

**AÇÃO DO TRATAMENTO COM KEFIR NA REATIVIDADE  
VASCULAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**MARIANA DOS REIS COUTO**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

Vitória, Junho de 2020

**MARIANA DOS REIS COUTO**

**AÇÃO DO TRATAMENTO COM KEFIR NA REATIVIDADE VASCULAR DE  
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, em cumprimento às exigências de avaliação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli.

**VITÓRIA**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA CANDIDATA**  
**AO TÍTULO DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES**

**Nº. Matrícula: 2018132336**

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada " Ação do tratamento com kefir na reatividade vascular de ratas ovariectomizadas", apresentada e defendida publicamente pela aluna Mariana dos Reis Couto, no dia \_\_\_\_ de junho de 2020, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Vitória – ES,      de junho de 2020.**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli - Orientadora, UFES**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roger Lyrio dos Santos, UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vinicia Campana Biancardi, Auburn University**

Couto, Mariana dos Reis, 1989

Ação do tratamento com kefir na reatividade vascular de ratas ovariectomizadas [Vitória] 2020

Xvi, 74 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2010).

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli

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

1. Estrogênio; 2. Pós-menopausa; 3. Kefir; 4. Ovariectomia ; 5. Endotélio ; 6. Reatividade vascular;

"Que darei eu ao Senhor por todos os benefícios que me tem feito? Tomarei o cálice da salvação e invocarei o nome do Senhor." Salmos 116

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e amigos, que foram essenciais nessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo sustento de sempre, por estar ao meu lado em todos os momentos, e me dar a certeza de que tudo daria certo. Por colocar pessoas tão especiais na minha vida ao longo desse tempo e de toda minha vida.

Agradeço **minha vó** e **minha tia Samantha** por toda paciência e cuidado comigo, mesmo sem merecer. Por suportar todo meu estresse mesmo sem entender o porquê. Enfim, agradeço por toda compreensão e amor incondicional, eu amo vocês.

Ao meu irmão, **João Pedro Couto Severo**, que me dá forças pelo simples fato de existir. Vou usar a sua frase: você foi o melhor presente que mamãe poderia ter me dado. Te amo!

A toda minha família, que mesmo sem saber, me deu tanta força, que nas festas de família ou encontros, enchiam meu coração de alegria. Obrigada pela certeza de que sempre posso contar com vocês. Primos que amo tanto, tios, tias e meu Pai por todas as palavras de apoio e incentivo sempre. Amo tanto vocês.

A minha orientadora **Professora Nazaré Souza Bissoli**, por me acolher desde a iniciação científica e sempre se preocupar muito mais do que com os resultados da minha pesquisa. Agradeço por toda paciência além da conta comigo e por ser essa professora esplêndida que é.

A **Glauciene**, por toda orientação e dedicação. Por toda amizade, paciência e disposição pra colocar em prática os protocolos necessários para a conclusão desse trabalho mesmo com a vida corrida de sempre. Obrigada por tudo mesmo, não sei o que seria de mim sem sua ajuda.

A **Taty** que chegou há pouco tempo no laboratório mas já é mais que especial pra mim. Obrigada pela amizade, força, dicas, paciência, novos conhecimentos, compartilhamentos de experiências, por matar minha fome com o biscoitinho com gosto de infância. Você foi um presente de Deus na minha vida, obrigada por existir.

A **Pollyana Peixoto**, por aturar meu mau humor, por me ensinar a pedir, por acreditar que eu seria capaz desde o início dessa jornada. Meu muito obrigada a você por tudo Poly. Por me acompanhar nos dias de experimento, por sempre querer saber como eu estava antes de qualquer coisa. Você foi muito importante para que esse trabalho chegasse onde chegou.

A **Nara**, que sempre me incentivou e esteve disposta a me ajudar em todas as fases do meu trabalho. Pelas palavras de apoio e por sempre acreditar que meu trabalho seria um sucesso. Por estudar comigo pra provas e ser uma aconselhadora em vários aspectos na minha vida. Você é muito especial pra mim Narinha.

Ao **Silas** que é a pessoa mais solícita que eu conheço, e com o coração maior que o mundo todo. Sempre disposto a ajudar a todos e comigo não foi diferente. Obrigada por tudo Silas.

As minhas amigas que recebi nessa jornada científica que vou levar pra vida, **Mayara e Carol** que sempre colocam um sorriso no meu rosto. Que sei o quanto torcem pelo meu sucesso e isso sempre foi muito importante pra mim. Vocês são essenciais na minha vida “Bests”.

As minhas amigas **Prycylla, Andressa, Mariana, Yáscara, Débora, Thai, Waldner, Sandra** e demais amigos que me ajudam tanto e podem nem fazer idéia. Muito obrigada, vocês são muito importantes pra mim e fizeram meus dias serem mais leves durante essa jornada.

Aos colegas do LHE, Phablo, Antônio Melo, Polyana Dalpiaz, Marcos Birocale, Leonardo Escuto, Felipe e Priscila, por estarem sempre disponíveis pra tirar minhas dúvidas, tratar os animais ou simplesmente pra conversar e descontrair. Obrigada a todos do LHE pelos incontáveis almoços e comemorações e de me fazer sentir em casa, com amor, comida e risadas. Simples almoços que se tornam momentos especiais e que ficarão sempre guardados com muito carinho.

Aos animais, que deram suas vidas para a realização desse projeto e contribuem para o desenvolvimento e compreensão da ciência. Eles merecem todo respeito,

reconhecimento, e principalmente cuidados adequados durante todos os procedimentos, pois sem eles nada disso seria possível.

A UFES e ao PPGCF pela estrutura que permite a minha formação e a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro fornecido a essa e a tantas outras pesquisas em nossa instituição.

A todos que não listados aqui, mas que merecem meu muito obrigado por de alguma forma terem contribuído com esse trabalho e tornaram possível sua conclusão, nem que seja por um sorriso. Ninguém realiza nada sozinho, essa conquista é também de todas as pessoas que cruzaram meu caminho e me ajudaram a estar aqui.

Gratidão a Deus e as batalhas vencidas até aqui. **MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. OBJETIVOS .....	28
2.1. OBJETIVO GERAL .....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	28
3.1.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.2. DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL .....	30
3.3. PREPARAÇÃO DO KEFIR.....	31
3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.4.1. ANESTESIA E EUTANÁSIA.....	31
3.4.2. OVARECTOMIA.....	32
3.5. Medidas de Pressão Arterial Sistólica .....	32
3.6. REATIVIDADE VASCULAR.....	33
3.7. COLETA DE AMOSTRAS .....	35
3.8. ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO – DIHIDROETÍDEO(DHE).....	35
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
4. RESULTADOS .....	37
4.1. Peso corporal, órgãos e pressão arterial.....	37
4.2. Reatividade Vascular .....	38
4.2.1. Curvas de ACh.....	38

4.2.2. Avaliação da Via do Ácido Aracádônico – Ciclooxigenase .....	39
4.2.3. Avaliação da via das Espécies Reativas ao Oxigênio .....	43
4.3. Expressão Proteica .....	50
4.4. Quantificação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (DHE).....	51
5. DISCUSSÃO .....	52
5.1. Avaliação da Via do Ácido Aracádônico – Ciclooxigenase .....	54
5.2. Via das EROs e sistema antioxidante .....	56
5.3. Mecanismos adicionais do Kefir .....	61
6. Conclusão .....	64
7. Referências.....	65

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Cronograma de experimentos.

**Figura 2:** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos SHAM, OVX e OVX-K.

**Figura 3:** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos (OVX, OVX+INDO e OVX-K, OVX-K+INDO) na ausência e na presença de Indometacina (inibidor inespecífico da COX).

**Figura 4:** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX-K e OVX na presença de NS 398 (inibidor específico da COX-2).

**Figura 5:** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K na presença de Apocinina.

**Figura 6:** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX-K e OVX na presença de Catalase.

**Figura 7:** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX-K e OVX na presença de Tiron.

**Figura 8:** Análise por Western blot em ramos vasculares mesentéricos de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K. Efeitos do tratamento com kefir na expressão das proteínas ECA e Catalase.

**Figura 9:** Análise por Western blot em ramos vasculares mesentéricos de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K. Efeitos do tratamento com kefir na expressão da proteína TNF- $\alpha$  (A) e SOD-2 (B).

**Figura 10:** Análise por Western blot em ramos vasculares mesentéricos de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K. Efeitos do tratamento com kefir na expressão da proteína Nox-2.

**Figura 11:** (A) Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por dihidroetídeo na artéria mesentérica de terceira ordem dos ratos do grupo Ovariectomizado (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com Kefir (OVX-K).

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACh</b> Acetilcolina	<b>ER<math>\beta</math></b> Receptor de estrogênio beta
<b>AGCC</b> ácido graxo de cadeia curta	<b>ET-1</b> Endotelina
<b>Akt</b> Proteína quinase B	<b>ETA</b> Receptor de endotelina A
<b>BH<sub>4</sub>, 5, 6, 7, 8</b> -Tetrahidrobiopterina	<b>ETB<sub>2</sub></b> Receptor de endotelina B <sub>2</sub>
<b>BK<sub>Ca</sub></b> Canal para potássio ativado por cálcio de larga condutância	<b>GCs</b> Guanilato ciclase solúvel
<b>cAMP</b> 3'5' Monofosfato cíclico de adenosina	<b>GP<sub>ER</sub></b> Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
<b>cGMP</b> 3'5' Monofosfato cíclico de guanosina	<b>EDH</b> Hiperpolarização dependente do endotélio
<b>CMLV</b> Célula do músculo liso vascular	<b>HS</b> Hormônio Sexual
<b>COX</b> Ciclooxygenase	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de hidrogênio
<b>CYP</b> Citocromo P450	<b>INDO</b> Indometacina
<b>DAG</b> Diacilglicerol	<b>IP<sub>3</sub></b> Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>DCVs</b> Doenças Cardiovasculares	<b>L-NAME</b> N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster
<b>DHE</b> Dihidroetídio	<b>MI</b> Microbiota Intestinal
<b>DMSO</b> Dimetilsulfóxido	<b>MLV</b> Músculo Liso Vascular
<b>ECA</b> Enzima conversora de angiotensina	<b>NADPH</b> Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>eNOS</b> Óxido Nítrico Sintase Endotelial	<b>NO</b> Óxido Nítrico
<b>EP</b> Receptor de prostanóide E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub>	<b>NOS</b> Óxido Nítrico Sintase
<b>EROs</b> Espécies reativas de oxigênio	<b>NOX</b> NADPH oxidase
<b>ER<math>\alpha</math></b> Receptor de estrogênio alfa	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> Ânion superóxido
	<b>PA</b> Pressão arterial

**PGI<sub>2</sub>** Prostaciclina

**PE** Fenilefrina

**SCV** Sistema cardiovascular

**SERM** modulador seletivo dos  
receptores de estrogênio

**SHR** Rato espontaneamente  
hipertenso

**SOD** Superóxido dismutase

**TRH** Terapia de reposição hormonal

**TNF $\alpha$**  Fator de necrose tumoral alfa

**TP** Receptor tromboxano-  
prostanóide

**TXA<sub>2</sub>** Tromboxano

## RESUMO

Estudos apontam que o estrogênio contribui para o bom funcionamento do sistema cardiovascular, uma vez que pode modular a geração de fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio. Contudo, em mulheres na fase pós-menopausa, o uso de terapia de reposição hormonal vem apresentando riscos que potencialmente superam os benefícios. Visando a necessidade da busca de novas terapias, este trabalho investiga o tratamento não farmacológico com a bebida probiótica Kefir.

Foram utilizadas ratas wistar de 8 semanas de idade, isoladas as artérias mesentéricas de terceira ordem para o protocolo de reatividade vascular. Foram realizadas curvas concentração-resposta à ACh após pré-contração com fenilefrina. A avaliação foi realizada na ausência e na presença de inibidores - Indometacina (INDO) – Inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX); NS 398 – Inibidor seletivo da COX-2; Apocinina – Inibidor da NADPH oxidase; Catalase – enzima que degrada o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ ; Tiron – “sequestrador” do ânion superóxido. Adicionalmente, as artérias mesentéricas de resistência foram dissecadas e a expressão proteica da enzima conversora de angiotensina (ECA), da catalase, da superóxido dismutase (SOD), NOX-2 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) teciduais foi analisada. A geração de espécies reativas de oxigênio foi realizada via fluorescência usando dihidroetídio (DHE).

A indometacina reduziu a resposta de relaxamento à ACh no grupo OVX na curva concentração-resposta, enquanto no grupo Kefir, não alterou o relaxamento. O que também pode ser observado na presença NS 398. A Apocinina e o Tiron não alteraram a resposta de relaxamento à ACh no grupo OVX e nem no grupo OVX-K. Por outro lado, em presença de catalase, a resposta à ACh foi reduzida em ambos os grupos, porém houve uma redução mais acentuada no grupo OVX. O grupo Kefir apresentou aumento da expressão proteica da ECA e da catalase, em relação ao grupo OVX. Em relação a quantificação da produção de ânion superóxido, o grupo OVX-K apresentou menor produção quando comparado ao grupo OVX, embora a expressão proteica da NOX-2 não ter apresentado diferença entre os grupos.

Concluimos que o Kefir em ratas ovariectomizadas reduz a participação de via oxidativa ( $H_2O_2$ ), aumenta a via antioxidante (catalase) e reduz uma via inflamatória (COX-2) na resposta a ACh em vasos de resistência de ratas OVX quando comparadas ao grupo não tratado, o que pode demonstrar ser um produto benéfico no tratamento preventivo da disfunção vascular que ocorre no período da pós-menopausa.

**Palavra-chave:** kefir, ovariectomia, endotélio, reatividade vascular, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Studies have shown that estrogen contributes to the proper functioning of the cardiovascular system, since it can modulate the generation of relaxation and contraction factors derived from the endothelium. However, in postmenopausal women, the use of hormone replacement therapy has been presenting risks that potentially outweigh the benefits. Aiming at the need to search for new therapies, this work investigates the non-pharmacological treatment with the probiotic drink Kefir.

8-week-old adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used, isolated the third order mesenteric arteries for the vascular reactivity protocol where concentration-response curves to ACh were performed after pre-contraction with phenylephrine. The evaluation was carried out in the absence and presence of inhibitors - Indomethacin (INDO) - Non-selective cyclooxygenase inhibitor (COX); NS 398 – COX-2 selective inhibitor; Apocynin - NADPH oxidase inhibitor; Catalase - enzyme that degrades  $H_2O_2$  into  $H_2O$  and  $O_2$ ; Tiron - “scavenger” of the superoxide anion (oxidative stress). In addition, the mesenteric resistance arteries were dissected and protein expression of angiotensin-converting enzyme (ACE), catalase, superoxide dismutase (SOD), and tissue tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) analyzed. In addition, we also evaluated the fluorescence of superoxide anions.

