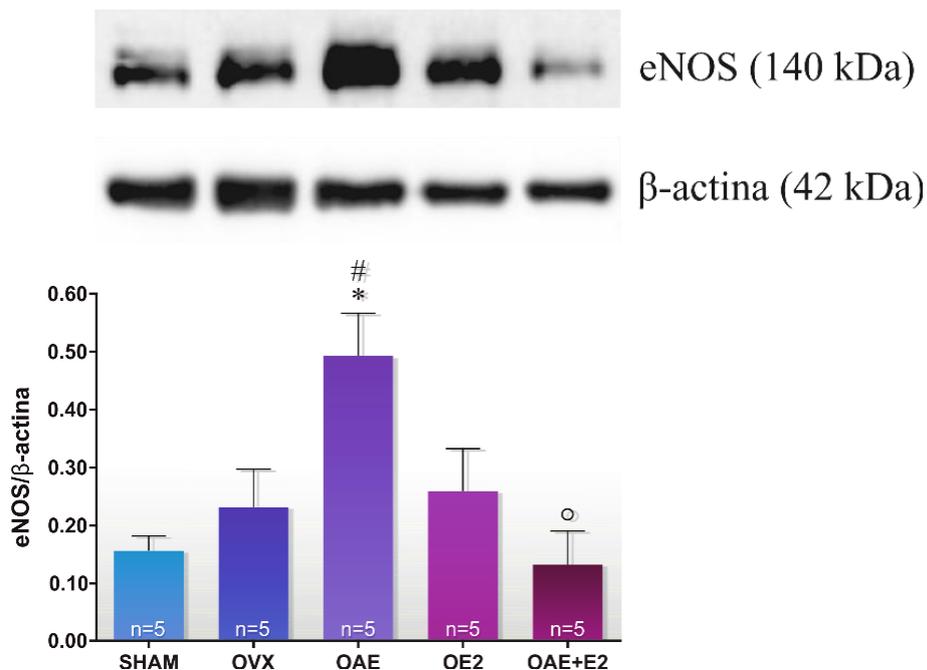


Figura 24. Expressão da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) (n=5). * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX; o comparado ao OAE. ANOVA de 1 via, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

5.4.2. Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial fosforilada no resíduo de Ser1177

A fração fosforilada na expressão da eNOS no resíduo de Ser1177 (p-eNOS), destacou interessantes resultados entre os grupos (FIGURA 25). Enquanto os grupos SHAM ($0,09 \pm 0,02$) e OVX ($0,06 \pm 0,03$) não exibiram diferenças entre si ($p > 0,05$), essa diferença se projetou significativamente maior no grupo OAE ($0,50 \pm 0,13$, $p < 0,05$, respectivamente), caracterizando que o ácido elágico foi decisivo para a manutenção da resposta enzimática, em relação aos animais controle, e na superação dos efeitos deletérios da supressão estrogênica, após ovariectomia. De outra forma, os dados do grupo OE2 ($0,44 \pm 0,09$) pontuaram não haver diferenças comparado ao grupo SHAM ($0,09 \pm 0,02$, $p > 0,05$), mas com uma diferença significativa entre o grupo OVX ($0,06 \pm 0,03$, $p < 0,05$), enquanto também não se diferiu dos grupos OAE e OAE+E2 ($0,50 \pm 0,13$; $0,21 \pm 0,09$, $p > 0,05$, respectivamente). Este apontamento ressalta os dados do tratamento exclusivo com ácido elágico, em evidência da performance do tratamento com estrogênio na evocação da atividade enzimática após ovariectomia; o que é igualmente reforçado pela constatação da

conformidade dos resultados apresentados pelo grupo OAE+E2 ($0,21 \pm 0,09$) em comparação aos demais grupos ($p > 0,05$).

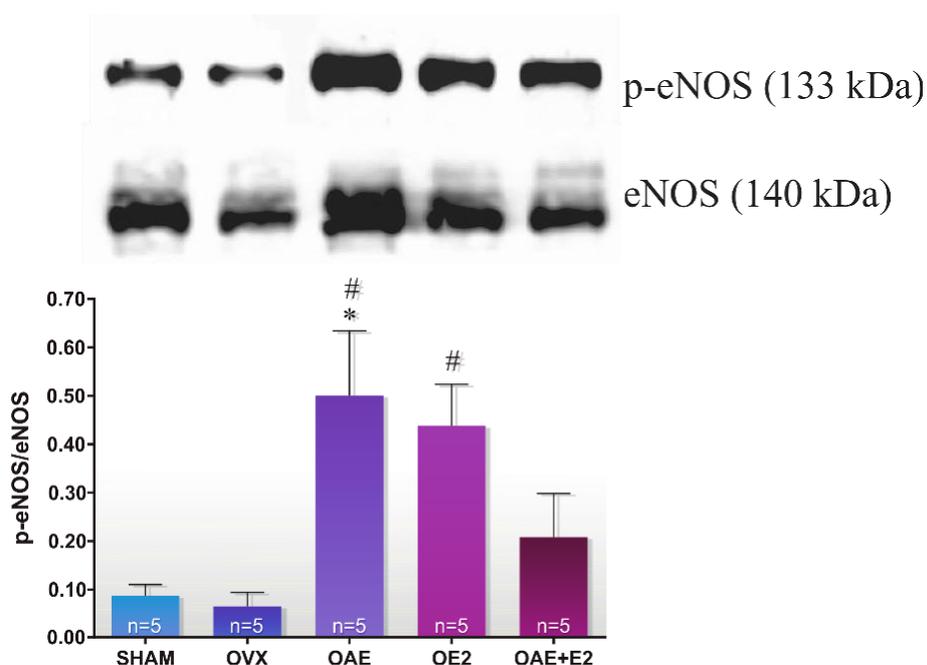


Figura 25. Expressão da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase fosforilada no resíduo de Ser1177 (p-eNOS) (n=5) em razão da expressão da enzima óxido nítrico sintase total (eNOS) (n=5). * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX; ○ comparado ao OAE. ANOVA de 1 via, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

5.4.3. Expressão da Superóxido dismutase

A determinação proteica da isoforma mitocondrial da SOD, representada na figura 26, demonstrou que em comparação ao grupo SHAM os demais grupos não exibiram diferenças na expressão da enzima. Porém, o grupo OAE evidenciou que sua parcela de expressão proteica foi significativamente maior do que o no grupo OVX (OAE: $0,30 \pm 0,02$; OVX: $0,019 \pm 0,02$, $p < 0,05$, respectivamente). Dessa forma, fica evidente que, embora a expressão da enzima nos grupos não se tenha alterado em relação ao controle, o tratamento restrito com ácido elágico mediou uma maior síntese após a ovariectomia.

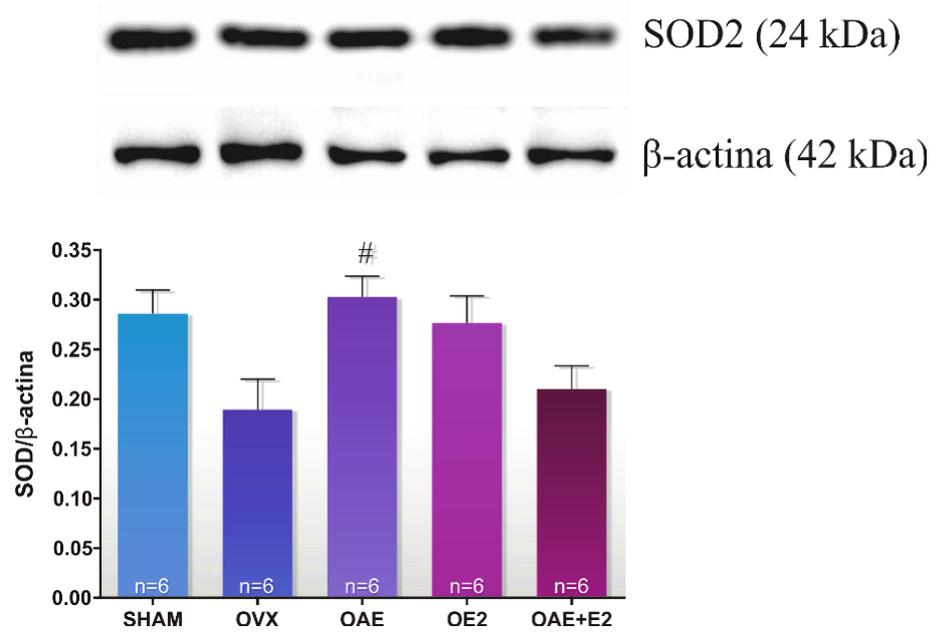


Figura 26. Expressão da isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (SOD2) (n=6). # comparado ao OVX. ANOVA de 1 via, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

5.4.4. Expressão da Catalase

A expressão da enzima catalase resguardou uma diferença significativa entre o grupo OAE ($0,49 \pm 0,07$) e os grupos SHAM e OVX ($0,26 \pm 0,03$; $0,25 \pm 0,03$, $p < 0,05$, respectivamente), ao mesmo tempo que os grupos OE2 ($0,35 \pm 0,05$) e OAE+E2 ($0,46 \pm 0,08$) não se diferenciaram entre si e dos demais ($p > 0,05$) (FIGURA 27). Este resultado deixa explícito uma importante contribuição restrita do ácido elálgico na diferenciação do montante da síntese desta enzima após a ovariectomia, algo não observado pelos demais tratamentos.

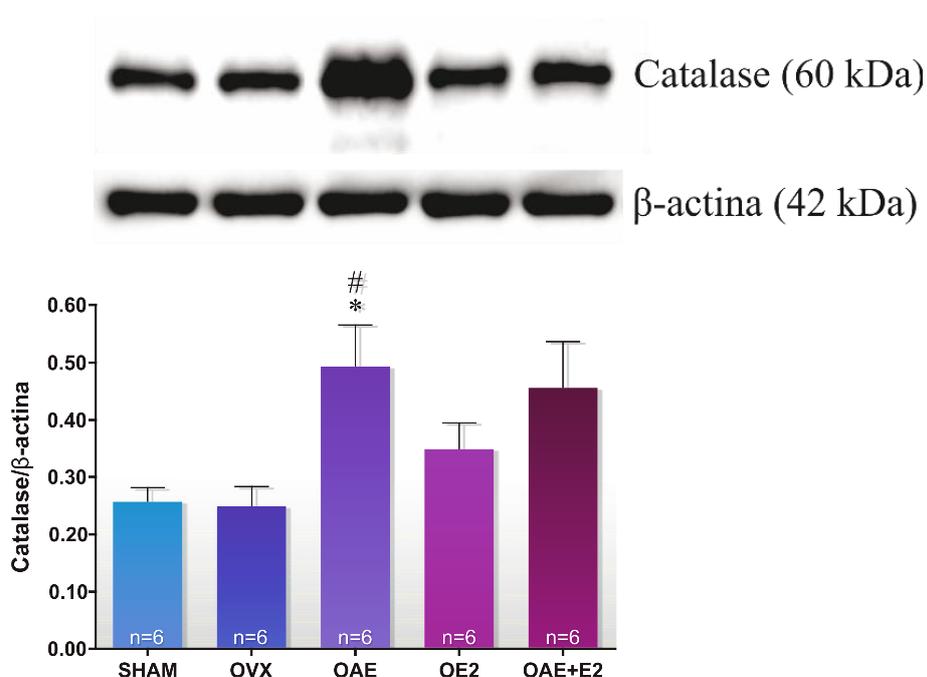


Figura 27. Expressão da enzima catalase (n=6). * comparado ao SHAM; # comparado ao OVX. ANOVA de 1 via, *post test* de Tukey, $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Alicerçada sobre o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com ácido elágico sobre a reatividade vascular dependente do endotélio, em artérias de resistência, de ratas SHR sob privação estrogênica, esta pesquisa teve como principais resultados que: I) o tratamento com ácido elágico foi capaz de preservar a pressão arterial e o relaxamento vascular, após ovariectomia, semelhante aos animais que possuíam estrogênio circulante, seja endógeno ou advindo da reposição hormonal; II) evidenciando uma significativa participação do NO, numa maior razão de sua síntese e biodisponibilidade; III) e exibindo uma maior expressão e atividade da eNOS; IV) bem como uma melhora no aporte do sistema antioxidante, pelo aumento da expressão proteica das enzimas SOD2 e catalase.

Os danos à saúde do sistema circulatório, muitas vezes, se respaldam sobre um ciclo nocivo de retroalimentação entre a hipertensão e a disfunção endotelial. A ineficiência dos mecanismos celulares de controle do tônus vascular sustenta níveis pressóricos elevados nas artérias; e estes, como parte dos prejuízos sistêmicos, nutrem injúrias no próprio leito dos vasos^{48,56,120}. Este processo assegura condições patológicas para o desenvolvimento de doenças como a aterosclerose, o infarto do miocárdio e o acidente vascular encefálico^{53,121,122}; o qual, quando projetado sobre as diferenças sexuais, expõe o sexo feminino a uma maior debilidade quando na ausência dos hormônios ovarianos¹²³⁻¹²⁵, situação a qual foi reproduzida nesta pesquisa.

6.1. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL

Após o término dos protocolos desta pesquisa, ficou evidenciado valores de pressão arterial maiores nos animais ovariectomizados e não submetidos a nenhum tratamento; como estabelecido por outros trabalhos experimentais¹²⁶⁻¹²⁸. No entanto, a abordagem terapêutica com ácido elágico e/ou a reposição hormonal com estrogênio foram capazes de preservar os níveis pressóricos semelhantes aos animais controle.

A modulação da pressão arterial pelo estrogênio é um consenso entre as publicações científicas, e os mecanismos deste são relacionados à ativação de seus receptores, onde os efeitos genômicos e não-genômicos elicitam respostas vasoprotetoras¹²⁹. A exemplo,

temos que o estrogênio demonstrou influenciar positivamente a sensibilidade do barorreflexo de ratas castradas, associado a uma menor pressão arterial média ^{130,131}. Tal fato é corroborado pela potencialização das descargas excitatórias neuronais nos barorreceptores, via corrente ativada por hiperpolarização ¹³².

Os efeitos centrais do estrogênio sobre a modulação da atividade nervosa simpática também estão associados à modulação do sistema renina angiotensina aldosterona e o estresse oxidativo nos núcleos cerebrais concernentes ¹³³; o que em exemplo funcional vascular foi observado por Endlich *et al.*, onde a resposta vasoconstritora da angiotensina II e a vasodilatadora da angiotensina 1-7 foram preservadas nas ratas tratadas com estrogênio após a ovariectomia ¹³⁴. Localmente, o estrogênio também é capaz de regular a síntese e atividade da eNOS, contribuindo na manutenção do tônus vascular e, conseqüentemente, na regulação dos níveis de pressão arterial ^{28,135}.

Contudo, a deficiência estrogênica não foi limitante para observação do efeito do ácido elágico sobre a manutenção da pressão arterial nos animais tratados nesta pesquisa. A constatação deste dado, neste modelo experimental específico, incrementa as evidências vasodilatadoras do ácido elágico observadas por outros trabalhos. Em ratos machos, induzidos a hipertensão pela administração diária de L-NAME (40 mg/kg/dia), o aumento gradual da pressão arterial foi atenuado entre aqueles que recebiam simultaneamente o ácido elágico (7,5 ou 15 mg/kg/dia). Tal diferença pôde ser confirmada imediatamente após a primeira semana de tratamento e, ao término de cinco semanas, os dados hemodinâmicos comprovaram valores de pressão arterial significativamente menores nestes grupos ¹⁰⁹. Semelhantemente, em um experimento de síndrome metabólica induzida por dieta hiperglicêmica e hiperlipídica, o tratamento concomitante com ácido elágico foi capaz de reduzir a pressão sistólica, tanto em relação aos animais controle (dieta regular e veículo), como dos tratados exclusivamente com a referida dieta ¹³⁶.