Indomethacin reduced the relaxation response to ACh in the OVX group in the curved concentration response, while in the Kefir group, it does not alter or relax. This can also be observed in the presence of NS 398. Apocynin and Tiron did not alter the relaxation response of ACh in the OVX group or in the OVX-K group. On the other hand, in the presence of catalase, the response to ACh was reduced in the OVX and OVX-K group, however this reduction was greater in the OVX group. The Kefir group shows increased protein expression of ACE and catalase, compared to the OVX group. Regarding the quantification of superoxide production, the OVX-K group has the lowest production when compared to the OVX group, although the NOX-2 protein expression did not show any difference between the groups.

We conclude that Kefir in ovariectomized rats reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, increased catalase-antioxidant enzyme, COX2 inflammatory pathway in the response to ACh in resistance vessels of OVX rats when compared to the untreated group. Altogether, we conclude that kefir is a beneficial product a beneficial product in the preventive treatment of vascular dysfunction characteristic of post-menopausal period.

**Key words:** kefir, ovariectomy, endothelium, vascular reactivity, oxidative stress.



## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade no mundo (Murray & Lopez, 1996, SOBRAC, 2003; OPAS/WHO, 2017). Anualmente mais pessoas morrem por essas enfermidades do que por qualquer outra causa (OPAS/WHO, 2017). Estudos mostram que as DCV são menos frequentes em mulheres na pré-menopausa do que em homens, o que sugere forte associação entre o dimorfismo sexual e as diferenças observadas na ocorrência dessas doenças. Porém, essa disparidade diminui na fase pós-menopausa, que ocorre na segunda metade de vida das mulheres, sugerindo que as alterações hormonais que ocorrem nesse período estejam intimamente relacionadas com a fisiopatologia de doenças cardiovasculares (Giosia, 2018), o que está associado com efeito cardioprotetor dos hormônios sexuais ovarianos (Taddei et al., 1996; Jousilahti et al., 1999).

O hormônio sexual (HS) mais estudado no sistema cardiovascular (SCV) é o estrogênio. Os efeitos benéficos no SCV observados no período reprodutivo podem ser justificados pelo fato do estrogênio modular a geração de fatores de relaxamento derivados do endotélio (Dantas et al., 1999; Golding & Kepler, 2001, Santos et al., 2004). No endotélio vascular, ocorre a produção de fatores vasodilatadores como o óxido nítrico (NO), hiperpolarização dependente do endotélio (EDH) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Em contra partida a esse sistema, existe também a produção de fatores vasoconstritores como endotelina (ET-1) e tromboxano (TXA<sub>2</sub>), entre outros. Esse conjunto de fatores, é responsável pela homeostase vascular (Furchgott & Vanhoutte, 1989; Stankevicius et al., 2003; Qiao et al., 2008; Félétou & Vanhoutte, 2009). Adicionalmente, os efeitos vasodilatadores do estrogênio podem ser explicados por dois mecanismos: o

efeito direto sobre o músculo liso vascular, inibindo canais de cálcio voltagem dependente do tipo L ou estimulando a corrente de saída de potássio (Ruehlmann et al.,1998; Valverde et al.,1999; Mazzuca *et al.*, 2015), e o efeito dependente do endotélio (Farhat et al.,1996; Jun et al.,1998; Mendelsohn, 2000; Golding & Kepler, 2001), quando age estimulando a produção de fatores de relaxamento via endotélio.

Adicionalmente, o estrogênio, atua por mecanismos genômicos (clássico) e não genômicos (extra-nucleares). A ação genômica está relacionada com a ligação a receptores intracelulares do tipo alfa ( $ER\alpha$ ) ou beta ( $ER\beta$ ). Esses receptores são expressos em diversos tecidos incluindo nos vasos sanguíneos (Kuiper et al., 1997; Brunette & Leclerc, 2002; Shearman et al., 2003; Orshal & Khalil, 2004, Taylor et al., 2009). Ao entrar em contato com as células do tecido alvo, o estrogênio atravessa a membrana plasmática e forma o complexo hormônio-receptor (Jensen & DeSombre, 1973), interagindo com seu receptor específico intracelular (Nadal et al., 2001; Norman et al., 2004). Esse complexo então, passa por uma dimerização, e tem acesso ao núcleo, onde atua como cofator de transcrição. No nucleoplasma, há ligação a uma região específica do DNA resultando em regulação da expressão de genes-alvo. Essa ligação ao DNA estimula ou inibe as transcrições gênicas, aumentando os níveis de RNAm (Norman et al., 2004), que após o processo de tradução, leva à síntese de proteínas específicas (O'malley & Means, 1974). Essas proteínas estão relacionadas às respostas celulares e ativação de cascatas enzimáticas, modificando a fisiologia celular (Nadal et al., 2001; Norman et al., 2004).

Além do mecanismo clássico, o estrogênio, como os demais esteróides, pode atuar por mecanismos conhecido como extra-nucleares, onde se liga a

receptores presentes na membrana plasmática das células alvo e ativa respostas celulares mais rápidas por segundos mensageiros específicos (Kelly & Levin, 2001). Esses mecanismos podem contribuir para modulação vascular ao estimular o relaxamento dependente do endotélio, enquanto a deficiência desse hormônio pode conduzir a disfunção endotelial (Orshal & Khalil.,2004; Wang et al., 2012; Cutini et al. 2012). Estudos mostram que em anéis de aorta de ratas com deficiência de estrogênio, a indução da acetilcolina (ACh) ao relaxamento foi menos efetivo, além do aumento da contração a fenilefrina (PE) quando comparados a animais tratados com estrogênio (Ribeiro et al., 2017). Nesse mecanismo, podemos citar um terceiro receptor de estrogênio, o receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER). que tem sido relacionado com vias de sinalização rápidas em resposta a ligação do estrogênio (Carmeci et al., 1997; Takada et al., 1997, Filardo et al., 2000).

Diversos estudos sugerem que a disfunção endotelial está diretamente relacionada à fisiopatologia das DCV. Nas doenças vasculares ocorre um desequilíbrio na produção e biodisponibilidade dos agentes vasodilatadores, favorecendo o aumento de fatores vasoconstritores derivados do endotélio (Cohen et al., 1983; Furchgott & Vanhoutte, 1989; Stankevicius et al., 2003; Qiao et al., 2008; Félétou & Vanhoutte, 2009). Esse desequilíbrio pode levar a aumento do tônus vascular, processo aterosclerótico o que por sua vez, levam a aumento da pressão arterial e eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e outros (Moreau et al., 2012).

Desta forma, podemos compreender a razão de mulheres na fase pós-menopausa apresentarem mais eventos cardiovasculares (Kurt & Buyukafsar, 2013; Schenkel *et al.*, 2014), evidenciando a ação dos HS no que se refere à

cardioproteção (Barton & Meyer, 2009; Yang & Reckelhoff, 2011; Knowlton & Lee, 2012) sugerindo a reposição hormonal na fase de pós-menopausa. Entretanto a terapia de reposição hormonal (TRH), cuja a restauração dessa proteção em mulheres na pós-menopausa era esperada, ainda é algo controverso (Manson et al., 2003; Wassertheil-smoller et al., 2003; Yildirim, 2010).

Gompel e colaboradores (2011) sugerem que a TRH em mulheres pós-menopausa confere uma proteção eficiente contra a progressão da doença arterial por corrigir a deficiência de estrogênio, embora estudos tenham mostrado que esse tipo de terapia não seja a mais interessante em termos de prevenção de sintomas vasomotores, osteoporose e doenças cardiovasculares (Hulley et al., 1998; Rossouw et al., 2002; Berg et al., 2006; Valdes & Bajaj, 2019), uma vez que foram observados vários efeitos colaterais, como câncer de mama e doenças tromboembólicas (Renoux et al., 2017). Desta forma, ficou evidenciada a necessidade de investigar possíveis terapias seguras para serem utilizadas pela mulher nessa fase da vida.

Na busca por terapias alternativas, a tibolona, o raloxifeno e tamoxifeno, em estudos anteriores do nosso laboratório em ratas com deficiência de hormônios sexuais femininos, foram capazes de normalizar a reatividade vascular em coronária, mesentérica e aorta, aliados à redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e aumento na concentração de peptídeo natriurético atrial plasmático e cardíaco (Wong et al., 2006; Borgo et al., 2011; Medeiros et al., 2012; Lamas et al., 2017). O raloxifeno e o tamoxifeno são classificados como moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs). Os SERMs são uma classe de compostos sintéticos que atuam como antagonistas ou

agonistas dos receptores de estrogênio, de acordo com os tecidos alvo (Kushner et al., 2000; Arpino et al., 2008). Enquanto a tibolona é metabolizada no organismo formando vários metabólitos, que podem agir em receptores de estrogênio e de progesterona (Kloosterboer et al., 2004).

Essas drogas podem agir como agonistas em receptores de estrogênios (Kushner et al., 2000; Arpino et al., 2008, Henriques et al., 2010) e apesar dos resultados promissores mostrados em diversos estudos, estas terapias também vêm apresentando riscos que potencialmente superam os benefícios, como surgimento de câncer de mama com a tibolona (Beral et al., 2003; Cummings et al., 2008) e doenças tromboembólicas com raloxifeno (Barrett-Connor et al., 2006) e tamoxifeno (Onitilo et al., 2009), de forma semelhante a terapia de reposição hormonal (TRH) clássica.

Além disso, outro aspecto que tem mostrado grande influência na instalação de DCV é a microbiota intestinal (MI). Estudos recentes mostraram que em pessoas saudáveis, a diversidade de bactérias benéficas que compõe a MI é maior que em pacientes com DCV, o que sugere a importância do papel da MI nas DCV (Li et al., 2017; Amadei et al., 2019).

Os microorganismos habitam quase todo corpo humano e na maioria das vezes, vivem em uma relação harmônica com seu hospedeiro. Trilhões de micróbios associam-se a tecidos específicos do organismo de forma que atualmente, se tornou essencial para várias funções fisiológicas do hospedeiro (Backhed et al., 2005; Schwabe , et al., 2013; Grover & Kashyap, 2014).

Para garantir a homeostase intestinal, é necessário haver uma composição bacteriana equilibrada além de manter a diversidade do microbioma, contendo

maior abundância de enzimas capazes de sintetizar metabólitos, como por exemplo o butirato (ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)), que fornece energia para células epiteliais do cólon, além de exibir propriedades capazes de modular o sistema imune e anti-inflamatório contribuindo para a manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal (Riviere et al., 2016; Xiao, 2017; Baker *et al*, 2017). Consequentemente, o desequilíbrio da MI, chamada disbiose, leva a redução da diversidade bacteriana, o que pode levar a uma resposta inflamatória exacerbada capaz de alterar o perfil metabólico prejudicando o epitélio intestinal (Baker, 2017). Além disso, a alteração na homeostase intestinal leva a redução das junções célula-célula, do tipo *Tight junctions* levando a um aumento da permeabilidade e translocação bacteriana. A translocação bacteriana pode levar à inflamação sistêmica, levando à exacerbação ou indução de doenças (Deitch, 1990; Baker, 2017; Cavalcanti et al, 2018).

Estudos têm mostrado a relação estreita entre a disbiose intestinal e o metabolismo de estrogênio (Baker, 2017). O estrogênio é desconjugado por uma enzima que o transforma em suas formas ativas e que é secretada através da MI. Quando esse processo é prejudicado pela disbiose, a redução da desconjugação consequentemente leva a diminuição dos estrogênios circulantes que pode acarretar no aparecimento de doenças relacionadas ao hipoestrogenismo, e quando isso ocorre, esse relacionamento entre a MI e estrogênio é reestruturado de acordo com as novas circunstâncias (Homma, 2005; Baker, 2017; Vieira, 2017).

Homma, 2005 mostrou que fêmeas são mais resistentes a lesões intestinais que machos, apontando que os hormônios sexuais estão envolvidos na

modulação da integridade epitelial do intestino. Como citado anteriormente, vários tecidos expressam receptores de estrogênio, incluindo intestino, cérebro, osso e tecido adiposo. Essa expressão ampla, demonstrou que o estrogênio influencia uma diversidade de respostas fisiológicas, incluindo desenvolvimento neural, saúde cardiovascular, densidade óssea e doenças neoplásicas, incluindo cânceres (Felson et al., 1993; Fu et al., 2016; 2017)

Recentemente, nosso grupo de pesquisa iniciou estudos com alimentos funcionais em animais hipertensos machos (Brasil, et al., 2018). Neste contexto, além dos dois estudos produzidos pelo nosso grupo, outros estudos experimentais e clínicos têm demonstrado os efeitos benéficos dos alimentos funcionais (Friques et al., 2015, Xiao et al., 2017; Bengoa et al., 2019), incluindo a diminuição da pressão arterial (PA) e a atenuação da disfunção endotelial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados cronicamente com estes produtos (Friques et al., 2015).

Além dos dois estudos produzidos pelo nosso grupo, outros estudos experimentais e clínicos têm demonstrado os efeitos benéficos dos alimentos funcionais (Friques et al., 2015, Xiao et al., 2017; Bengoa, 2019), incluindo a diminuição da pressão arterial (PA) e a atenuação da disfunção endotelial em ratos SHR tratados cronicamente com estes produtos (Friques et al., 2015).

Entre as variedades de alimentos funcionais cientificamente validados disponíveis, um foco importante das investigações são os leites fermentados contendo bactérias ácido lácticas, chamados probióticos, que segundo a OMS, são produtos alimentares contendo microrganismos vivos, cujo consumo em quantidades adequadas, traz benefícios à saúde (*World Health Organization – WHO, 2001*). Estudos têm demonstrado diversos benefícios à saúde humana

com a utilização de probióticos visando a prevenção de doenças que são cada vez mais comuns como a hipertensão, obesidade e síndrome metabólica (Friques et al, 2015; Upadrasta & Madempudi 2016, Kang & Cai 2018). Um dos probióticos que tem se tornado destaque por ser constituído por diversos microrganismos que podem agir de forma simultânea trazendo muitos benefícios ao indivíduo que o ingere é o Kefir (Arora et al., 2013).

O Kefir é uma bebida fermentada pela ação de bactérias e leveduras que estão associadas simbioticamente nos chamados grãos de Kefir. A bebida teve origem na Ásia central, entre as montanhas Caucásicas e a Mongólia e há 2000 a.C. passou de geração em geração como uma grande riqueza familiar entre as tribos do Cáucaso por trazer promessas de vários benefícios para a saúde. A palavra “Kefir” é originada do nome eslavo “Keif”, que significa “bem estar” devido à sensação gerada naqueles que o consomem (Farnworth, 2005; Damiana et al., 2017).

Evidências no uso de produtos lácteos tem sido descritas desde as escrituras sagradas e também nos livros do hinduísmo (Gasbarrini et al. 2016). Na Bíblia, no livro Gênesis (18:1-8), onde se diz que Abraão ofereceu ao Senhor “vitela, pão e leite azedo”. Segundo a lenda, o profeta Maomé (570-632 a.c.) deu como presente os primeiros grãos de kefir aos ancestrais dos alpinistas do Cáucaso junto com a receita secreta do Kefir para os habitantes da região (Gasbarrini et al. 2016). Assim, o Kefir é uma das mais antigas bebidas de leite fermentado, a tecnologia de produção e da utilização de uma cultura específica se desenvolveram através dos tempos (Wszolek et al., 2007).

A fermentação do leite usando grãos de kefir produz dois componentes distintos: uma fração bacteriana sólida que atua diretamente na microbiota intestinal (efeito probiótico) e uma fração não bacteriana solúvel contendo os componentes resultantes da atividade microbiana (efeito biogênico) (Vinderola et al., 2006). Friques e colaboradores, 2015, demonstraram que o kefir foi capaz de atenuar a disfunção endotelial em vasos de condutância de animais SHR por meio da diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) vascular e, conseqüentemente, restaurou a biodisponibilidade de NO. O tratamento com kefir por 60 dias também foi capaz de melhorar parâmetros inflamatórios em animais SHR e reduzir a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Brasil, 2018). Além disso, Klippel et al. 2016, observaram que o kefir diminuiu a pressão arterial em SHR ao longo do tratamento e promoveu uma melhora na sensibilidade do barorreflexo.

Dessa forma, levantamos a hipótese de que o tratamento com o uso do kefir apresenta efeitos terapêuticos para prevenção de alterações vasculares e estado inflamatório de animais com privação dos hormônios ovarianos, estado similar ao observado em mulheres na fase da pós menopausa .

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar se o tratamento com o probiótico Kefir é capaz de promover a prevenção de alterações vasculares em ratas com privação dos hormônios sexuais ovarianos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar o efeito do tratamento com Kefir em ratas ovariectomizadas, sobre:

- Valores de pressão arterial sistólica;
- A reatividade vascular de anéis de artérias mesentéricas de resistência na resposta de relaxamento à ACh;
- A participação da via dos prostanóides derivados da ciclooxigenase e das espécies reativas ao oxigênio nas respostas de reatividade vascular à ACh;
- A expressão de proteínas: NADPH Oxidase (NOX-2), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase, Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), e Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Animais experimentais**

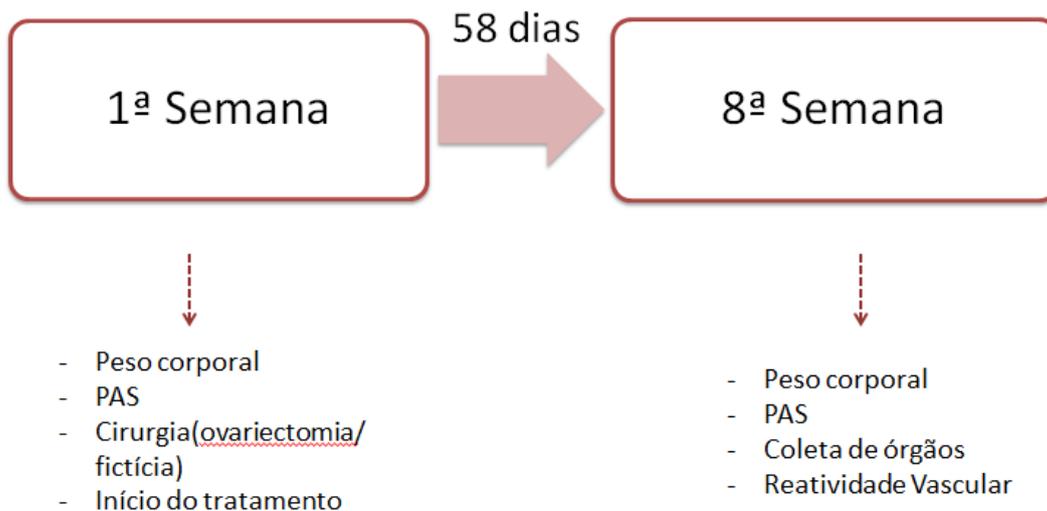
Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas com 8 semanas de idade. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério da UFES e mantidos em temperatura controlada (22 °C), iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12 horas), umidade (50 %), além de acesso à água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, descritos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA MCT, 2016) e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (021/2018).

### **3.1.1. Grupos experimentais**

Os animais foram aleatoriamente separados em três grupos experimentais:

- 1) SHAM: grupo controle que passou por cirurgia fictícia e recebeu tratamento, uma vez ao dia, com o veículo (leite) por administração orogástrica durante 58 dias.
- 2) OVX: grupo ovariectomia, que recebeu tratamento com veículo (leite), uma vez ao dia, por administração orogástrica durante 58 dias.
- 3) OVX-K: grupo ovariectomia + kefir, tratados com kefir (5%,m/v) na dose de 0,3mL/100g, uma vez ao dia, por administração orogástrica durante 58 dias.

Os animais foram pesados no início do protocolo experimental e separados aleatoriamente entre os grupos. Ao final do tratamento, o peso corporal dos animais foi verificado obtendo-se os valores de pesos de ambos os grupos.



**Figura 1.** Cronograma de experimento

Um grupo SHAM foi tratado inicialmente para comparar alguns parâmetros como peso de órgãos,  $\Delta$  peso corporal e pressão arterial com o grupo OVX, porém não foram realizados outros protocolos neste grupo.

### 3.2. Determinação da fase do ciclo estral

O ciclo estral das fêmeas foi monitorado por meio de esfregaços vaginais. As células epiteliais vaginais foram coletadas diariamente entre 08:00 h e 09:00 h e examinados por microscopia óptica conforme descrito por Marcondes *et al.* (2002) para identificação dos tipos de células presentes nas diferentes fases do ciclo estral. Para evitar quaisquer influências provocadas pela variação hormonal em diferentes fases do ciclo, as fêmeas foram consideradas aptas

para os protocolos experimentais quando estavam na fase do proestro, caracterizada por altos níveis de estrogênio (Dalle Lucca *et al.*, 2000).

### **3.3. Preparação do kefir**

A bebida Kefir foi preparada por adição de grãos de Kefir em leite integral pasteurizado em uma proporção de 5 % (m/v) e mantidos à temperatura ambiente. Após 24 horas, esta mistura foi filtrada e o produto resultante foi refrigerado a 10°C para permitir o crescimento de leveduras durante 24 horas, estando pronto para consumo após esse período.

### **3.4. Procedimentos experimentais**

#### **3.4.1. Anestesia e eutanásia**

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com ketamina/xilazina (70/10 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal). Após os protocolos experimentais, os animais foram submetidos a eutanásia por decaptação.

### **3.4.2. Ovariectomia**

Após anestesia intraperitoneal por mistura de ketamina/xilazina ( $70/100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , *i.p.*), os animais foram submetidos a uma incisão de 1 a 1,5cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários e ligadura da trompa uterina. Após a retirada dos ovários, foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. Ao final do procedimento os animais foram recolocados em gaiolas individuais.

### **3.5. Medidas de pressão arterial sistólica**

A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada antes da cirurgia de ovariectomia e após quatro e oito semanas do tratamento com Kefir. As medidas foram obtidas, nos animais acordados, por meio de método indireto não invasivo, pletismografia de cauda. Os animais foram acondicionados em uma câmara aquecida ( $38\text{-}39 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e após, foram colocados no pletismógrafo (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), com um cuff de pulso pneumático acoplados na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor da PAS foi obtido por meio dos sinais do transdutor acoplado a um computador. Todos os animais foram adaptados ao procedimento antes da obtenção de registros. Foram realizadas três medidas testes após verificar se todas as condições estariam adequadas (posição,

adaptação e relaxamento do rato; temperatura e posição do cuff) foram feitas três medidas para o cálculo da média aritmética da PAS de cada animal.

### **3.6. Reatividade vascular**

Os animais foram eutanasiados por decapitação, sem utilização de anestésicos, a fim de evitar a interferência nos padrões de resposta (Hatano *et al.*, 1989) e tiveram as artérias mesentéricas de terceira ordem identificadas, isoladas e dissecadas dos tecidos circundantes não vasculares. Os segmentos arteriais foram seccionados em anéis de 2 mm e montados entre dois fios de tungstênio (40  $\mu\text{m}$  de diâmetro) dentro de câmaras do miógrafo de resistência (Modelo 620M; Danish Myo Tecnologia, Aarhus, Dinamarca) preenchidas com solução de Krebs (composição em mM): NaCl (119), KCl (4.7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4),  $\text{NaHCO}_3$  (14.9),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.17),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.5) e glicose (5.5) a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 %  $\text{CO}_2$  e 95 %  $\text{O}_2$ ), como descrito por Mulvany & Halpern (1977). A circunferência interna foi normalizada para 0,9·IC100, onde os anéis foram gradualmente estirados até que o diâmetro interno correspondesse a uma pressão transmural de 100 mmHg. A viabilidade e integridade do endotélio foram testadas em resposta a administração de acetilcolina (ACh, 10  $\mu\text{M}$ ), nos anéis previamente contraídos com fenilefrina (PE, 3  $\mu\text{M}$ ). Os anéis foram considerados com endotélio intacto quando o relaxamento obtido foi > 70 % em resposta a ACh. As curvas concentração-resposta foram obtidas por adições cumulativas até ACh (10  $\mu\text{M}$ ) após prévia

contração com 3 $\mu$ M PE. A curva concentração-resposta de relaxamento foi realizada na presença e na ausência dos seguintes inibidores:

- Indometacina (INDO, 10 $\mu$ M) – Inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX);
- NS 398 (1 $\mu$ M) – Inibidor seletivo da COX-2;
- Apocinina (30  $\mu$ M) – Inibidor da NADPH oxidase;
- Catalase (1000 U/ml) – enzima que degrada o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>;
- Tiron (0,33 mM) – “sequestrador” do ânion superóxido (estresse oxidativo);

Os inibidores foram incubados 30 minutos antes da curva concentração-resposta a ACh. A porcentagem de relaxamento foi determinada usando o sistema de aquisição de dados LabChart8 (AD Instruments Pty Ltd, New South Wales, Austrália). As respostas de relaxamento evocadas pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contração obtida pela fenilefrina.

### **3.7. Coleta de amostras**

Ao final do estudo os animais foram decapitados e foram retirados fígado, útero, rins, músculo gastrocnêmio, gorduras viscerais e coração. Esses órgãos foram isolados, lavados com solução fisiológica e pesados utilizando uma balança analítica de precisão. A tíbia também foi isolada, limpa e medida seu comprimento. Foi analisada a razão do peso do úmido do órgão (g) pelo comprimento da tíbia (cm) para verificar possível efeito das intervenções no tamanho dos órgãos. Para obtenção do peso da gordura visceral, foi realizado o somatório do peso das gorduras renal, retroperitoneal e mesentérica.

### **3.8. Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio em artérias mesentéricas – dihidroetídeo**

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada utilizando-se um método que envolve o dihidroetídeo (DHE), um precursor não fluorescente do brometo de etídeo, e que permite analisar a produção “*in situ*” de radicais livres. Na presença de EROs o hidretídeo é oxidado dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (E) e 2-hidroxi etídeo (EHO) que tem afinidade pelo DNA nuclear. A formação do etídeo se deve principalmente a oxidação da DHE pelo ânion superóxido, enquanto o EHO é formado pela oxidação da DHE por outras EROs como o peróxido de hidrogênio. Os ratos foram anestesiados, a artéria mesentérica superior foi rapidamente dissecada e imersa em solução de Krebs (8 mM HEPES, 2mM

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2,45mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 11,1mM glicose, pH 7,4) por um período de 2:00 hs. Após, estas foram congeladas em ocetato (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura) e mantidas a -80°C até o momento da análise. Utilizando-se um criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha), cortes transversais das artérias (8 µm) foram obtidos e colocados em lâminas gelatinizadas e secos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com Krebs por 30 minutos a 37°C. Decorrido o tempo, as lâminas tiveram o excesso de líquido removido e, em seguida, foi realizada a incubação DHE 2 µM (30 minutos, 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz (Camporez et al., 2011). A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (DM 2500, Leica Microsystems, Alemanha) equipado com câmera fotográfica, utilizando uma objetiva de fluorescência com aumento de 400X. O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com  $\lambda_{exc}$ : 515-560 nm e detectado com  $\lambda_{em}$ :590 nm. As imagens foram quantificadas pelo programa Image Pro Plus, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias), normalizado pela intensidade do background.

### **3.9. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram analisados utilizando ANOVA de uma ou duas vias com pós-teste de *Fischer* Least Significant Difference (LSD) para as curvas concentração-resposta, analisados de forma pareada e para as demais comparações foi utilizado teste *t de student* não pareado. A normalidade dos dados foi

confirmada pelo teste de Shapiro-wilk. A significância foi estabelecida como  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Peso corporal, órgãos e pressão arterial**

Para avaliar a eficácia da castração, foi verificado o peso úmido do útero de ambos os grupos e como já esperado, houve diferença entre os valores, demonstrando a efetividade da cirurgia, uma vez que, o valor do útero da OVX foi menor do que o valor apresentado pelo grupo SHAM. O Kefir não alterou o peso do útero das OVX (Tabela 1).

Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos do tratamento com o Kefir sobre o coração, fígado e rim, ao final do protocolo experimental, esses órgãos foram retirados e pesados. Em relação a razão do peso do órgão pelo comprimento da tibia (mg/cm) observa-se que não há alteração nesses parâmetros quando as ratas são submetidas à ovariectomia e nem após o tratamento com Kefir. Também não houve alteração na variação do peso corporal e na gordura visceral entre os grupos estudados (Tabela 1). Também foi avaliada a pressão arterial final dos animais de ambos os grupos que demonstrou que após 58 dias de castração, não houve alteração desse parâmetro.

**Tabela 1:** Razão do peso de órgãos pelo comprimento da tíbia em centímetros, pressão arterial final,  $\Delta$  peso corporal e peso da gordura visceral nos grupos OVX e OVX-K.