De fato, a associação do ácido elágico com os resultados benéficos à saúde é um campo de pesquisa profícuo e os mecanismos que os conectam são respaldados em sua característica antioxidante intrínseca ¹³⁷ e seu papel modulador na síntese de outras moléculas envolvidas no processo de oxirredução ¹³⁸. Neste contexto, os efeitos do ácido elágico sobre a pressão arterial também estão apoiados em sua ação antioxidante e nas evidências de melhora da concentração celular do NO ¹³⁹. Segundo Olgar *et al.*, o ácido elágico diminui o influxo de cálcio em canais tipo L em células ventriculares cardíacas, exercendo efeitos inotrópicos

negativos através da ativação das vias da NO-GC-cGMP, o que os levou a deduzir um potencial útil deste composto no tratamento de condições fisiopatológicas, como a hipertensão e doenças isquêmicas do coração ¹⁴⁰. Pouco depois, Berkban et al., demonstraram que o ácido elágico foi capaz de atenuar a hipertensão em ratos pela redução da expressão da subunidade p47phox da NADPH oxidase, prevenindo uma maior síntese de $O_2^{\bullet-}$ e restaurando a biodisponibilidade do NO ¹⁰⁹. Assim, o ácido elágico demonstra agir como um modulador da expressão proteica de componentes essenciais a manutenção pressórica, por meio de um mecanismo antioxidante indireto.

6.2. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A RESISTÊNCIA VASCULAR

A repercussão dos efeitos do ácido elágico sobre a reatividade vascular de ratas hipertensas sob privação estrogênica se mostrou positiva, preservando o relaxamento à ACh semelhante aos animais controle e em reposição hormonal; ao passo que o mesmo não foi observado nos animais não tratados. Apesar do fato de que animais espontaneamente hipertensos exibem parâmetros fisiológicos alterados, em relação aos normotensos, a ovariectomia acrescenta um prejuízo adicional na manutenção do tônus vascular, como observado nos resultados desta pesquisa e por outros trabalhos que utilizaram o mesmo modelo experimental de hipertensão pós-menopausa ^{127,141,142}. Com isso, a contribuição do ácido elágico traz à tona evidências de que este composto age de forma eficiente na conservação do relaxamento dependente do endotélio, mesmo na ausência do estrogênio.

Os estudos envolvendo o ácido elágico e o sistema cardiovascular estão em franca expansão, e embora seus mecanismos não estejam totalmente elucidados, seus efeitos são reportados à modulação de vários parâmetros correlatos a homeostase do sistema, principalmente no que diz respeito ao controle do estresse oxidativo ⁸⁶. O tratamento com ácido elágico, em um modelo de dislipidemia induzida por dieta, manteve o relaxamento concentração-dependente de ACh em aorta de ratos normotensos; além de ter reduzido os níveis sanguíneos de glicose, colesterol total e LDL ¹⁴³. Em camundongos geneticamente predispostos a aterosclerose, o tratamento com ácido elágico não só preservou o relaxamento à ACh nas aortas, mas foi capaz de fazê-lo mesmo após indução da disfunção endotelial com ácido hipocloroso, durante os testes de reatividade. Neste experimento os

pesquisadores também constataram uma correlação com uma maior síntese do fator nuclear eritróide 2, tido como principal fator transcricional sensível a oxirredução; e da heme oxigenase 1, um importante fator de proteção contra aterosclerose, de ação anti-inflamatória, antiapoptótica e efeito vasodilatador ¹⁴⁴.

Na investigação do efeito do ácido elágico sobre a reatividade de aortas de ratos normotensos, Yilmaz et al. constataram que doses crescentes de ácido elágico, ainda que nas concentrações mais diluídas, induziram o relaxamento dos vasos, tanto na presença como na ausência do endotélio, estando a priori incubados ou não com bloqueadores de canais de potássio; tendo este efeitos uma associação com vasodilatação induzida principalmente pelo NO e pela inibição de canais de cálcio. Os autores ainda discutem que o relaxamento evocado pelo ácido elágico, mesmo em concentrações relativamente baixas, é um aspecto clínico importante ¹⁴⁵. Todavia, na hipertensão induzida por L-NAME, a administração de 10 ou 30 mg/Kg/dia de ácido elágico não foi capaz de preservar o relaxamento vascular, dependente e independentemente do endotélio, mas assegurou uma maior responsividade à vasodilatação entre os animais tratados do que os que não foram tratados ¹³⁹. Não obstante, estes resultados foram performados em anéis aórticos da porção torácica de animais machos; sendo plausível a hipótese de que o modelo experimental e seguimento vascular possam ter influenciado em suas características.

Durante a construção desta tese não foram encontrados nos anais científicos nenhum registro de experimentos de reatividade vascular e tratamento com ácido elágico em fêmeas, tampouco hipertensas. O que se tem de relevante são estudos *in vitro*, com células isoladas, e dados clínicos de correlação entre o consumo de fontes de elagitaninos e seus efeitos sobre a saúde cardiovascular. Em cultura de células temos, por exemplo, que o ácido elágico reduziu a produção (concentração-dependente) de prostaglandinas em monócitos humanos ¹⁰¹; aumentou a produção de NO e a atividade da eNOS em células endoteliais humanas ¹⁴⁶; reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de $O_2^{\bullet-}$ em neutrófilos humanos ¹⁴⁷. Em revisão, Goszcz et al., relacionam que em ensaios clínicos o consumo de alimentos ricos em flavonoides demonstra projeções estatísticas de menor incidência de doenças coronarianas, infarto do miocárdio, uma melhor razão da dilatação mediada por fluxo, melhora da pressão arterial e redução da mortalidade por DCV ¹⁴⁸. Em suma, os experimentos com ácido elágico apontam boas evidências nos resultados funcionais de reatividade vascular; permeados por complexos arranjo entre síntese e

liberação de substâncias vasoativas, em experimentos celulares; e correlações clínicas de desfechos positivos, resguardando sempre a necessidade de implemento dos dados.

6.2.1. Influência do tratamento com ácido elágico sobre o óxido nítrico

É bem estabelecido que o NO é o maior fator de relaxamento derivado do endotélio, atuante sobre as células musculares lisas⁵³. Para avaliar se os efeitos do ácido elágico sobre os vasos de resistência estavam relacionados ao NO, os anéis mesentéricos foram pré-tratados com L-NAME; e os resultados mostraram que a vasodilatação foi significativamente reduzida nos animais que receberam apenas o ácido elágico, assim como entre os que receberam somente estrogênio, indicando uma participação substancial do NO nos mecanismos de relaxamento estimulados pela ACh.

A ovariectomia e a menopausa são condições frequentemente associadas a disfunção endotelial, e a redução dos níveis de estrógenos decorrente está em paralelo à redução da biodisponibilidade do NO e ao aumento do estresse oxidativo. Sobre o modelo experimental de hipertensão essencial em ratas fêmeas, Wassmann et al. descreveram que a ovariectomia aumenta a produção de EROs e a síntese de receptores de angiotensina 1, o que conduz à disfunção endotelial, podendo correlacionar-se ao desenvolvimento de DCV na pós-menopausa¹⁴⁹. Em ratas normotensas, a ovariectomia foi descrita como um fator responsável por redirecionar a resposta endotelial de arteríolas mesentéricas à favor da vasoconstrição, por propiciar uma redução do NO vascular e ampliar a sinalização de receptores de prostanoídes e tromboxanos, ao mesmo tempo que reduz a vasodilatação induzida pelo tecido adiposo perivascular, em tudo, resguardando uma ligação com as EROs¹⁵⁰.

Neste sentido, encontra-se que uma maior atividade da NADPH oxidase e da xantina oxidase (fontes produtoras de $O_2^{\bullet-}$) e uma maior quantificação de produtos de oxidação proteica foram postas em evidência após ovariectomia de ratas espontaneamente hipertensas¹⁵¹; bem como uma menor sinalização da via NO/cGMP¹⁵². No entanto, o tratamento com estrogênio preveniu estas alterações fisiopatológicas, evidenciando o princípio farmacológico da ativação dos receptores de estrogênio e os efeitos vasculares positivos correlatos. Já Leung et al., reportaram que agentes nutracêuticos como os

flavonoides existentes no extrato de chá preto, também foram capazes de prevenir os danos causados ao relaxamento vascular dependente do endotélio, em artérias de resistência e condutância, de ratas ovariectomizadas. Os pesquisadores observaram uma melhor dilatação à ACh no leito mesentérico, junto a uma maior expressão da eNOS e do cGMP; e uma redução da NADPH oxidase e EROs em aortas, tanto nos animais que receberam reposição com estrogênio, como os que receberam o extrato ¹⁵³.