	Grupos		
	OVX	OVX-K	SHAM
<b>Pressão Arterial Final (mmHg)</b>	129,5 $\pm$ 1,6	124,6 $\pm$ 2,5	127,3 $\pm$ 4,1
<b><math>\Delta</math> Peso corporal (g)</b>	105,5 $\pm$ 4,6	118,0 $\pm$ 6,1	87,5 $\pm$ 12,2
<b>Gordura Visceral (g)</b>	15,79 $\pm$ 1,4	16,74 $\pm$ 1,2	19,3 $\pm$ 1,3
<b>Útero úmido/tíbia (g/cm)</b>	0,0080 $\pm$ 0,002	0,0078 $\pm$ 0,002	0,0200 $\pm$ 0,001 <sup>*#</sup>
<b>Ventrículos / tíbia (g/cm)</b>	0,0196 $\pm$ 0,0003	0,0188 $\pm$ 0,0022	0,021 $\pm$ 0,001
<b>Rim / tíbia (g/cm)</b>	0,0209 $\pm$ 0,0006	0,0216 $\pm$ 0,0007	0,0226 $\pm$ 0,001
<b>Fígado/ tíbia (g/cm)</b>	0,2418 $\pm$ 0,009	0,2612 $\pm$ 0,005	0,2569 $\pm$ 0,010

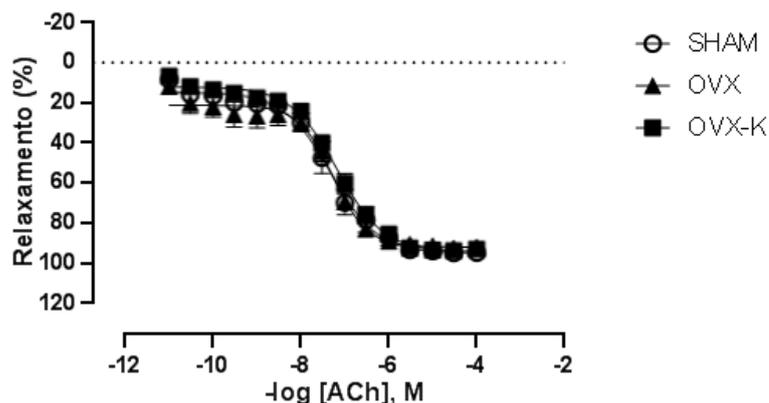
Dados expressos como média  $\pm$  EPM, (n=4 para SHAM n: 12 para os outros grupos) por grupo. ANOVA de uma via. \*p<0,05 quando comparado ao grupo OVX e <sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo OVX-K.

## 4.2. Reatividade vascular

### 4.2.1. Curvas de ACh

A ACh (Figura 2) produziu relaxamento vascular concentração-dependente em todos os grupos estudados. Não observamos diferença entre os grupos estudados em relação ao relaxamento (Figura 2).

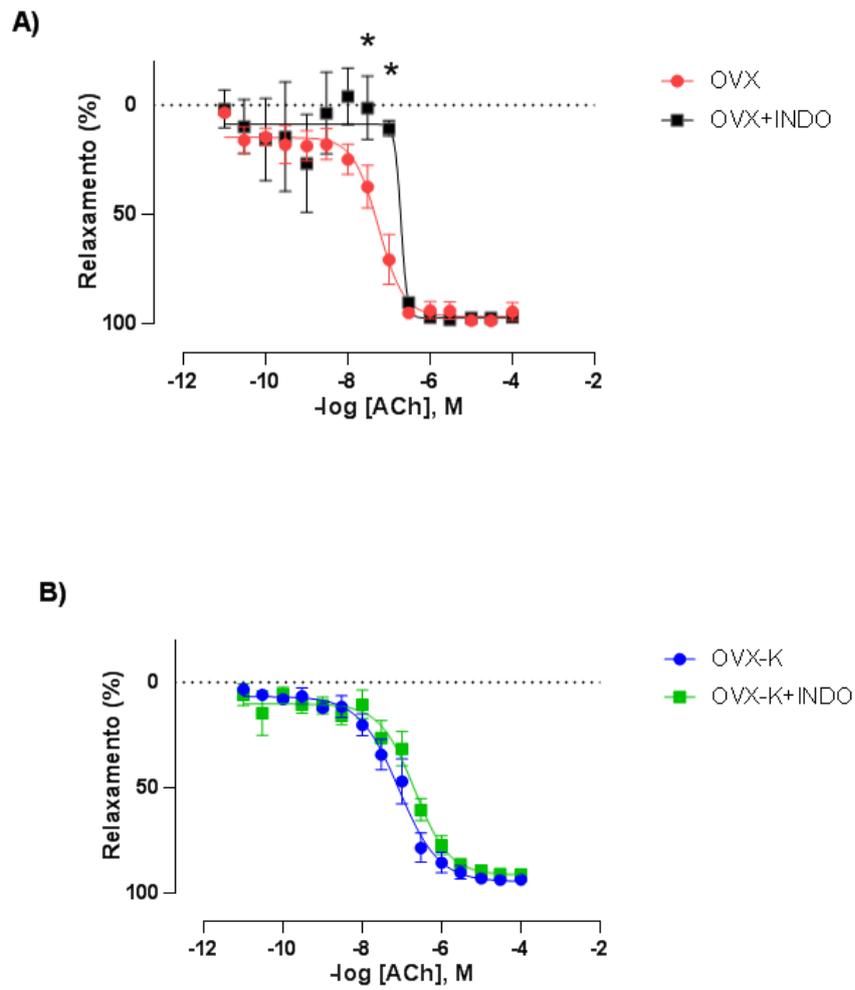
Apesar de não haver diferença no relaxamento entre os grupos, houve interesse em verificar se o Kefir poderia alterar as vias de relaxamento envolvidas na resposta da acetilcolina em ratas ovariectomizadas. A partir deste ponto, os experimentos foram realizados usando o grupo OVX e o grupo OVX+K.



**Figura 2.** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos SHAM, OVX e OVX-K. Dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. (SHAM n= 7, OVX=15, OVX-K= 19).

#### 4.2.2. Avaliação da Via do Ácido Aracdônico (AA) – Ciclooxygenase

Na presença do inibidor inespecífico da COX (Indometacina) pode ser observada uma redução na resposta de relaxamento à ACh no grupo OVX na curva concentração-resposta (Figura 3A), demonstrando participação dessa via nesse grupo. No grupo Kefir, não se observou redução na resposta ao relaxamento a ACh na presença da Indometacina (Figura 3B). Não houve diferença nos valores de AUC, R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub> (Tabela 2).



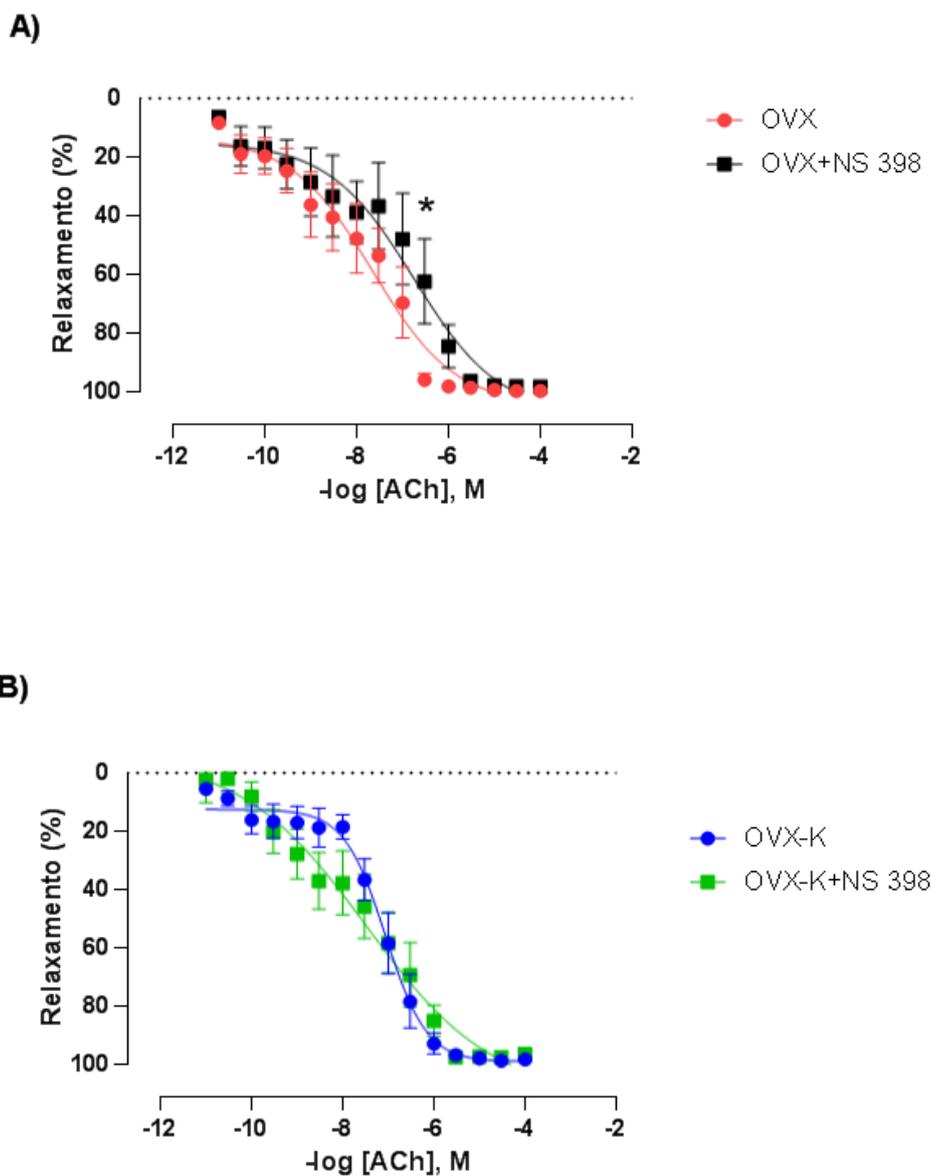
**Figura 3.** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K na ausência e na presença de Indometacina (inibidor inespecífico da COX). Dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de *Fisher* (OVX n= 5; OVX-K n= 9). \* $p < 0,05$  quando comparado ao OVX+INDO (painel A).

**Tabela 2.** Valor da Resposta Máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima ( $pD_2$ ) e área abaixo da curva (AUC) na artéria mesentérica de terceira ordem obtidos por meio das curvas concentração-resposta de Acetilcolina (ACh) nos grupos OVX e OVX-K na ausência e na presença do inibidor.

	INDOMETACINA		
	$R_{m\acute{a}x}$	$pD_2$	AUC
ACh (OVX)	94,5±4,0	7,2±0,2	368,6±19,0
ACh+INDO (OVX)	97,1±1,2	6,8±0,1	377,3±25,4
ACh (OVX-K)	93,5±2,1	7,1±0,2	325,2±16,5
ACh+INDO (OVX-K)	91,0±2,1	6,5±0,1	302,6±11,5

Dados expressos como média ± EPM. Curva controle e após a inibição (OVX n= 5; OVX-K n= 9). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de *Fisher*.

No grupo OVX houve menor resposta ao relaxamento à ACh na presença do inibidor seletivo da COX-2 (NS 398) na curva concentração-resposta, demonstrando participação dessa via nesse grupo (Fig 7A). Não foi observada diferença no grupo OVX-K, apontando alteração promovida pelo tratamento com Kefir (Fig. 7B). Não houve diferença nos valores de AUC,  $R_{m\acute{a}x}$  e  $pD_2$  (Tabela 3).



**Figura 4.** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K na presença de NS 398 (inibidor específico da COX-2). Dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de Fisher (OVX n= 6; OVX-K n= 9). \* $p < 0,05$  quando comparado ao OVX+NS 398 (painel A).

**Tabela 3.** Valor da Resposta Máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), do log da concentração da droga para produzir 50 % da resposta máxima ( $pD_2$ ) e área abaixo da curva (AUC) na artéria mesentérica de terceira ordem obtidos por meio das curvas concentração-resposta de Acetilcolina (ACh) nos grupos OVX e OVX-K na ausência e na presença de inibidores.

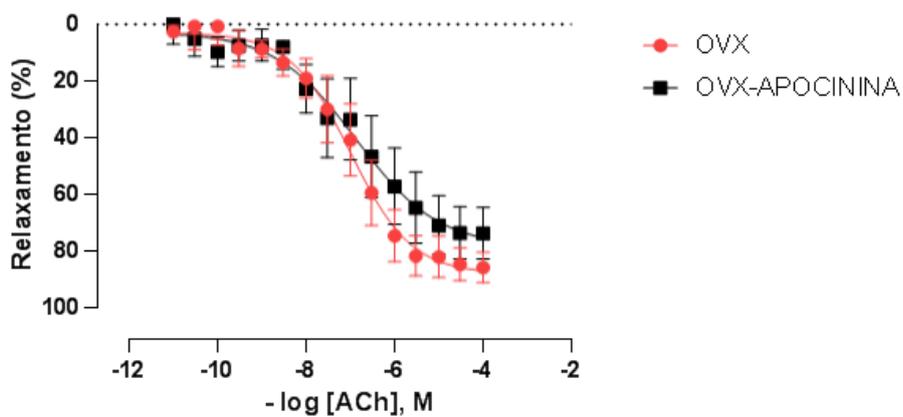
	NS 398		
	$R_{m\acute{a}x}$	$pD_2$	AUC
ACh (OVX)	99,7 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 1,0	422,7 $\pm$ 32,6
ACh+NS 398 (OVX)	98,2 $\pm$ 0,7	8,1 $\pm$ 1,2	369,0 $\pm$ 52,4
ACh (OVX-K)	98,2 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 0,2	356,0 $\pm$ 25,3
ACh+NS 398 (OVX-K)	96,5 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 0,5	372,0 $\pm$ 36,0

Dados expressos como média  $\pm$  EPM, curva controle e após a inibição (OVX n= 6; OVX-K n= 9). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de *Fisher*.

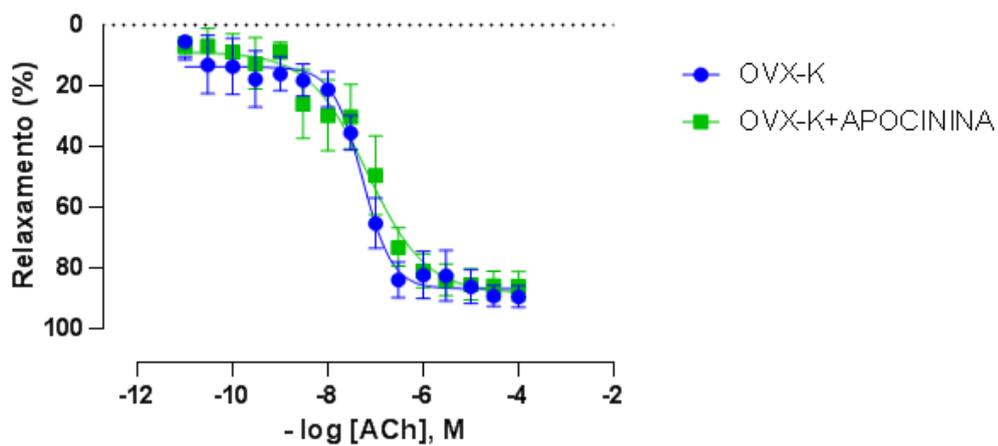
#### 4.2.3. Avaliação da via das Espécies Reativas ao Oxigênio

Embora a literatura seja controversa em relação ao efeito da apocinina sobre a NADPH oxidase (Heumuller, et al., 2008) neste estudo entendemos que essa droga seja um inibidor da referida enzima (Liu JJ et al., 2017; Fuji, et al., 2017). Desta forma, ao inibir a NADPH oxidase com Apocinina, no grupo OVX não houve uma redução na resposta de relaxamento à ACh (Figura 5A). Resposta semelhante foi observado com o grupo tratado com kefir.(Figura 5B e Tabela 4). Não foi observado diferenças entre  $R_{m\acute{a}x}$  e AUC quando comparado no mesmo grupo antes e após o bloqueio (Tabela 3).