O ácido elágico, por sua vez, também exerce influência favorável a biodisponibilidade do NO, como observado nesta pesquisa. Os registros de reatividade após bloqueio com L-NAME e as diferenças entre as razões da ASC e $E_{máx.}$ das ratas ovariectomizadas, assim com o a expressão e atividade da eNOS, evidenciaram que a intervenção apenas com ácido elágico dispõe de uma maior participação do NO na impressão dos efeitos globais e eficácia da resposta vasodilatadora à ACh. Em camundongos machos, selvagens ou geneticamente predispostos à aterosclerose, a administração de ácido elágico durante 14 semanas aumentou a atividade da eNOS e a excreção de nitrito (metabólito da degradação do NO), paralelo a uma preservação da capacidade antioxidante plasmática total ¹⁴⁴.

De fato, estudos com extrato de romã já apresentavam evidências de que os compostos fenólicos nele presentes estavam associados à uma maior expressão da eNOS e uma redução na ativação de genes sensíveis à oxidação em células endoteliais de aorta humana ¹⁵⁴; bem como um aumento da expressão da eNOS e dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato em artérias mesentéricas de ratas obesas ¹⁰². Já em culturas de células musculares lisas de aorta de ratos, o tratamento com um concentrado de suco de romã, mesmo em frações mais diluídas, preservou os níveis intracelulares de NO após a administração de pirogalol (um gerador de $O_2^{\bullet-}$) sem alterar a atividade da eNOS, evidenciando a ação protetora da biodisponibilidade do NO exercida pelos compostos fenólicos deste fruto ¹⁵⁵.

As moléculas derivadas da biotransformação do ácido elágico demonstram ampliar seu o espectro de ação. As urolitinas C e D foram descritas como tendo ação antioxidante mais potente do que as substâncias parentais do ácido elágico. Já a urolitina A, embora com menor poder antioxidante, é o metabólito encontrado em maior quantidade no sangue após o consumo de elagitaninos, sendo a esta atribuídas evidências de inibir hemeperoxidases e outras substâncias inflamatórias; além de relacionar-se com uma menor área de infarto, por aumentar a sinalização da via fosfoinositido 3-kinase/Akt, em camundongos ⁸². A urolitina A também se mostrou capaz de atenuar a disfunção endotelial induzida pro LDL oxidadas

em cultura de células, aumentando a expressão de eNOS e a concentração de NO por meio da modulação da via ERK/PPAR- γ , via de regulação metabólica da insulina, lipídios e processos inflamatórios ¹⁵⁶. Registros de aumento da biodisponibilidade de NO também foram descritas em células endoteliais de aorta humana, após cinco minutos da administração de urolitinas; e um aumento dos metabólitos do NO (nitrito/nitrato), após 24 horas da administração ¹⁴⁶.

Uma das intrigantes especulações sobre os metabólitos do ácido elágico é a capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio ^{157,158}. Skledar et al., demonstraram em condições experimentais que as urolitinas A e B tinham uma maior afinidade aos receptores alfa e que o próprio ácido elágico, e, em grandes concentrações, foi capaz de modular a ativação de receptores estrogênicos e androgênicos; o que acreditamos poder explicar parte de seus efeitos vasoprotetores expressos nos resultados de nossa pesquisa ¹⁵⁹.

6.3. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA ANTIOXIDANTE

Os resultados do tratamento com ácido elágico também se mostraram muito positivos sobre a redução do radical $O_2^{\bullet-}$ tecidual dos anéis mesentéricos. Tal fato corrobora com a característica sequestradora de EROs, proposta a este polifenol. Efetivamente, é essa propriedade antioxidante intrínseca que lhe justifica o título de *scavenger*, uma vez que a presença dos grupos funcionais hidroxila e lactona permitem que o ácido elágico remova uma grande variedade de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio; propriedade essa que não é abolida por completo em sua biotransformação, bem como pelas evidências de que o ácido elágico pode ser regenerado inúmeras vezes após a remoção de dois radicais livres por ciclo (um peroxil e um $O_2^{\bullet-}$), até que alguns dos seus metabólitos intermediários sejam consumidos por diferentes reações ⁹².

Inúmeras são as fontes endógenas de produção das EROs, e evidências atestam que, sobre tais, o ácido elágico também demonstra efetividade na regulação, como por exemplo a redução da expressão do complexo enzimático do citocromo P450, por meio de um efeito antioxidante indireto ¹⁶⁰; e a inibição da disfunção endotelial induzida por LDL oxidada, por intermédio da supressão do acoplamento do complexo da NADPH oxidase na

membrana celular ¹⁶¹; o que posteriormente foi sugerido ser capaz de reduzir a expressão da subunidade p47phox e, conseqüentemente, diminuindo a produção de superóxidos radicais ¹⁰⁹.

Em nossa pesquisa, o sistema antioxidante enzimático sofreu influência do tratamento com o ácido elágico, especificamente na expressão das enzimas SOD mitocondrial e catalase, em que a quantificação proteica destas foi maior nos animais ovariectomizados que receberam o ácido elágico, do que nos animais na mesma condição tratados apenas com veículo. O aumento da concentração de $O_2^{\bullet-}$ celular é um fator diretamente e indiretamente relacionado à disfunção endotelial, seja por interferir na biodisponibilidade do NO ou interagindo com o mesmo para a formação do peróxido nítrico, o que pode levar a nitração do íon manganês da SOD2 e envolver-se na disfunção mitocondrial; e ainda, o $O_2^{\bullet-}$ pode desvirtuar a estabilidade dos metais de transição e formar mais espécies reativas, o que amplia os danos e firma a disfunção endotelial, bem como viabiliza várias outras doenças ¹⁶².

Dalvi et al., demonstraram que o ácido elágico foi capaz de se ligar aos metais de transição, preservando-os dos danos oxidativos ¹⁶³. Neste sentido, pode-se inferir que o ácido elágico tenha atuado com um protetor da SOD2 e catalase, por proporcionar um ambiente em que elementos essenciais à sua síntese e atividade fossem preservados. Em células cardíacas expostas ao estresse oxidativo gerado a partir da administração de doxorubicina em camundongos, o tratamento concomitante com ácido elágico impediu o declínio acentuado da atividade da SOD2 e o aumento da atividade da xantina oxidase e da inflamação; assim como reduziu a atividade de enzimas e fatores de transcrição pró-apoptóticos ¹⁶⁴.

Os efeitos da tetracloro dioxina, composto químico altamente tóxico, também se mostraram suscetíveis à ação do ácido elágico sobre as enzimas antioxidantes nas células renais de ratos, em que os animais pré-tratados com 10mg/Kg/dia preservaram a atividade da SOD, catalase, glutathione transferase e glutathione peroxidase; tal qual também controlou a atividade do citocromo p450 e as proteínas canais $Na^+K^+ATPase$, $Ca^{2+}ATPase$ e $Mg^{2+}ATPase$, culminando num menor estresse oxidativo ¹⁶⁵. Adicionalmente, uma maior expressão, dose dependente de ácido elágico, da isoforma citosólica da SOD foi observada em culturas de células endoteliais de veia umbilical humana induzidas ao estresse oxidativo por LDL oxidadas, mas no entanto não foram detectadas alterações na isoforma

mitocondrial ¹⁶¹. Semelhantemente, Rozentsvit et al., embora tendo detectado melhoras significativas nos parâmetros oxidativos em cultura de células endoteliais, compelidas ao estresse por alta dose de glicose, não observaram alterações na expressão da SOD mitocondrial nas colônias em que foram introduzidos o ácido elágico ¹⁶⁶.

Em condições normais, frações substanciais do $O_2^{\bullet-}$ são convertidas em H_2O_2 , e se espera que este também mantenha sua concentração e funções dentro do espectro fisiológico; o que para tal exige-se que as enzimas responsáveis por este controle também se encontrem presentes e funcionais. Com isso, pudemos observar nesta pesquisa que no grupo tratado com ácido elágico havia uma maior expressão proteica de catalase. Linearmente, a associação de uma possível maior concentração de H_2O_2 , dada a evidência de uma menor concentração tecidual de $O_2^{\bullet-}$ performada pelo ácido elágico, é uma hipótese plausível para que se pense num estímulo à síntese da catalase, uma vez que é conhecido o papel fundamental desta enzima na adaptação celular aos níveis de H_2O_2 ¹⁶⁷.

Sob esta perspectiva, Han, Lee e Kim demonstraram que a adição de ácido elágico em cultura de células expostas ao estresse oxidativo por excesso de H_2O_2 , a atividade das enzimas SOD, catalase e glutathiona peroxidase era maior e patente com o aumento da capacidade de depuração de EROs e uma ação anti-peroxidação lipídica ¹⁶⁸. Em estudos mais recentes também observou-se que o ácido elágico foi eficaz em prevenir os danos causados pelo excesso de H_2O_2 em cultura de células, no entanto não foram realizados experimentos para a quantificação das enzimas peroxidases, atribuindo os efeitos diretamente ao ácido elágico ^{169,170}. Já no experimento com a indução da citotoxicidade por meio de uma dose única de gentamicina (100 mg/Kg) em células renais de ratos, onde houve um aumento do estresse oxidativo, foi constatado que a administração de 10mg/Kg/dia de ácido elágico preservou a atividade das enzimas SOD, catalase e os níveis de glutathiona, além de preservar a atividade mitocondrial e a expressão de enzimas pró-apoptóticas após 10 dias de tratamento ¹⁷¹. No entanto, em amostras de tecido cardíaco, o ácido elágico reduziu os níveis de peroxidação lipídica e aumentou a atividade da glutathiona peroxidase de ratos que receberam doses diárias de ciclosporina A (um supressor da resposta imune), durante três semanas, mas não foi capaz de impedir a redução dos níveis de glutathiona e catalase ¹⁷². Ao que consta neste quesito, a maior parte dos experimentos envolvendo os efeitos do ácido elágico sobre o sistema antioxidante enzimático não foram investigados em leitos vasculares, muito menos em modelos de

privação estrogênica, o que uma vez mais legitima a relevância dos dados perante esta lacuna.

7. CONCLUSÕES

O tratamento exclusivo com ácido elágico foi capaz de preservar a pressão arterial e o relaxamento vascular dependente do endotélio em artérias mesentéricas de ratas SHR ovariectomizadas, elicitando principalmente o NO como o principal mediador endotelial responsável pela expressão de seus resultados, em um modelo de deficiência estrogênica e hipertensão essencial. Os principais mecanismos associados a esses resultados estão relacionados a uma maior expressão da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (em sua fração total e fosforilada), paralela à uma maior biodisponibilidade do NO, em decorrência dos seus efeitos antioxidantes. Dessa forma, a ação antioxidante do ácido elágico são evidenciadas pela redução do estresse oxidativo, expresso por menores níveis do radical $O_2^{\bullet-}$ e maior síntese das enzimas SOD2 e catalase. Além disso, é importante salientar que os dados apresentados pelo ácido elágico não se diferiram do tratamento de reposição estrogênica; o que nos levam a deduzir que, na ausência da reconhecida ação cardioprotetora do estrogênio, o ácido elágico supre seus efeitos de forma efetiva.

O aumento do risco de desenvolvimento de DCV decorrentes da redução dos hormônios ovarianos, no período pós-menopausa, é um fato; e a introdução de um composto que consiga amenizar, protelar ou até mesmo conter os surgimentos de doenças do sistema circulatório, configura-se como uma proposta promissora. Embora nossos dados fomentem esta discussão, as pesquisas para caracterização mais apurada dos mecanismos vasculares de ação do ácido elágico, bem como sua interface junto aos hormônios sexuais, ainda são um campo vasto a ser investigado.

8. REFERÊNCIAS

1. Mckeown RE. The Epidemiologic Transition : Changing Patterns of Mortality and Population Dynamics. 2009;3:19–26.
2. Blacher J, Levy BI, Mourad J, Safar ME, Bakris G. From epidemiological transition to modern cardiovascular epidemiology : hypertension in the 21st century. *The Lancet*. 2016;6736(16):5–7.
3. Global Burden of Disease. Global , regional , and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories , 1980 – 2017 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2018;392(10):1980–2017.
4. Carvalho RA, Sousa RPB, Cadete VJJ, Lopaschuk GD, Palmeira CMM, Bjork JA, Wallace KB. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology*. 2010;270(2–3):92–8.
5. Ritchie H, Roser M. Causes of death. *OurWorldInData.org*. 2019.
6. Wu SH, Woo J, Zhang X. Worldwide socioeconomic status and stroke mortality : an ecological study. *International Journal for Equity in Health*. 2013;12(1):1.
7. White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *The Lancet*. 2008;372(8):570–584.
8. Pedersen F, Buytymovich V, Kelbæk H, Wachtell K, Helqvist S, Kastrup J, Holmvang L, Clemmensen P, Engstrøm T, Grande P, Saunamäki K, Jørgensen E. Short- and Long-Term Cause of Death in Patients Treated With Primary PCI for STEMI. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;64(20):0735–1097.
9. Esposti LD, Perrone V, Veronesi C, Buda S, Rossini R. All-cause mortality , cardiovascular events , and health care costs after 12 months of dual platelet aggregation inhibition after acute myocardial infarction in real-world patients : findings from the Platelet-aggregation Inhibition : Persistence with tre. *Vascular Health and Risk Management*. 2018;14:383–392.
10. Avezum Á, Perel P, Oliveira GBF, Lopez-jaramillo P, Restrepo G, Loustalot F, Srur A, Noval RD La, Connell KI, Cruz-flores S, Moura L De, Castellac G, Mattos AC, Ordunez P. Challenges and Opportunities to Scale Up Cardiovascular Disease Secondary Prevention in Latin America and the Caribbean. *Global Heart*. 2017:1–9.
11. Saeed A, Dabhadkar K, Virani SS, Jones PH, Ballantyne CM. Cardiovascular Disease Prevention : Training Opportunities , the Challenges , and Future Directions. 2018.
12. Mena C, Sepúlveda C, Fuentes E, Ormazábal Y, Palomo I. er ci a l u se on on m er a. 2018;13.
13. Agarwal S, Sud K, Thakkar B, Menon V. Changing Trends of Atherosclerotic Risk Factors Among Patients With Acute Myocardial Infarction and Acute Ischemic Stroke. *The American Journal of Cardiology*. 2017;119(10):1532–1541.
14. Siri SRA, Braaten T, Jacobsen BK, Melhus M, Eliassen B. Distribution of risk

- factors for cardiovascular disease and the estimated 10-year risk of acute myocardial infarction or cerebral stroke in Sami and non-Sami populations : The SAMINOR 2 Clinical Survey. 2018;(March):638–646.
15. Cho Y, Lim TH, Kang H, Lee Y, Lee H, Kim H. Socioeconomic status and depression as combined risk factors for acute myocardial infarction and stroke : A population-based study of 2 . 7 million Korean adults. *Journal of Psychosomatic Research*. 2019;(January):1–10.
 16. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, White IR, Caulfi MJ. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases : lifetime risks , healthy life-years lost , and age-specific associations in 1 . 25 million people. *The Lancet*. 2014;383(5):1899–1911.
 17. Saiz LC, Gorricho J, Garjón J, Celaya MC, Muruzábal L, Malón M del M, Montoya R, López A. Blood pressure targets for the treatment of people with hypertension and cardiovascular disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;(10):1–66.
 18. Franklin SS, Wong ND. Hypertension and Cardiovascular Disease: Contributions of the Framingham Heart Study. *Global Heart*. 2013;8(1):49–57.
 19. Velasco A, Ayers C, Das SR, Lemos JA de, Khera A, Victor RG, Kaplan NM, Vongpatanasin W. Target Organ Complications and Prognostic Significance of Alerting Reaction: Analysis from the Dallas Heart Study. *J Hypertens*. 2017;34(2):226–234.
 20. Garcia M, Mulvagh SL, Merz CNB, Buring JE, Manson JAE. Cardiovascular disease in women: Clinical perspectives. *Circulation Research*. 2016;118(8):1273–1293.
 21. Shih J, Chen Z, Chang H, Liu Y, Ho C, Chang W. Risks of age and sex on clinical outcomes post myocardial infarction. *IJC Heart & Vasculature*. 2019;23(3):100350.
 22. Benjamin E, Virani S, Callaway C, Chamberlain A, Chang A, Cheng S, Chiuve S, Cushman M, Delling F, Deo R, de Ferranti S, Ferguson J, Fornage M, Gillespie C, Isasi C, et al. Heart Disease and Stroke Statistics — 2018 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137(12):67–492.
 23. Nanette K, Wenger MD. Hormonal and Nonhormonal Therapies for the Postmenopausal Woman : What is the Evidence for Cardioprotection ? *American Journal of Geriatric Cardiology*. 2000;9(4):204–209.
 24. Kim JK, Levin ER. Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nuclear Receptor Signaling*. 2006;4:e013.
 25. Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacology and Therapeutics*. 2012;135(1):54–70.
 26. Knowlton AA, Korzick DH, Cardiology C, State TP. Estrogen and the Female Heart. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017;389(1–2):31–39.
 27. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England journal of medicine*. 1999;340(23):1801–1811.

28. Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biology of Sex Differences*. 2017;8(1):1–16.
29. Baker SE, Limberg JK, Ranadive SM, Joyner MJ. Neurovascular control of blood pressure is influenced by aging, sex, and sex hormones. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2016;311(6):1271–1275.
30. Bopassa JC, Eghbali M, Toro L, Stefani E. A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2019;7115(1):16–23.
31. Spary EJ, Maqbool A, Batten TFC. Oestrogen receptors in the central nervous system and evidence for their role in the control of cardiovascular function. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2009;38(3):185–196.
32. Boese AC, Kim SC, Yin K, Lee J, Hamblin MH. Sex differences in vascular physiology and pathophysiology: estrogen and androgen signaling in health and disease. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2017;313(3):H524–H545.
33. Deschamps AM, Murphy E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2009;297(5):1806–1813.
34. Lee T, Lin S, Chang N-C. Both GPER and membrane oestrogen receptor- a activation protect ventricular remodelling in 17 b oestradiol-treated ovariectomized infarcted rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014;18(12):2454–2465.
35. Dworatzek E, Mahmoodzadeh S. Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. *Pharmacological Research*. 2017;119(5):27–35.
36. Filardo EJ, Thomas P. GPER-1: Its Mechanism of Action and Role in Female Reproductive Cancer, Renal and Vascular Physiology. *Endocrinology*. 2012;153(7):2953–2962.
37. Feldman RD, Limbird LE. GPER (GPR30): A Nongenomic Receptor (GPCR) for Steroid Hormones with Implications for Cardiovascular Disease and Cancer. *Annual Review of Pharmacological and Toxicology*. 2017;57(January):567–584.
38. Barton M, Filardo EJ, Lolait SJ, Thomas P, Prossnitz ER. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: historical and personal perspectives Matthias. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018;176(2):4–15.
39. Chakrabarti S, Davidge ST. G-protein coupled receptor 30 (GPR30): a novel regulator of endothelial inflammation. *PloS one*. 2012;7(12):e52357.
40. Mendelsohn ME. Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. *American Journal of Cardiology*. 2002;89(suppl):12–17.
41. Kane MO, Anselm E, Rattmann YD, Auger C, Schini-Kerth VB. Role of gender and

- estrogen receptors in the rat aorta endothelium-dependent relaxation to red wine polyphenols. *Vascular pharmacology*. 2009;51(2–3):140–6.
42. Lone RO, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG V, Karas RH, Bienkowska J, Mendelsohn ME, Hansen U. Estrogen Receptors alpha and beta Mediate Distinct Pathways of Vascular Gene Expression , Including Genes Involved in Mitochondrial Electron Transport and Generation of Reactive Oxygen Species. *Molecular Endocrinology*. 2007;21(6):1281–1296.
 43. Ruijter HM Den, Haitjema S, Asselbergs FW, Pasterkamp G. Sex matters to the heart: A special issue dedicated to the impact of sex related differences of cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*. 2015;24(1):205–207.
 44. Regitz-zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. *Physiological reviews*. 2017;97(11):1–37.
 45. Cines BDB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, Mcever RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, Mccrae KR, Hug BA, Schmidt A, Stern DM. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *The American Society of Hematology*. 1998;91(10):3527–3561.
 46. Rehman HU. Vascular endothelium as an endocrine organ. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. 2001;31(2):149–154.
 47. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Critical Care Medicine*. 2004;32(5):271–279.
 48. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*. 2017;219(1):22–96.
 49. Kang KT. Endothelium-derived relaxing factors of small resistance arteries in hypertension. *Toxicological Research*. 2014.
 50. Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SWS. Thirty Years of Saying NO - Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circulation Research*. 2016;119(2):375–396.
 51. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012;33(7):837a-837d.
 52. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001;357(3):593–615.
 53. Farah C, Michel LYM, Balligand J. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2018;15(5):292–316.
 54. Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of Hypertension. *Annals of Internal Medicine*. 2003;139(9):761–776.
 55. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial dysfunction and hypertension. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*.; 2016.
 56. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiologica*. 2016;219(2):382–408.

57. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *International Journal of Inflammation*. 2014;2014(ID 689360):1–13.
58. Agita A, Thaha M. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Acta Medica Indonesiana*. 2017;49(2):158–165.
59. Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Frontiers in Physiology*. 2012;9(3):1–15.
60. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(25):22546–22554.
61. Zou MH, Hou XY, Shi CM, Nagata D, Walsh K, Cohen RA. Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(36):32552–32557.
62. Finkel T, Holbrook NJ. biology of ageing. *Nature*. 2000;408(November):239–247.
63. Barreiros ALBS, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006;29(1):113–123.
64. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*. 2006;141(6):312–322.
65. Giles GI, Nasim MJ, Ali W, Jacob C. The Reactive Sulfur Species Concept : 15 Years On. *Antioxidants*. 2017;6(2):1–29.
66. Vasconcelos SM, Goulart MOF, Moura JB de F, Manfredini V, Benfato M da S, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 2007;30(5):1323–1338.
67. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):208–219.
68. Davies KJA. The Oxygen Paradox, oxidative stress, and ageing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016;595(April):28–32.
69. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *The British journal of nutrition*. 2001;85 Suppl 2:S67-74.
70. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas R de CG, Paula SO DE, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. *Rev. Nutr.* 2010;23(4):629–643.
71. Davies KJA. The Oxygen Paradox, oxidative stress, and ageing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016;595(April):28–32.
72. Salazar G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(5):1–21.
73. Jia G, Aroor AR, Jia C, Sowers JR. Endothelial cell senescence in aging-related

- vascular dysfunction. *Molecular Basis of Disease*. 2019;1865(7):1802–1809.
74. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. SOURCES OF VASCULAR NITRIC OXIDE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES AND THEIR REGULATION. *Physiological reviews*. 2019;99(1):311–379.
 75. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(1):29–38.
 76. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97(June):55–74.
 77. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;70(2):212–229.
 78. Briones AM, Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension : Current Concepts. *Current hypertension reports*. 2010;12(2):135–142.
 79. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A Review of Natural and Synthetic Antioxidants Important for Health and Longevity. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(28):3262–3288.
 80. Yu Y, Chang W, Wu C, Chiang S. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005;16(11):675–681.
 81. Kawabata K, Yoshioka Y, Terao J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules*. 2019;24(2):1–25.
 82. Wang D, Özen C, Abu-reidah IM, Chigurupati S. Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9(May):1–15.
 83. Institute for Healthcare Informatics. *Medicines Use and Spending Shifts*. (Aitken M, ed.). Parsippany: IMS Health Incorporated and its affiliates; 2015.
 84. Global Burden of Disease. Articles Health effects of dietary risks in 195 countries , 1990 – 2017 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 2019;393(10184):1958–1972.
 85. Basu A, Nguyen A, Betts NM, Lyons TJ. Strawberry As a Functional Food : An Evidence-Based Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014;54(6):790–806.
 86. Larrosa M, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010;31(6):513–539.
 87. Mendonça RD, Carvalho NC, Martin-moreno JM, Pimenta AM. Total polyphenol intake , polyphenol subtypes and incidence of cardiovascular disease : The SUN cohort study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2018;29(1):69–78.
 88. Mahmoud AM, Bautista RJH, Sandhu MA, Hussein OE. Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. *Oxidative Medicine and*