A)



B)



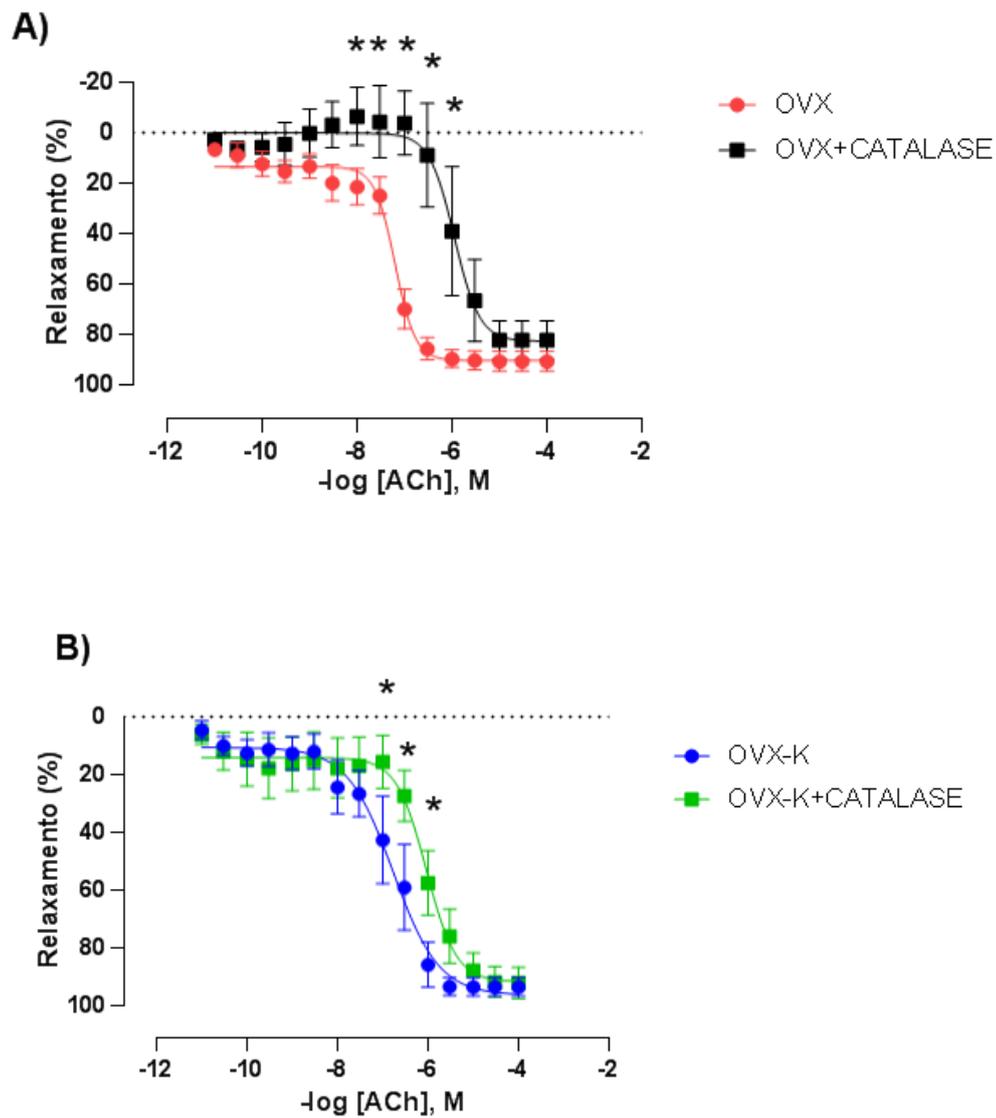
**Figura 5.** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K na presença de Apocinina. Dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de *Fsher* (OVX n = 7; OVX-K n = 7).

**Tabela 4.** Valor da Resposta Máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima ( $pD_2$ ) e área abaixo da curva (AUC) na artéria mesentérica de terceira ordem obtidos por meio das curvas concentração-resposta de Acetilcolina (ACh) nos grupos OVX e OVX-K na ausência e na presença do inibidor.

	<b>APOCININA</b>		
	<b><math>R_{m\acute{a}x}</math></b>	<b><math>pD_2</math></b>	<b>AUC</b>
ACh (OVX)	85,8 $\pm$ 5,3	7,1 $\pm$ 0,3	283,6 $\pm$ 35,4
ACh+APO (OVX)	73,7 $\pm$ 9,0	6,3 $\pm$ 0,5	253,2 $\pm$ 54,0
ACh (OVX-K)	89,4 $\pm$ 3,5	7,4 $\pm$ 0,1	350,0 $\pm$ 14,2
ACh+APO (OVX-K)	86,0 $\pm$ 5,0	7,5 $\pm$ 0,4	325,3 $\pm$ 43,0

Dados expressos como média  $\pm$  EPM, curva controle e após a inibição (OVX n= 7; OVX-K n= 7). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de *Fisher*.

Em presença de catalase (enzima que degrada o peróxido de hidrogênio) a resposta à ACh foi reduzida no grupo OVX, observada na curva concentração-resposta (Figura 6A). No grupo Kefir também houve uma redução na resposta de relaxamento (Figura 6B). Na tabela 6, somente existiu diferença na AUC antes e após o bloqueio no grupo OVX.



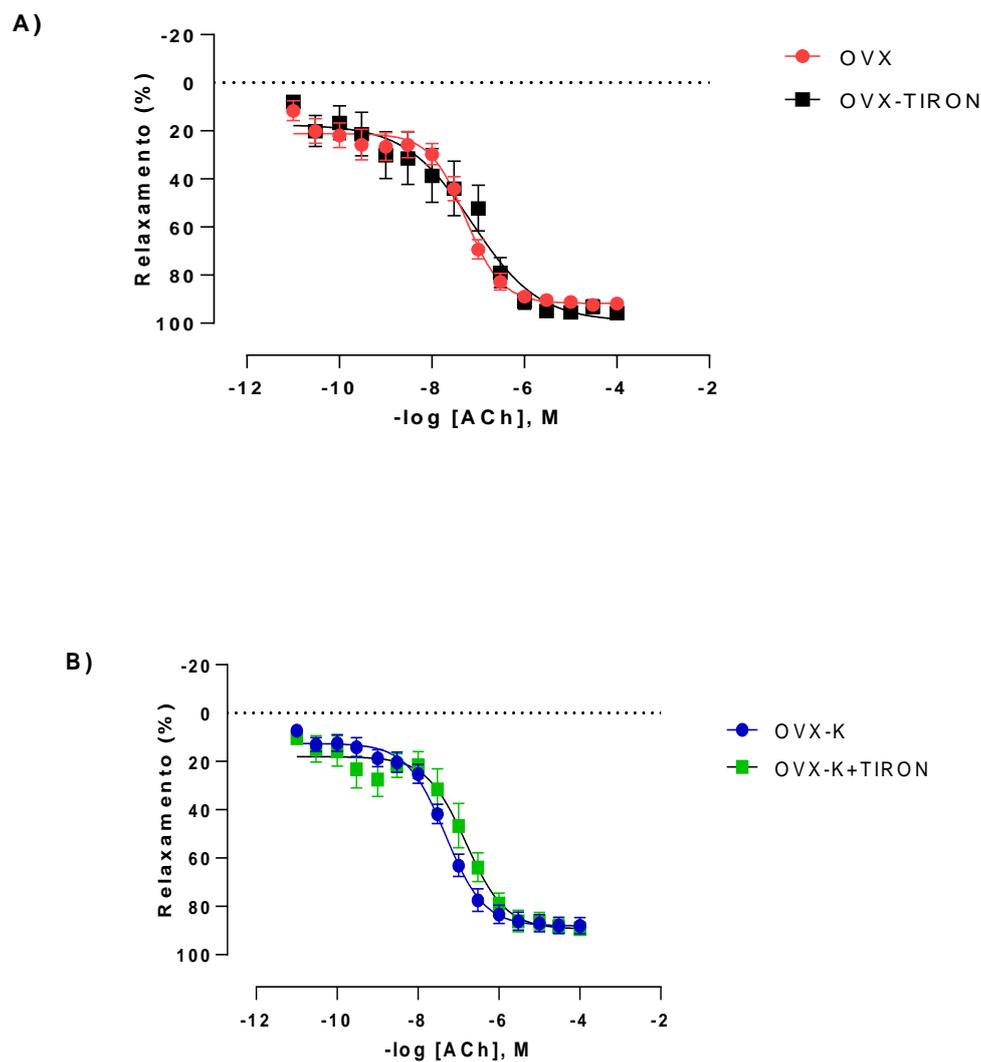
**Figura 6.** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX-K e OVX na presença de Catalase (Enzima que degrada  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ ). Dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de duas vias e pós-teste de Fisher (OVX n= 5; OVX-K n= 5) por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao OVX antes do bloqueio (painel A), ao OVX-K antes do bloqueio (painel B).

**Tabela 5.** Valor da Resposta Máxima (R<sub>máx</sub>), do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD<sub>2</sub>) e área abaixo da curva (AUC) na artéria mesentérica de terceira ordem obtidos por meio das curvas concentração-resposta de Acetilcolina (ACh) nos grupos OVX e OVX-K na ausência e na presença de inibidor.

	<b>Catalase</b>		
	<b>R<sub>máx</sub></b>	<b>pD<sub>2</sub></b>	<b>AUC</b>
ACh(OVX)	89,3±3,0	7,2±0,1	342,7±15,1
ACh+Catalase (OVX)	82,3±7,6	6,2±0,3	247,2±14,3*
ACh(OVX-K)	93,5±3,2	6,8±0,2	320,0±30,6
ACh+Catalase (OVX-K)	92,1±5,4	6,1±0,2	278,0±29,3

Dados expressos como média ± EPM, curva controle e após a inibição (OVX n= 5; OVX-K n= 5) por grupo. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via com pós teste de *Fisher*. \* p<0,05 quando comparado à curva controle antes da inibição.

Ao utilizarmos o varredor de ânion superóxido Tiron, verificou-se que não houve alteração no relaxamento induzido pela ACh na curva concentração-resposta nos grupos OVX e OVX-K quando comparada as curvas antes e após o bloqueio (Figura 7 A e B), nem tampouco na  $R_{\text{máx}}$ ,  $pD_2$  e AUC.



**Figura 7.** Curva concentração-resposta à ACh induzindo vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K na presença de Tiron (varredor de ânion superóxido). Dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de duas vias (OVX  $n=7$ ; OVX-K  $n=9$ ).

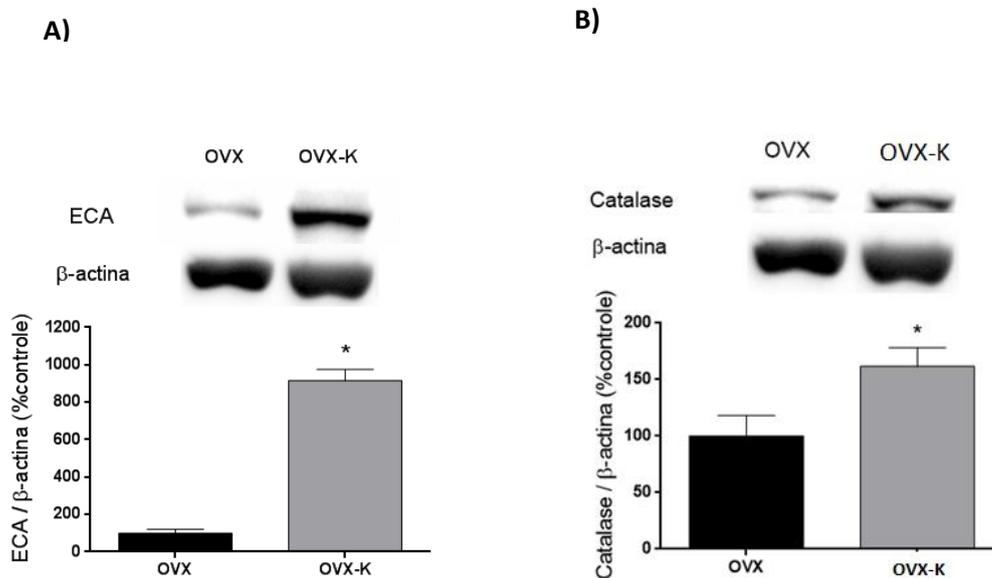
**Tabela 6.** Valor da Resposta Máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima ( $pD_2$ ) e área abaixo da curva (AUC) na artéria mesentérica de terceira ordem obtidos por meio das curvas concentração-resposta de Acetilcolina (ACh) nos grupos OVX e OVX-K na ausência e na presença de inibidores.

	<b>TIRON</b>		
	<b><math>R_{m\acute{a}x}</math></b>	<b><math>pD_2</math></b>	<b>AUC</b>
ACh (OVX)	97,6 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 0,3	395,1 $\pm$ 22,0
ACh+TIRON (OVX)	95,3 $\pm$ 1,8	7,7 $\pm$ 0,6	388,3 $\pm$ 40,3
ACh (OVX-K)	91,6 $\pm$ 2,6	7,4 $\pm$ 0,3	351,0 $\pm$ 13,6
ACh+TIRON (OVX-K)	89,3 $\pm$ 3,0	7,0 $\pm$ 0,2	331,1 $\pm$ 27,4

Dados expressos como média  $\pm$  EPM (OVX n= 7; OVX-K n= 9). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via com pósteste de *Fisher*.