- Cellular Longevity*. 2019;2019(Special Issue):1–19.
89. Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*. 2011;44(5):1150–1160.
 90. García-Conesa M-T, Chambers K, Combet E, Pinto P, Garcia-Aloy M, Andrés-Lacueva C, Pascual-Teresa S, Mena P, Ristic AK, Hollands WJ, Kroon PA, Rodríguez-Mateos A, Istaş G, Kontogiorgis CA, Rai DK, et al. Meta-Analysis of the Effects of Foods and Derived Products Containing Ellagitannins and Anthocyanins on Cardiometabolic Biomarkers : Analysis of Factors Influencing Variability of the Individual Responses. *International Journal of M*. 2018;19(3):1–33.
 91. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MNVR. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;40(1):206–210.
 92. Ríos JL, Giner RM, Marín M, Recio MC. A pharmacological update of ellagic acid. *Planta Medica*. 2018;84(15):1068–1093.
 93. Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: The evidence so far. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013(May):270418.
 94. Lipińska L, Klewicka E, Sójka M. Structure , Occurrence and Biological Activity of Ellagitannins : a General Review *. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2014;13(3):289–299.
 95. Törrönen R. Sources and Health Effects of Dietary Ellagitannins. In: Quideau S, ed. *Chemistry and Biology of Ellagitannins: An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols*. Bordeaux: World Scientific Publishing; 2009:298–319.
 96. Xiang L, Xing D, Lei F, Wang W, Xu L, Nie L, Du L. Effects of Season , Variety , and Processing Method on Ellagic Acid Content in Pomegranate Leaves *. *Tsinghua Science and Technology*. 2008;13(4):460–465.
 97. Koch W. Dietary Polyphenols — Important Non-Nutrients in the Prevention of Chronic Noncommunicable. *Nutrients*. 2019;11(5):1–35.
 98. Fuhrman B, Sc D, Volkova N, Sc M, Aviram M, Sc D. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein : Studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition*. 2010;26(4):359–366.
 99. Lou-bonafonte JM, Gabás-rivera C, Navarro MA, Osada J. The Search for Dietary Supplements to Elevate or Activate Circulating Paraoxonases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(2):416.
 100. Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, Rosenblat M. Pomegranate Phenolics from the Peels , Arils , and Flowers Are Antiatherogenic : Studies in Vivo in Atherosclerotic Apolipoprotein E-Deficient (E⁰) Mice and in Vitro in Cultured Macrophages and Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(3):1148–1157.
 101. Karlsson S, Nanberg E, Fjaeraa C, Wijkander J. Ellagic acid inhibits

- lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in human monocytes. *British Journal of Nutrition*. 2010;103(8):1102–1109.
102. de Nigris F, Luisa M, Williams-ignarro S, Armiento FPD, Fiorito C, Ignarro LJ, Napoli C. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2007;17(1):50–54.
 103. Heber D, Seeram NP, Wyatt H, Henning SM, Zhang Y, Ogden LG, Dreher M, Hill JO. Safety and Antioxidant Activity of a Pomegranate Ellagitannin-Enriched Polyphenol Dietary Supplement in Overweight Individuals with Increased Waist Size. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(24):10050–10054.
 104. Ammar A, Turki M, Hammouda O, Chtourou H, Trabelsi K, Bouaziz M, Abdelkarim O, Hoekelmann A, Ayadi F, Souissi N, Bailey SJ, Driss T, Yaich S. Effects of pomegranate juice supplementation on oxidative stress biomarkers following weightlifting exercise. *Nutrients*. 2017;9(8):1–13.
 105. Mattiello T, Trifirò E, Jotti GS, Pulcinelli FM. Effects of Pomegranate Juice and Extract Polyphenols on Platelet Function. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12(2):334–339.
 106. Danesi F, Ferguson LR. Could pomegranate juice help in the control of inflammatory diseases? *Nutrients*. 2017;9(9):E958.
 107. Bensaad LA, Kim KH, Quah CC, Kim WR, Shahimi M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid , gallic acid and punicalagin A & B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017;17(1):47–57.
 108. Yamagata K, Tagami M, Yamori Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. *Nutrition*. 2015;31(1):28–37.
 109. Berkban T, Boonprom P, Bunbupha S, Welbat JU, Kukongviriyapan U, Kukongviriyapan V, Pakdeechote P, Prachaney P. Ellagic acid prevents L-NAME-induced hypertension via restoration of eNOS and p47phox expression in rats. *Nutrients*. 2015;7(7):5265–5280.
 110. Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarrías A, Selma M V., Espín JC. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(28):6535–6538.
 111. Hernández I, Delgado JL, Díaz J, Quesada T, Teruel MJG, Llanos MC, Carbonell LF. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000;279(5):R1599–R1605.
 112. Mari Kannan M, Darlin Quine S. Ellagic acid protects mitochondria from β -adrenergic agonist induced myocardial damage in rats; evidence from in vivo, in vitro and ultra structural study. *Food Research International*. 2012.
 113. Stomati M, Bernardi F, Luisi S, Puccetti S, Casarosa E, Liut M, Quirici B, Pieri M, Genazzani AD, Luisi M, Genazzani AR. Conjugated equine estrogens, estrone

- sulphate and estradiol valerate oral administration in ovariectomized rats: Effects on central and peripheral allopregnanolone and β -endorphin. *Maturitas*. 2002;43(3):195–206.
114. Dal-Ros S, Bronner C, Auger C, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;419(2):381–7.
 115. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*. 1977;41(1):19–27.
 116. Mill JG, Milanez C, Resende MM De, Gomes GS, Leite CM. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2003;30(February 2002):739–744.
 117. Resende MM De, Mill JG. Effect of high salt intake on local renin-angiotensin system and ventricular dysfunction following myocardial infarction in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007;34(February 2006):274–279.
 118. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein ensurament with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265–275.
 119. Owusu-Ansah E, Yavari A, Banerjee U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. *Protocol Exchange*. 2008:PROTOCOL (Version 1).
 120. Haybar H, Shahrabi S, Rezaeeyan H, Shirzad R, Saki N. Endothelial Cells: From Dysfunction Mechanism to Pharmacological Effect in Cardiovascular Disease. *Cardiovascular Toxicology*. 2019;19(1):13–22.
 121. Guzik TJ, Touyz RM. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. *Hypertension*. 2017;70(4):660–667.
 122. Niiranen TJ, Kalesan B, Hamburg NM, Benjamin EJ, Mitchell GF, Vasani RS. Relative Contributions of Arterial Stiffness and Hypertension to Cardiovascular Disease: The Framingham Heart Study. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(11):e004271.
 123. Newson L. Menopause and cardiovascular disease. *Post Reproductive Health*. 2018;24(1):44–49.
 124. Ketepe-Arachi T, Sharma S. Cardiovascular disease in women: understanding symptoms and risk factors. *European Cardiology Review*. 2017;12(1):10–13.
 125. Jiang H, Bai W, Wang W, Zhang J, Wang K, Liu Y, Liu S, Jia J, Qin L. Changes in cardiovascular function based on adrenalin and norepinephrine metabolism in ovariectomized rats. *Experimental Gerontology*. 2017;91(May):15–24.
 126. Dias da Silva VJ, Miranda R, Oliveira L, Henrique C, Alves FR, Helana G, Gils F Van, Porta A, Montano N. Heart rate and arterial pressure variability and baroreflex sensitivity in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*. 2009;84(21–22):719–724.

127. Claudio ERG, Almeida SA de, Mengal V, Brasil GA, Santuzzi CH, Tiradentes R V, Gouvea SA, Bissoli N de S, Santos RL, Abreu GR de. Swimming training prevents coronary endothelial dysfunction in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2017;50(1):1–8.
128. Borgo MV, Claudio ERG, Silva FB, Romero WG, Gouvea SA, Moysés MR, Santos RL, Almeida SA, Podratz PL, Graceli JB, Abreu GR de. Hormonal therapy with estradiol and drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016;49(1):1–9.
129. Siow RCM, Li FYL, Rowlands DJ, Winter P De, Mann GE. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007;42(7):909–925.
130. Stanhewicz AE, Wenner MM, Stachenfeld NS. Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2018;315(6):H1569–H1588.
131. Pourshanazari AA, Mohagheghi O, Pilavarian AA, Enayatifard L, Shafei MN. Involvement of β -adrenergic receptor of nucleus tractus solitarius in changing of baroreflex sensitivity by estrogen in female rats. *Advanced Biomedical Research*. 2014;3(fev):83.
132. He J-L, Li J-N, Zuo C-M, Wang L, Wen X, Zuo M, Guan J, Wu D, Song D-X, Yu X, Qu M-Y, Liu Y, Qiao G-F, Li B-Y. Potentiation of 17 β -estradiol on neuroexcitability by HCN-mediated neuromodulation of fast-afterhyperpolarization and late-afterdepolarization in low-threshold and sex-specific myelinated Ah-type baroreceptor neurons via GPR30 in female rats. *International Journal of Cardiology*. 2015;182(mar):174–178.
133. Hay M. Sex, the brain and hypertension: brain oestrogen receptors and high blood pressure risk factors. *Clinical Science*. 2016;130(1):9–18.
134. Endlich PW, Claudio ERG, Lima LCF, Junior RFR, Peluso AAB, Stefanon I, Bissoli NS, Lemos VS, Santos RAS dos, Abreu GR de. Exercise modulates the aortic renin-angiotensin system independently of estrogen therapy in ovariectomized hypertensive rats. *Peptides*. 2016;87(jan):41–49.
135. Fredette NC, Meyer MR, Prossnitz ER. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018;176(February):65–72.
136. Panchal SK, Ward L, Brown L. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *European Journal of Nutrition*. 2013;52(2):559–568.
137. Galano A, Francisco Marquez M, Pérez-González A. Ellagic acid: an unusually versatile protector against oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*. 2014;27(5):904–918.