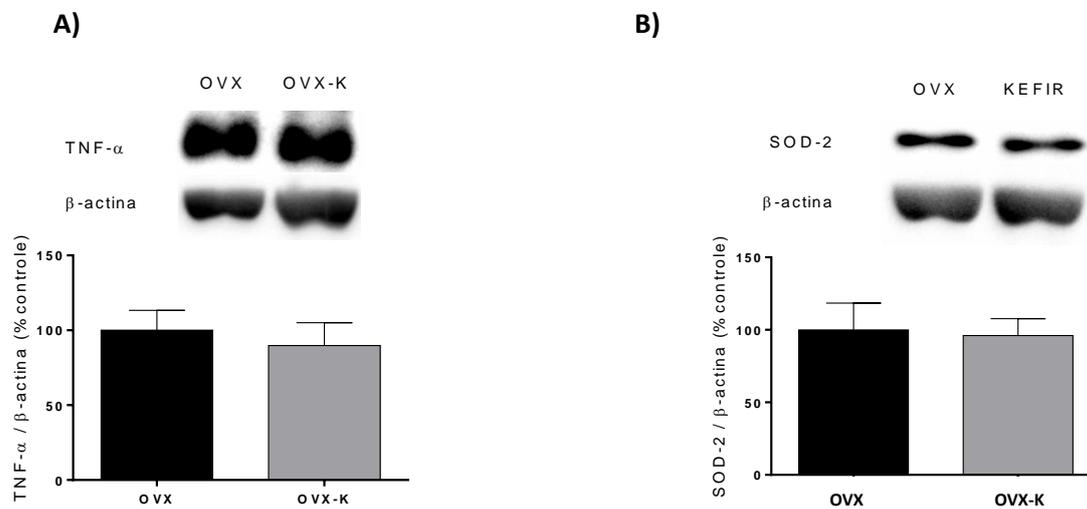
### 4.3. Expressão Proteica da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), Catalase, TNF- $\alpha$ , SOD 2 e NOX-2

Na avaliação da expressão proteica da ECA e da catalase, o grupo Kefir apresentou aumento dessas enzimas em relação ao grupo OVX (Fig. 8).



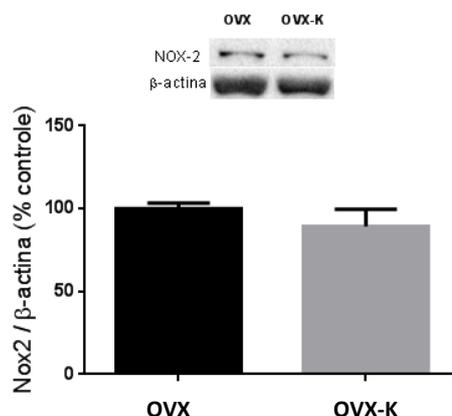
**Figura 8.** Análise por Western blot em ramos vasculares mesentéricos de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K. Efeitos do tratamento com kefir na expressão das proteínas ECA (A) e Catalase (B). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao OVX. Para a análise utilizou-se teste *t de student* não pareado.

Na avaliação da expressão proteica do TNF- $\alpha$ , não foi observada alteração em ambos os grupos (Fig. 9.A) como também na avaliação da SOD-2(Fig. 9.B).



**Figura 9:** Análise por Western blot em ramos vasculares mesentéricos de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K. Efeitos do tratamento com kefir na expressão da proteína TNF- $\alpha$  (A) e SOD-2 (B). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise utilizou-se teste *t de student* não pareado.

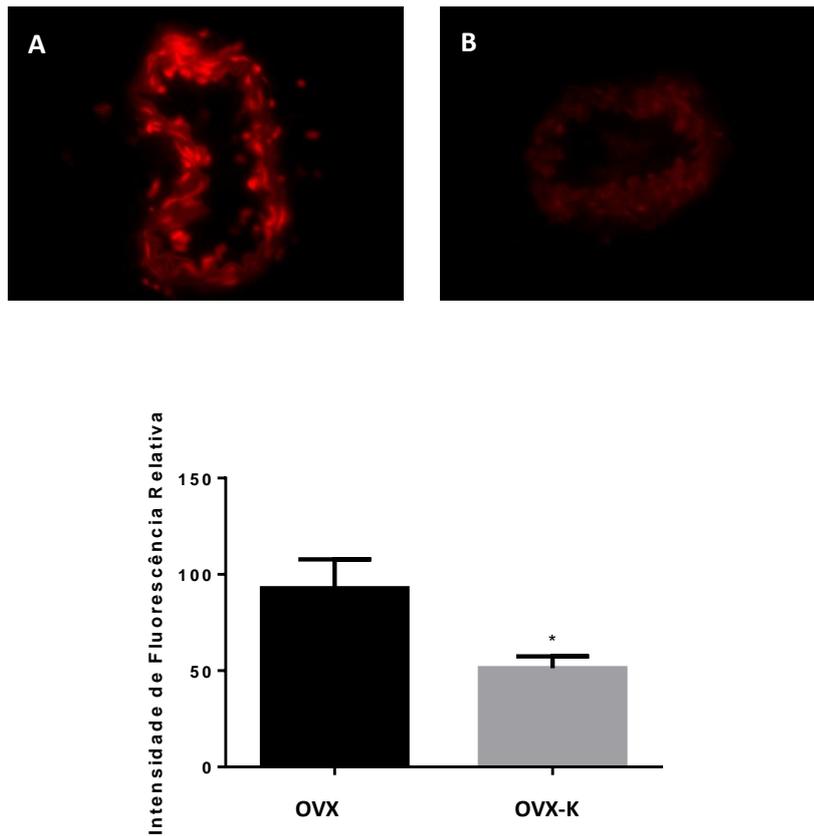
Na avaliação da expressão proteica Nox-2, não foi observada alteração em ambos os grupos (Fig. 10).



**Figura 10:** Análise por Western blot em ramos vasculares mesentéricos de terceira ordem nos grupos OVX e OVX-K. Efeitos do tratamento com kefir na expressão da proteína Nox-2 (A). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise utilizou-se teste *t de student* não pareado.

#### 4.4. Quantificação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio pela oxidação do dihidroetídio (DHE) nas artérias mesentéricas de terceira ordem dos grupos experimentais

Outra técnica utilizada para investigar a influência do tratamento com o Kefir sobre a produção de EROs foi a fluorescência produzida pela oxidação com DHE. Em condições basais, a análise da fluorescência produzida pelo DHE nas artérias mesentéricas revelou redução da produção de EROs nos animais OVX-K quando comparado ao grupo OVX ( $92,76 \pm 15,05^*$ ; OVX-K:  $51,30 \pm 6,16$ ;  $*p < 0,05$ ) (Fig. 11).



**Figura 11.** (A) Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por dihidroetídeo na artéria mesentérica de terceira ordem dos ratos do grupo Ovariectomizado (OVX) (A), Ovariectomizadas Tratadas com Kefir (OVX-K) (B). (C) Gráfico com valores da fluorescência emitida por dihidroetídeo. Barra de escala= 40 $\mu$ m. \* $p < 0,05$  quando comparado ao OVX. Para a análise utilizou-se teste *t de student* não pareado.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos dados evidenciam pela primeira vez a influência do tratamento com Kefir, um alimento funcional probiótico, no relaxamento a ACh de vasos de resistência em ratas ovariectomizadas. Os principais resultados mostram que não houve diferença na resposta vasodilatadora a ACh entre os grupos OVX e OVX-K; entretanto, ocorreram alterações nas vias mediadoras da vasodilatação após o tratamento pelo Kefir. O tratamento com o probiótico reduziu a participação da via do  $H_2O_2$ , da via COX, bem como a produção de EROs.

Pelos resultados apresentados, como esperado, a eficácia da ovariectomia pôde ser comprovada pela redução significativa dos valores da razão do peso do útero pelo comprimento da tíbia nas fêmeas OVX. Em ratas que passam por cirurgia fictícia, após 8 semanas do procedimento, seu peso uterino difere significativamente de uma rata que passa pela remoção dos ovários, que apresentam hipotrofia uterina (Godoy et al., 2018). O Kefir não alterou o peso do útero, o que possivelmente é atribuído ao fato deste probiótico não apresentar mecanismos de ação relacionados à ativação de receptores estrogênicos. Também foi avaliada a pressão arterial final dos animais de ambos os grupos após 60 dias de castração, não havendo alteração desse parâmetro. Os valores se mostraram dentro da normalidade (Anishchenko, 2015).

A ovariectomia e o tratamento com kefir não alteraram os parâmetros ponderais como peso corporal, do coração e do fígado das ratas. Dados da literatura mostram que a ovariectomia não altera o peso do coração (Bianchi et al., 2006; Medeiros et al., 2012), mas pode promover aumento do peso corporal (Medeiros et al., 2012) ou não levar a alteração significativa (Colombo et al., 2003).

Em relação ao estudo da reatividade, não houve diferença entre os grupos OVX e OVX-K no relaxamento a ACh. Diante desse resultado, ficou a dúvida se as vias que medeiam esse relaxamento foram alteradas. Abaixo discutiremos a participação das vias estudadas.

### **5.1. Avaliação da Via do Ácido Aracídico – Ciclooxigenase**

A via do ácido aracídico – ciclooxigenase é conhecida por participar do relaxamento à ACh pela produção de prostaglandinas vasodiladoras (Furchgott, 1989; Shailaja et al., 2013). No presente estudo, a indometacina (inibidor inespecífico da COX-1 e COX-2) reduziu o relaxamento a ACh somente no grupo OVX, confirmando a maior participação dessa via nos vasos estudados desses animais. Como a indometacina não alterou a resposta vasodilatadora a ACh no grupo OVX-K, podemos sugerir que o tratamento reduziu a importância dessa via nesse grupo o que também indicaria que o tratamento possivelmente alterou a importância das vias envolvidas ou aumentou a importância de outras vias.

Como é bem conhecido, as células endoteliais expressam a enzima COX, que converte o AA em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), que é substrato para a produção de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), importante vasodilatador endotelial que age via receptores específicos ligados a proteína G<sub>s</sub> (estimulatória). Essa ação promove ativação da adenilato ciclase (AC), aumento do cAMP e consequente relaxamento do músculo liso vascular. A subfamília do receptor prostanóide é composta por oito membros: subtipos EP1 (receptor prostanóide E1), EP2, EP3 e EP4 do receptor PGE, receptor PGD (DP1), receptor PGF (FP), receptor PGI (IP) e TX receptor (TP). Os receptores EP1, FP e TP acoplados à proteína G<sub>q</sub> (ligado ao IP<sub>3</sub>), quando estimulados, controlam o aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular e assim levam a vasoconstrição. A ativação dos receptores EP3 e DP2 os quais são acoplados à proteína G<sub>i</sub> (inibitória), promovem inibição da AC diminuindo a formação de cAMP resultando também em vasoconstrição (Funk, 2001; Wright et al., 2001; Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Alguns estudos demonstram o efeito da deficiência ovariana na via da COX. Dantas et al (2004) mostraram que o processo de ovariectomia conduz a aumento de prostanóides vasoconstritores que podem participar do prejuízo da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Caliman et al (2013), não conseguiu demonstrar a participação da via da COX na resposta vasodilatadora da ACh em leito mesentérico isolado de fêmeas wistar ovariectomizadas, utilizando a inibição dupla com L-NAME mais indometacina. Os dois últimos trabalhos citados parecem divergir em relação aos seus resultados encontrados, mas o estudo de Dantas et al (2004) foi realizado em fêmeas hipertensas e utilizaram diclofenaco de sódio como agente inibitório da síntese de prostanóides, enquanto que o estudo de Caliman et al. (2013) utilizou fêmeas normotensas e indometacina para inibição da COX. Em outro estudo, realizado em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas com 6 meses de idade, houve diminuição da resposta vasodilatadora induzida por PGI<sub>2</sub>, mas aumento de sua liberação pela ACh, uma vez que, esse prostanóide é um dos fatores que tem sua liberação estimulada pela ACh ao agir na célula endotelial (Martorell et al, 2009). O mesmo estudo de Martorell et al.(2009), mostrou que a expressão das enzimas COX e COX2 não estava alterada no grupo OVX. Esses resultados, pelo menos em parte, são semelhantes aos nossos, onde a inibição com indometacina reduziu a resposta a ACh no grupo OVX, não alterando a resposta no grupo OVX-K. Um outro estudo em mesentéricas de camundongos fêmeas com 13-18 semanas na presença de indometacina, os vasos das OVX apresentaram atividade aumentada de PGI<sub>2</sub> sugerindo aumento dessa via da PGI<sub>2</sub> nesses animais (Yap et al., 2014), reforçando

nossa hipótese que a OVX pode aumentar a liberação de  $PGI_2$  e que o kefir normalizaria essa via.

Observando o resultado com indometacina, testamos a inibição específica da isoforma induzível, COX2. A COX2 é indetectável na maioria dos tecidos de mamíferos, mas sua expressão pode ser induzida rapidamente em fibroblastos, células endoteliais, monócitos e folículos ovarianos em resposta a fatores de crescimento, promotores de tumores, hormônios, endotoxina bacteriana e citocinas. (Smith et al., 1996).

Na presença do NS 398, um inibidor específico da COX2, foi observada menor participação dessa via no grupo Kefir, o que pode estar relacionado com um efeito anti-inflamatório do tratamento. Apesar de nenhum estudo ainda ter analisado a influência do Kefir na atividade da COX2, outros estudos demonstraram o papel anti-inflamatório desse probiótico. Senol et al., 2015 demonstraram em seus estudos que o tratamento com kefir por 14 dias em ratos wistar, foi capaz de diminuir os escores de colite, além de reduzir significativamente o aumento de  $TNF-\alpha$  evidenciando seu papel anti-inflamatório. Hadisaputro et al., 2012, concluíram com seus resultados que o uso de Kefir por 30 dias em ratos wistar foi capaz de diminuir significativamente o nível de citocinas pró-inflamatórias (IL1,IL6) e reduzir também o nível de  $TNF-\alpha$ , além de aumentar o nível de citocina anti-inflamatória IL10. Uchida et al., 2010 demonstraram a prevenção no desenvolvimento de aterosclerose em coelhos hipercolesterolêmicos por sua ação anti-inflamatória. Contudo em nosso modelo, o kefir não alterou a expressão proteica do  $TNF-\alpha$ .

## 5.2. Via das EROs e sistema antioxidante

As EROs nos vasos sanguíneos são produzidas por vários sistemas enzimáticos como a NADPH oxidase, xantina oxidase, eNOS desacoplada e a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Dikalov, 2011). Em contrapartida, a parede vascular é protegida por um sistema de enzimas antioxidantes incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase. Antioxidante é qualquer substância que, reduz, atrasa ou previne efeitos nocivos dos radicais ou EROs de maneira eficaz (Sies & Stahl, 1995). Esses sistemas em situação fisiológicas normais, demonstram pleno equilíbrio, porém, em algumas disfunções como hipertensão, hipercolesterolemia e deficiência de estrogênio ocorre aumento na geração de EROs, resultando em aumento do estresse oxidativo, que, refere-se ao desequilíbrio entre produção de espécies reativas e defesa antioxidante (Li *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2014; Goettems *et al.*, 2019). Um dos produtos da ação da NADPH oxidase, o ânion superóxido, pode sofrer dismutação (reação de oxidação-redução) da enzima SOD para formar o peróxido de hidrogênio. O ânion superóxido ainda pode reagir com o óxido nítrico diminuindo a biodisponibilidade deste por formar peroxinitrito, reduzindo o relaxamento vascular (Arnal *et al.*, 1996; Friques *et al.*, 2015; Kruger *et al.*, 2015). Paradoxalmente o estresse oxidativo pode aumentar a vasodilatação via produção de peróxido de hidrogênio em algumas situações (Oliveira *et al.*, 2014).

Nossos resultados mostraram que ao inibir com apocinina umas das principais fontes de geração de ânion superóxido vascular, a NADPH oxidase, que consequentemente reduz o substrato (ânion superóxido) para a produção de

$H_2O_2$ , não houve alteração da resposta a ACh no grupo OVX e no grupo OVX-K. Adicionalmente, analisamos a expressão proteica da SOD, enzima que converte o ânion superóxido em  $H_2O_2$ , a mesma não foi alterada pelo tratamento com kefir.

Trabalhos anteriores já relacionaram a perda da função ovariana com o aumento na formação de ânion superóxido (Sagredo, 2007, Martorell, 2009; Caliman et al, 2013; Oliveira et al, 2014). Não encontramos na literatura avaliação do Kefir em ratas ovariectomizadas, entretanto, trabalho anterior realizado na aorta de ratos SHR tratados com Kefir por 60 dias, mostrou que o tratamento atenuou a disfunção endotelial, diminuiu a produção de EROs e consequentemente, restaurou a disponibilidade de NO intravascular (Frigues et al., 2015).

Dando continuidade ao estudo, decidimos então investigar melhor a participação do  $H_2O_2$  na resposta vasodilatadora a ACh. Para isso, utilizamos a catalase, enzima responsável pela degradação do  $H_2O_2$ , o que reduz a disponibilidade dessa substância que dependendo da concentração, pode induzir vasodilatação nos vasos de resistência (Félétou, 2009).

Na presença da catalase, observamos menor resposta à ACh no grupo OVX, podendo representar uma maior participação dessa via. De forma semelhante no grupo OVX-K também houve uma redução na resposta ao relaxamento na curva dose-resposta após o uso da catalase, porém, em menor magnitude, demonstrando que o tratamento com o Kefir, parece ter reduzido a disponibilidade de  $H_2O_2$ . Esses resultados, até o momento, podem apontar um efeito antioxidante do tratamento com Kefir no modelo estudado. Reforçando

esse mecanismo, nossos resultados demonstraram aumento na expressão da enzima antioxidante catalase no grupo tratado com Kefir em comparação ao grupo OVX. Estudos como o de Ceravolo et al., 2013 e Almeida et al., 2018 mostram redução na expressão proteica da catalase em ratas ovariectomizadas comparada com o grupo SHAM, o que pode sugerir que o Kefir pode reverter essa alteração. Barboza e colaboradores (2018) de forma semelhante observaram que o tratamento com o Kefir levou a menor formação de peróxido de hidrogênio de forma sistêmica em camundongos machos. Além disso, um estudo também encontrou redução significativa de  $H_2O_2$  nas células endoteliais de animais tratados com Kefir (Friques et al, 2015).

Assim, o tratamento com Kefir parece aumentar a degradação de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , pelo aumento na expressão da catalase nas ratas ovariectomizadas, demonstrando ser um produto antioxidante. Em estudo randomizado, o uso de probiótico *Lactobacillus casei*, foi capaz de aumentar a atividade da catalase plasmática em mulheres que consumiram cápsulas contendo o probiótico durante 7 semanas, e que a capacidade antioxidante total aumentou no grupo de estudo em comparação com o grupo controle após a administração dos probióticos (Kleniewska et al., 2016).

A fluorescência emitida pelo dihidroetídeo na artéria mesentérica, indica os níveis de EROs produzidos. Demonstramos que nos animais tratados com Kefir, esse probiótico foi capaz de prevenir o estresse oxidativo dos vasos desses animais. Apesar de não termos realizado a análise nos vasos de

animais sham para compararmos com os dados dos animais OVX, dados da literatura demonstram maior estresse oxidativo em vasos de ratas ovariectomizadas, como estudos que mostraram em aorta torácica (Camporez et al., 2011) e em leito mesentérico (Caliman et al., 2013) de fêmeas ovariectomizadas, por meio da fluorescência emitida pelo DHE, maior produção de EROs. Outro estudo mostrou a produção de ânion superóxido medida utilizando quimioluminescência nas artérias basilares de ratas OVX, que foi significativamente maior do que os níveis gerados por artérias de fêmeas intactas (Miller et al., 2007). Adicionalmente, a ovariectomia levou a uma amplificação do estresse oxidativo em ratos sensíveis ao sal, quando alimentados com uma dieta rica em sal, por aumento no sistema de geração de EROs (Zhang et al., 2007). Quanto ao Kefir, seu papel antioxidante tem sido descrito por estudos (Punaro, 2014; Friques et al., 2015) que mostram redução do estresse oxidativo. Nossos resultados demonstram pela primeira vez, efeito antioxidante em vasos de ratas OVX, podendo indicar que o Kefir possa ser considerado como alternativa potencial de tratamento antioxidante, pelo menos em parte, por reduzir a produção de  $H_2O_2$  ao aumentar a expressão proteica da catalase. Os antioxidantes protegem as células por meio de um sistema de defesa que pode atuar como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Nesta linha se inclui a catalase, que ao degradar o  $H_2O_2$  evita possíveis lesões celulares causada por este agente (Ferreira & Matsubara, 1997).

Alguns estudos mostram que a ovariectomia aumenta a expressão proteica da NADPH oxidase na aorta e artérias cerebrais (Zhang et al., 2007; Miller et al., 2007, Ceravolo et al., 2013). As NADPH-oxidases são fonte importante de espécies reativas de oxigênio no endotélio. Sob condições fisiológicas, essas

enzimas são expressas em níveis relativamente baixos nas membranas do retículo endoplasmático e núcleo onde contribuem para processos de sinalização redox intracelular. No entanto, em diversas configurações de risco como hiperlipidemia, hipertensão, diabetes e aterosclerose, a expressão endotelial de NOX-2 e, em menor grau, NOX-1, parece ser aumentada, resultando em excesso de geração de superóxido. (Miller 2007; Drummond et al., 2014). Entretanto, nossos dados mostraram que o tratamento com Kefir não exerceu influência na expressão proteica da NOX-2, apesar de termos observado redução significativa da produção de ânion superóxido pelo método do DHE.

Esses dados podem indicar que o kefir possa alterar a atividade da NOX-2 e não a sua expressão proteica, entretanto, estudos mostram que a reação do DHE pode não ser específica para detectar a produção de ânion superóxido somente e que o substrato diidroetídeo pode reagir com peróxido de hidrogênio (Kobzik et al, 1990; Fidler et al, 1987). Como demonstramos, o kefir possui a capacidade de reduzir a produção de  $H_2O_2$ , o que poderia reduzir a reação com o DHE e reduzir a fluorescência, como mostrado no nosso estudo.

### 5.3. Mecanismos adicionais do Kefir

Adicionalmente, em relação a expressão proteica da ECA, que estava aumentada nos vasos do grupo OVX-K, acreditamos que seja por um mecanismo compensatório, uma vez que o kefir possui inúmeros peptídeos inibidores da ECA (Friques et al., 2015). A produção de uma enzima (transcrição e tradução dos genes que codificam a enzima) pode ser aumentada ou diminuída pela célula em resposta a mudanças no ambiente celular. Esta forma de regulação genética é designada como indução ou inibição da expressão enzimática, neste sentido, pelo fato do Kefir possuir capacidade de inibir a ECA, devido a essa inibição, pode ter existido aumento da expressão protéica para compensar, na situação dos nossos experimentos.

Parece paradoxal, substâncias que inibem a ECA, aumentar a expressão ou atividade dessa enzima, mas Pedraza-Chaverri et al., 1992, demonstraram em ratos com um tipo de doença renal e tratados com captopril, um inibidor da ECA (iECA), apresentaram aumento na expressão tecidual e na atividade da ECA plasmática, mas este efeito não foi observado em ratos controles. Por outro lado, em relação a expressão da ECA, o tratamento crônico com enalapril em ratas com deficiência de estrogênio foi capaz de reverter os níveis aumentados de ECA e angiotensina II (Ang II) em relação às da aorta de ratos que passaram por cirurgia fictícia (Yung et al, 2011), o que é controverso aos nossos dados. Adicionalmente, Marchon et al., (2015) demonstraram em ratas castradas, que a análise da expressão da ECA na aorta é aumentada, mas a produção de Ang II não é alterada. Portanto, a expressão da ECA pode estar aumentada, mas não necessariamente estaria levando ao aumento do seu produto, que seria a Ang II.

Estudo com crianças com nefropatia por IgA tratadas com inibidores da ECA apresentaram um declínio significativo nos indicadores de estresse oxidativo produtos de proteínas de oxidação avançadas (AOPP) e malonaldeído (MDA) e um aumento na SOD (Pei, et al, 2016). Como já é conhecido, quando a concentração dos produtos das reações de oxidação aumenta ou quando a atividade das enzimas antioxidantes (como SOD, catalase) diminui, os níveis de estresse oxidativo aumentam. Desta forma, nossos dados parecem corroborar os resultados do estudo citado anteriormente, ou seja, o kefir que possui propriedades inibidoras da ECA, pode ter reduzido, pelo menos em parte, o estresse oxidativo e aumentado a defesa antioxidante, que estavam alteradas na rata com deficiência de estrogênio.

Portanto, pelo menos em parte, os efeitos do kefir observados no presente estudo podem estar relacionados ao seu efeito iECA. É descrito o efeito de iECA (enalapril) em reverter aumento do estresse oxidativo, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e disfunção endotelial em situação de deficiência de estrogênio (Yung et al, 2011). Inclusive, podemos especular que por possuir efeito iECA, o kefir possa ter aumentado a via do NO nas ratas OVX-K, substituindo o papel vasodilatador do  $H_2O_2$  nas ratas OVX. A avaliação desta via será uma das perspectivas futuras do presente estudo, para melhor entendimento dos resultados.

Dessa forma, o Kefir demonstrando possuir efeito antioxidante vascular em modelo de privação de hormônios sexuais ovarianos, pode ter potencial de prevenir alterações vasculares em mulheres na fase pós-menopausa.

## **6. Conclusão**

Como conclusões do presente estudo podemos destacar que o Kefir em ratas ovariectomizadas reduz a participação de via oxidativa ( $H_2O_2$ ), aumenta via antioxidante (catalase) e reduz uma via inflamatória (COX-2) na resposta a ACh em vasos de resistência de ratas OVX quando comparadas ao grupo não tratado, o que pode demonstrar ser um produto benéfico no tratamento preventivo da disfunção vascular que ocorre no período da pós-menopausa.

## 7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA et al. Estrogen Therapy Worsens Cardiac Function and Remodeling and Reverses the Effects of Exercise Training After Myocardial Infarction in Ovariectomized Female Rats. **Frontiers in physiology**. 2018; Vol. 5(9): 1242.

AMADEI, et al. Circulating Metabolites Originating from Gut Microbiota Control Endothelial Cell Function. **Molecules**. 2019; Vol. 24(21): 3992.

ANISHCHENKO et al. Dynamics of Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in SHR Rats during the Development of Arterial Hypertension. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. 2015; Vol. 159(5): 541-544.

ARNAL, J F et al. Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. **American Journal of Physiology-Cell**. 1996; Vol. 271(5): C1521-C1526.

ARORA, T, et al. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. **Nutrition**. 2013; Vol. 29(4): 591–596.

ARPINO G, et al. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. **Endocrine Review**. 2008; Vol. 29(2): 217-33.

BACKHED F, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**. 2005; Vol. 307(5717): 1915-20.

BAKER et al. Estrogen–gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. **Maturitas**. 2017; Vol. 103: 45–53.

BARBOZA et al. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress. **Life Science**. 2018; Vol. 209: 370-376.

BARRETT-CONNOR E, et al. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. **The New England journal of medicine**. 2006; Vol. 355(2): 125-37.

BARTON, M & MEYER, M R. Postmenopausal hypertension mechanisms and therapy. **Hypertension**, 2009; Vol. 54(1): 11-18.

BENGOA AA, et al. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal Applied Microbiology**. 2019; Vol. 126(3): 686-700.

BERAL V. Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet**. 2003; Vol. 362: 419-27.

BERG LTWJ, et al. HRT use in 2001 and 2004 in The Netherlands – A world of difference. **Maturitas**. 2006; Vol. 54: 193–197.

BIANCHI PR, et al. Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. **Life Science**. 2006; Vol. 78: 875 – 881.

BORGO MV, et al. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2011; Vol. 44(8):786-92.

BRASIL et al. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. **Nutrition**. 2018; Vol. 51-52: 66-72.

BRUNETTE, M. G. & LECLERC, M. Renal action of progesterone: effect on calcium reabsorption. **Molecular Cellular Endocrinology**. 2002 Vol. 30(194): 183-90.

CALIMAN et al. Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are restored by atorvastatin therapy in ovariectomized rats. **Plos One**. 2013; Vol. 21: 8(11).

CAMPOREZ JPG, et al. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. **The Journal of Physiology**. 2011; Vol. 10: 2585–2596.

CARMECI, C et al. Identification of a gene (GPR30) with homology to the Gprotein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. **Genomics**, 1997; Vol. 45(3): 607-617.

CAVALCANTI MP, et al. Gut microbiota and probiotics intervention: A potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease? **Pharmacological Research**. 2018; Vol.130: 152-163.

CERAVOLO et al. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**. 2013; Vol. 78 (3): 341-6.

COHEN RA, et al. Inhibitory role of endothelium in the response of isolated arteries to platelets. **Science**. 1983; Vol. 221: 273-274.

COLOMBO et al. Influence of ovariectomy on atrophy and regeneration of parotid gland: histological study in rats. **Ciencia Odontológica Brasileira**. 2003; Vol. 6 (4): 70-8. CONCEA-MCT - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. **Brazilian Government** 2016 1–50.

CUMMINGS SR, et al. The effects of tibolone in older postmenopausal women. **The New England journal of medicine**. 2008; Vol. 359: 697-708.

CUTINI PH, et al. The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 2012; Vol. 132: 322–330.

DALLE LUCCA, J J et al. Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed. **Human Reproduction**. 2000; Vol. 15(4): 961-968.

DAMIANA D. Rosa et al Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews** 2017; Vol. 30(1): 82-96.

DANTAS, APV et al. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 1999; Vol. 34(4): 914-919.

DANTAS APV, et al. Relative Contribution of Estrogen Withdrawal and Gonadotropins Increase Secondary to Ovariectomy on Prostaglandin Generation in Mesenteric Microvessels. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 2004; Vol. 43: 48–55.