138. Ou H-C, Lee W-J, Lee S-D, Huang C-Y, Chiu T-H, Tsai K-L, Hsu W-C, Sheu WH-H. Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;248(2):134–143.
139. Jordão JBR, Porto HKP, Lopes FM, Batista AC, Rocha ML. Protective effects of ellagic acid on cardiovascular injuries caused by hypertension in rats. *Planta Medica*. 2017;83(10):830–836.
140. Olgar Y, Ozturk N, Usta C, Puddu PE, Ozdemir S. Ellagic acid reduces L-type Ca²⁺ current and contractility through modulation of NO-GC-cGMP pathways in rat ventricular myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2014;64(6):567–573.
141. Tatchum-talom R, Eyster KM, Kost CK, Martin DS. Blood pressure and mesenteric vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats 7 months after gonadectomy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2011;57(3):357–364.
142. Ribeiro Junior RF, Fiorim J, Marques VB, Ronconi K e S, Botelho T, Grando MD, Bendhack LM, Vassallo DV, Stefanon I. Vascular activation of K⁺ channels and Na⁺ -K⁺ ATPase activity of estrogen-deficient female rats. *Vascular Pharmacology*. 2017;99(Dec):23–33.
143. Ratnam DV, Chandraiah G, Meena AK, Ramarao P, Kumar MNVR. The co-encapsulated antioxidant nanoparticles of ellagic acid and coenzyme Q 10 ameliorates hyperlipidemia in high fat diet fed rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2009;9(11):6741–6746.
144. Ding Y, Zhang B, Zhou K, Chen M, Wang M, Jia Y, Song Y, Li Y, Wen A. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: Role of Nrf2 activation. *International Journal of Cardiology*. 2014;175(3):508–514.
145. Yilmaz B, Usta C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aortic rings and the underlying mechanism. *Phytotherapy Research*. 2013;27(2):285–289.
146. Spigoni V, Mena P, Cito M, Fantuzzi F, Bonadonna RC, Brighenti F, Dei Cas A, Del Rio D. Effects on nitric oxide production of urolithins, gut-derived ellagitannin metabolites, in human aortic endothelial cells. *Molecules*. 2016;21(8):E1009.
147. Wu S, Tian L. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*punica granatum*). *Molecules*. 2017;22(10):1606.
148. Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in cardiovascular therapy: panacea or false hope? *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2015;2(Jul):29.
149. Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K, Eickels M Van, Grohé C, Ahlbory K, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2001;103(3):435–441.
150. Wang D, Wang C, Wu X, Zheng W, Sandberg K, Ji H, Welch WJ, Wilcox CS.

- Endothelial dysfunction and enhanced contractility in microvessels from ovariectomized rats: roles of oxidative stress and perivascular adipose tissue. *Hypertension*. 2014;63(5):1063–1069.
151. Ribon-Demars A, Pialoux V, Boreau A, Marcouiller F, Larivière R, Bairam A, Joseph V. Protective roles of estradiol against vascular oxidative stress in ovariectomized female rats exposed to normoxia or intermittent hypoxia. *Acta Physiologica*. 2019;225(2):e13159.
 152. Widder J, Pelzer T, Von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Bauersachs J. Improvement of Endothelial Dysfunction by Selective Estrogen Receptor- α Stimulation in Ovariectomized SHR. *Hypertension*. 2003;42(5):991–996.
 153. Leung FP, Yung LM, Ngai CY, Cheang WS, Tian XY, Lau CW, Zhang Y, Liu J, Chen ZY, Bian ZX, Yao X, Huang Y. Chronic black tea extract consumption improves endothelial function in ovariectomized rats. *European Journal of Nutrition*. 2016;55(5):1963–1972.
 154. de Nigris F, Williams-Ignarro S, Sica V, Lerman LO, D'Armiento FP, Byrns RE, Casamassimi A, Carpentiero D, Schiano C, Sumi D, Fiorito C, Ignarro LJ, Napoli C. Effects of a Pomegranate Fruit Extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. *Cardiovascular Research*. 2007;73(2):414–423.
 155. Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2006;15(2):93–102.
 156. Han Q, Yan C, Wang L, Li G, Xu Y, Xia X. Urolithin A attenuates ox-LDL-induced endothelial dysfunction partly by modulating microRNA-27 and ERK/PPAR- γ pathway. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2016;60(9):1933–1943.
 157. Dellafiora L, Mena P, Cozzini P, Brighenti F, Del Rio D. Modelling the possible bioactivity of ellagitannin-derived metabolites. In silico tools to evaluate their potential xenoestrogenic behavior. *Food & Function*. 2013;10(October):1442–1451.
 158. Larrosa M, González-Sarrías A, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006.
 159. Skledar DG, Tomasic T, Dolenc MS, Masic LP, Zega A. Evaluation of endocrine activities of ellagic acid and urolithins using reporter gene assays. *Chemosphere*. 2019;220(April):706–713.
 160. Hassoun EA, Vodhanel J, Abushaban A. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2004;18(4):196–203.
 161. Lee WJ, Ou HC, Hsu WC, Chou MM, Tseng JJ, Hsu SL, Tsai KL, Sheu WHH. Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells. *Journal of Vascular Surgery*.

- 2010;52(5):1290–1300.
162. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15(6):1583–1606.
 163. Dalvi LT, Moreira DC, Andrade Jr R, Ginani J, Alonso A, Hermes-Lima M. Ellagic acid inhibits iron-mediated free radical formation. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017;173(Fev):910–917.
 164. Lin M-C, Yin M-C. Preventive effects of ellagic acid against doxorubicin-induced cardio-toxicity in mice. *Cardiovascular Toxicology*. 2013;13(3):185–193.
 165. Padma VV, Selvi PK, Sravani S. Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms. *Molecular Biology Reports*. 2014;41(7):4223–4232.
 166. Rozentsvit A, Vinokur K, Samuel S, Li Y, Gerdes AM, Carrillo-Sepulveda MA. Ellagic acid reduces high glucose-induced vascular oxidative stress through ERK1/2/NOX4 signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(3):1174–1187.
 167. Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2018;140(Dec):5–12.
 168. Han DH, Lee MJ, Kim JH. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. *Anticancer Research*. 2006;26(5 A):3601–3606.
 169. Shen Y-C, Juan C-W, Lin C-S, Chen C-C, Chang C-L. Neuroprotective effect of Terminalia chebula extracts and ellagic acid in Pc12 cells. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 2017;14(4):22–30.
 170. Baeeri M, Mohammadi-Nejad S, Rahimifard M, Navaei-Nigjeh M, Moeini-Nodeh S, Khorasani R, Abdollahi M. Molecular and biochemical evidence on the protective role of ellagic acid and silybin against oxidative stress-induced cellular aging. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2018;441(1–2):21–33.
 171. Sepand MR, Ghahremani MH, Razavi-Azarkhiavi K, Soodi M. Ellagic acid confers protection against gentamicin-induced oxidative damage, mitochondrial dysfunction and apoptosis-related nephrotoxicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2016;68(9):1222–1232.
 172. Yüce A, Ateşşahin A, Çeribaşı AO. Amelioration of cyclosporine A-induced renal, hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2008;103(2):186–191.