DEITCH, E. A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. **Archives of Surgery**. Chicago. 1990; Vol. 125: 403-404.

DIKALOV. Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radical Biology & Medicine**. 2011; Vol. 51(7): 1289-301.

DRUMMOND, G. R., & SOBEY, C. G. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? **Trends in Endocrinology & Metabolism**. 2014. Vol. 25(9): 452–463.

FARHAT MY, et al. The vascular protective effects of estrogen. **FASEB Journal**. 1996; Vol. 10(5): 615-24.

FARNWORTH, E. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2005; Vol. 2 (1): 1–17.

FÉLÉTOU M & VANHOUTTE PM. EDHF: an update. *Clinical Science*. 2009; Vol. 117: 139–155.

FÉLÉTOU M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*. 2009; Vol. 156, 545–562.

FELSON, et al. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone-Density in elderly women. *The New England journal of medicine*. 1993; Vol. 329: 1141-1146.

FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; Vol. 43(1): 61-68.

FILARDO, E J et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*. 2000; Vol. 14(10): 1649-1660.

FIDLER et al. Direct antiproliferative effects of recombinant human interferon-alpha B/D hybrids on human tumor cell lines. *Cancer Research*. 1987; Vol. 47:2020–2027.

FRIQUES AG ,et al. Chronic administration of probiotic kefir improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal translational Medicine*. 2015; Vol. 13: 390. FU et al. Cardioprotection by low-dose of estrogen and testosterone at the physiological ratio on OVX rats during ischemia/reperfusion injury. *Journal Cardiovascular Pharmacology*. 2017; Vol. 70(2):87-93.

FUJI S, et al. The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Suppresses Preneoplastic Liver Foci of Rats. *Toxicologic Pathology*. 2017 Vol. 45(4):544-550.

FUNK. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001; Vol. 294:1871-1875.

FURCHGOTT RF & VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and constricting factors. *FASEB Journal*. 1989; Vol. 3: 2007-2018.

GASBARRINI, G. et al. "Probiotics History." *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2015; Vol. 13-15: S116-S119.

GIOSIA PD, et al. Gender Differences in Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment of Hypertension. **Current Atherosclerosis Reports**. 2018; Vol. 20(3): 13.

GODOY DJD, et al. Collagen and mPCL-TCP scaffolds induced differential bone regeneration in ovary-intact and ovariectomized rats. **Bio-Medical Materials and Engineering**. 2018; Vol. 29: 389–399.

GOETTEMS-FIORIN PB, et al. Ovariectomy predisposes female rats to fine particulate matter exposure's effects by altering metabolic, oxidative, pro-inflammatory, and heat-shock protein levels. **Environmental Science and Pollution Research International**. 2019; Vol. 26(20):20581-20594.

GOLDING EM & KEPLER TE. Role of estrogen in modulating EDHF-mediated dilations in female rat middle artery. **American Journal of physiology. Heart and circulatory Physiology**. 2001; Vol. 280(6): H2417-23.

GOMPEL A, et al. Association of menopause and hormone replacement therapy with large artery remodeling. **Fertility and Sterility**. 2011; Vol. 96(6): 1445-50.

GROVER M, & KASHYAP. Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. **Neurogastroenterology and Motility**. 2014; Vol. 26(6): 745-8.

HADISAPUTRO S, et al. The effects of oral plain kefir supplementation on proinflammatory cytokine properties of the hyperglycemia Wistar rats induced by streptozotocin. **Acta medica Indonesiana**. 2012; Vol. 17(9):980-8.

HATANO, Y et al. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. **Anesthesiology**, 1989; Vol. 71(1),: 80-86.

HENRIQUES et al. Effect of high doses of tibolone in body weight and lipid profile of ovariectomized rats. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 2010; Vol.32(2): 88-93.

HOMMA A, et al. The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. **American Journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**. 2005; Vol. 288: G466-G472.

HULLEY S, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin replacement study (HERS) Research group. **JAMA**. 1998; Vol. 280: 605 – 613.

JENSEN E & DESOMBRE E. Estrogen-receptor interaction. **Science**. 1973; Vol. 182: 126-133.

JOUSILAHTI P, et al. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. **Circulation**. 1999, Vol. 99(9):1165- 72.

JUN SS, et al. Estrogen up regulates cyclo-oxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. **The Journal of Clinical Investigation**. 1998; Vol. 102(1): 176-83.

KANG & CAI. The development of probiotics therapy to obesity: a therapy that has gained considerable momentum. **Hormones**. 2018; Vol. 17: 141 – 151.

KELLY, M. J & LEVIN, E. R. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 2001; Vol. 12: 152–156.

KLENIEWSKA P et al. The influence of Probiotic Lactobacillus casei in Combination with Prebiotic Inulin on the Antioxidant Capacity of Human Plasma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016; Vol. 2016: 1340903.

KLIPPEL BF, et al. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**. 2016; Vol. 7: 211.

KLOOSTERBOER HJ, et al. Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. **Maturitas**, 2004; Vol. 48(1): S30–S40.

KNOWLTON, A A & LEE, A R. Estrogen and the cardiovascular system. **Pharmacology & therapeutics**. 2012; Vol. 135(1): 54-70.

KOBZIK et al. Oxidative metabolism in the alveolar macrophage: analysis by flow cytometry. **Journal of Leukocyte biology**. 1990; Vol. 47:295–303.

Kruger, R L et al. Oxidative stress and endothelial function: effects of physical exercise on results of postprandial lipemia. **Jornal Vascular Brasileiro**. 2015; Vol. 14(4): 328-340. KUIPER, G. G. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alfa and beta. **Endocrinology**. 1997 Vol. 138: 863–870.

KURT, A H & BUYUKAFSAR, K. Vasoconstriction induced by G1, a G-proteincoupled oestrogen receptor1 (GPER-1) agonist, in the isolated perfused rat kidney. **European journal of pharmacology**. 2013; Vol. 702(1): 71-78.

KUSHNER PJ, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. **The Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 2000; Vol. 74(5):311-7.

LAMAS AZ; et al. The selective estrogen receptor modulators (SERMs) raloxifene and tamoxifen improve ANP levels and decrease nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in estrogen-deficient rats. **Pharmacological reports**. 2017. Vol. 9: 68.

LIU JJ, et al. Apocynin ameliorates pressure overload-induced cardiac remodeling by inhibiting oxidative stress and apoptosis. **Physiological Research**. 2017; Vol. 24;66(5): 741-752.

LI H ,et al. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 2014; Vol. 237(1):208-19.

LI J, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, 2017; Vol. 1;5(1):14. MANSON JE, et al. Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. **The New England journal of medicine**. 2003; Vol. 349: 523-534.

MARCHON et al. Effects of Moderate Exercise on the Biochemical, Physiological, Morphological and Functional Parameters of the Aorta in the Presence of Estrogen Deprivation and Dyslipidemia: an Experimental Model. **Cellular Physiology Biochemistry** 2015; Vol. 35:397-405.

MARCONDES, F K; BIANCHI, F J; TANNO, A P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**. 2002; Vol. 62(4A): 609-614.

MARTORELL A, et al, Ovariectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in acetylcholine-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta. **Cardiovascular Reserch**. 2009; Vol. 84(2): 300-8.

MAZZUCA, M Q et al. Estrogen receptor subtypes mediate distinct microvascular dilation and reduction in  $[Ca^{2+}]_i$  in mesenteric microvessels of female rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2015 Vol.352(2): 291-304.

MEDEIROS ARS, et al. Tibolone has antiinflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF- $\alpha$ . **Regulatory peptides**. 2012; Vol. 179(1-3): 55-60.

MENDELSON ME. Nongenomic, ER-Mediated Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase: How Does It Work? What Does It Mean?. **Circulation Research**. 2000; Vol. 87: 956-960.

MILLER A, et al. Effect of Gender on NADPH-Oxidase Activity, Expression, and Function in the Cerebral Circulation.Role of Estrogen. **Stroke**. 2007; Vol. 38: 2142–2149.

MOREAU KL, et al. Endothelial function is impaired across the stages of the menopause transition in healthy women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 2012; Vol. 97(12):4692-700.

MULVANY, M J & HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation research**. 1977; Vol. 41(1): 19-26.

MURRAY CJL & LOPEZ AD. The global burden of disease. **World Health Organization**. 1996; Vol. 1: 41.

NADAL, A. et al. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. **News in Physiological Sciences**. 2001; Vol. 16: 251–255.

NORMAN, A. W. et al. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature Reviews**. 2004; Vol. 3: 27–40.

OLIVEIRA et al,. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. **Clinical Science**. 2014; Vol. 127(4): 265-75.

O'MALLEY, B. W.& MEANS, A. R. Female steroid hormones and target cell nuclei. **Science**. 1974; Vol. 183: 610–619.

ONITILO AA, et al. Estrogen receptor genotype is associated with risk of venous thromboembolism during tamoxifen therapy. **Breast Cancer Research and treatment**. 2009; Vol. 115(3): 643-50.

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE & WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. **Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096/Acesso 20/02/2019](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096/Acesso 20/02/2019).

ORSHAL JM & KHALIL RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *American Journal of Physiology*. **Regulatory Integrative and comparative physiology**. 2004; Vol. 286: R233–R249.

PEDRAZA-CHAVERRÍ JP<sup>1</sup>, et al. Captopril magnifies the increase in angiotensin I-converting enzyme activity in rats with aminonucleoside nephrosis. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**. 1992; Vol. 19(6):439-45.

PEI Y, et al. Plasma oxidative stress level of IgA nephropathy in children and the effect of early intervention with angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system**. 2016; Vol. 18:17(2). PUNARO GR, et al. Kefir administration reduced progression of renal

injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**. 2014; Vol. 37: 53–60.

QIAO X, et al. Sex Steroids and Vascular Responses in Hypertension and Aging. **Gender Medicine**. 2008; Vol. 5 Suppl A: S46-64.

RENOUX C et al, Bias from depletion of susceptibles: the example of hormone replacement therapy and the risk of venous thromboembolism. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**. 2017; Vol. 26(5): 554-560.

RICCIOTTI E & FITZGERALD GA. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis Vascular Biology**. 2011; Vol. 31(5): 986–1000.

RIBEIRO RJ, et al. Vascular activation of K<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity of estrogen-deficient female rats. **Vascular pharmacology**. 2017; Vol. 99: 23-33.

RIVIERE, et al. Bifidobacteria and butyrateProducing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut, **Frontiers Microbiology**. 2016; Vol. 7: 979.

ROSSOUW JE, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**. 2002; Vol. 288: 321–333.

RUEHLMANN DO, et al. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca<sup>2+</sup> channels in smooth muscle cells. **FASEB J**. 1998; Vol. 12(7): 613-9.

SAGREDO A, et al. Involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium channels in the acetylcholine-response: effect of female sex hormones. **Calcium Binding Proteins**. 2007; Vol.2: 79.

SANTOS et al. Endothelial Mediators of 17 Beta-Estradiol-Induced Coronary Vasodilation in the Isolated Rat Heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological research**. 2004; Vol. 37(4):569-75.

SENOL A, et al. Kefir treatment ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**. 2015; Vol. 14;21(46): 13020-9.

SCHENKEL PC, et al. Catalase influence in the regulation of coronary resistance by estrogen: joint action of nitric oxide and hydrogen peroxide. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2014; Vol. 2014: 159852. SCHWABE RF, et al. The microbiome and cancer. **Nature Reviews. Cancer**. 2013; Vol. 13(11): 800-12.

SHAILAJA, et al. Acyl Chain-Dependent Effect of Lysophosphatidylcholine on Endothelium-Dependent Vasorelaxation. **PLoS One**. 2013; Vol. 8: 5.

SHEARMAN, A. M. et al. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. **JAMA**. 2003. Vol. 290: 2263–70. SIES, H. & STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**. 1995; Vol. 62(6): 1315-1321.

SIES H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. **Experimental Physiology**. 1997; Vol. 82(2): 291-295. SMITH, et al. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and-2. **The Journal of Biological Chemistry**. 1996; Vol. 271: 33157–33160.

SOBRAC - Sociedade Brasileira de Climatério. Consenso brasileiro multidisciplinar de assistência à mulher climatérica. São Paulo: 2003.

STANKEVICIUS E, et al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas)**. 2003; Vol. 39(4): 333-341.

TADDEI S, et al. Menopause Is Associated With Endothelial Dysfunction in Women. **Hypertension**. 1996; Vol. 28: 576-582.

TAKADA, Y et al. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. **Biochemical and biophysical research communications**. 1997; Vol. 240(3): 737-741.

TAYLOR, S. E. et al. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. **Cancer Lett**. 2009; Vol. 15: 2009.

UCHIDA M, I et al. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**. 2010; Vol. 17(9): 980-8.

UPADRASTA & MADEMPUDI. Probiotics and blood pressure: current insights. **Integrated Blood Press Control**. 2016; Vol. 9: 33-42.

VALDES A, & BAJAJ T. Estrogen Therapy. **StatPearls**. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541051/>

VALVERDE MA, et al. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. **Science**. 1999; Vol. 17: 1929-31.

VIEIRA AT, et al. Influence of oral and gut microbiota in the Health of menopausal women. **Frontiers Microbiology**. 2017; Vol. 28(8): 1884.

VINDEROLA G, et al. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology** 2006; Vol. 211:149–56.

WANG L, et al. Endogenous sex hormones, blood pressure change, and risk of hypertension in postmenopausal women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 2012; Vol. 224: 228-234.

WASSERTHEIL-SMOLLER S, et al. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. **JAMA**. 2003; Vol. 289: 2673-2684.

WONG et al. O Raloxifeno evita a disfunção endotelial em ratos fêmeas ovariectomizadas em envelhecimento. **Vascular Pharmacological**. 2006; Vol. 44 (5): 290-8.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control.

WRIGHT et al. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. **American Journal of Physiology**. 2001; Vol. 281: R1343 R1360.

WSZOLEK et al. Production of Kefir, Koumiss and other Related Products. **Research Gate**. 2007; Vol. 8: 174 – 216.

XIAO, et al., High-fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice, **Microbiome**. 2017; Vol. 5(1): 43.

YANG, X P & RECKELHOFF, J F. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. **Current opinion in nephrology and hypertension**. 2011; Vol. 20(2): 133-138.

YAP FC, et al. Ovariectomy-induced reductions in endothelial SK3 channel activity and endothelium-dependent vasorelaxation in murine mesenteric arteries. **Plos One**. 2014; Vol. 8: 9.

YILDIRIR A. Postmenopausal hormone replacement therapy and the cardiovascular system. **Turk Kardiyol Dernegi Arsivi**. 2010, Vol. 38(1):32-40.

YUNG, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. **Plos One**. 2011; Vol. 6(3): 17437.

ZHANG L, et al. Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. **Journal of Hypertension**. 2007; Vol. 25(2): 407-14.