

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A  
DISFUNÇÃO DIASTÓLICA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**Bruno Maia Costa**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, fevereiro de 2021**

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

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

**Nº. Matrícula do(a) Candidato(a):**

**A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado intitulada "Efeitos do Tratamento com Ácido Elágico sobre a Disfunção Diastólica em Ratas Ovariectomizadas", apresentada e defendida publicamente pelo aluno Bruno Maia Costa, no dia \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021, às \_\_\_ h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida dissertação de Mestrado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.**

**Vitória – ES, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.**

---

**Profª. Drª. Gláucia Rodrigues de Abreu – Orientadora**

---

**Profª. Drª. Simone Alves de Almeida Simões – Co-orientadora**

---

**Profª. Drª. Sônia Alves Gouvêa – Membro interno**

---

**Profª. Drª. Cintia Helena Santuzzi – Membro externo**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

C837e Costa, Bruno Maia, 1995-  
Efeitos do tratamento com ácido elágico sobre a disfunção diastólica em ratas ovariectomizadas / Bruno Maia Costa. - 2021. 73 f. : il.

Orientadora: Gláucia Rodrigues de Abreu.  
Coorientadora: Simone Alves de Almeida Simões.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Coração - Ventriculos - Doenças. 2. Miocárdio. 3. Fitoquímicos. 4. Antioxidantes. I. Abreu, Gláucia Rodrigues de. II. Simões, Simone Alves de Almeida. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

---

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

À minha família, em especial aos meus pais, Jean e Sandra, ao meu irmão Breno e minha avó Maria que me apoiaram direta e indiretamente durante toda a minha trajetória acadêmica no mestrado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, que cuidou de mim em todos os momentos e permitiu com que eu tivesse saúde para vencer um dia de cada vez. À Ele toda a minha gratidão por mais uma conquista! Não bastou querer, foi preciso ter fé e acreditar que este sonho se tornasse realidade.

Aos meus pais, Jean e Sandra, minha base e porto seguro, que sempre me apoiaram, incentivaram e contribuíram para que eu pudesse investir o meu tempo nos estudos e buscar sempre o conhecimento.

Ao meu irmão Breno, que sempre me apoiou e esteve juntamente comigo celebrando minhas conquistas. Obrigado por cada palavra de incentivo!

À minha avó Maria, que mesmo apesar da distância esteve juntamente comigo por meio de suas orações e palavras de conforto.

Ao meu tio Saulo, por sua disposição nos momentos quando precisei de transporte para me deslocar da minha cidade natal até a UFES.

Aos meus tios, José e Mirinha, e meu primo Isaque, que me acolheram desde a minha chegada à cidade de Vitória.

À todos os meus familiares que sempre apoiaram as minhas decisões e estiveram na torcida por mim.

Aos colegas de laboratório, Fabrício, Érick e Laís, que me acolheram no laboratório e não mediram esforços para me ajudar e, mais recentemente, Vinícius, que foi extremamente paciente comigo para me ajudar e ensinar uma parcela do seu conhecimento técnico-científico nas atividades laboratoriais.

À minha co-orientadora e “mãe científica”, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone, que desde o início me acolheu como “filho científico”, me instruindo, ensinando e ajudando durante toda a minha trajetória no mestrado. Além disso, me ensinou a não ter medo do novo e tentar resolver cada problema, não importando o quão grande ele fosse. Meu muito obrigado!

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia, que me aceitou como aluno e me deu a oportunidade de trabalhar no Laboratório de Regulação Neuro-Humoral da Circulação (LRNHC), depositando em mim confiança e apoio durante o mestrado.

Aos alunos de iniciação científica, Isabela, Katiane, Laís, Laíza e, em especial, à Camille, que me ajudaram principalmente no momento quando precisei por motivo de saúde e, mais recentemente, Taylor e Rayner, que sempre se prontificaram e estiveram dispostos a me ajudar nas etapas finais deste trabalho.

À todos os meus professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – UFES e, também, aos meus amigos que contribuíram direta e indiretamente para que eu pudesse concluir essa jornada acadêmica científica.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Obrigado!

“A mente que se abre a uma nova  
ideia, jamais voltará ao tamanho  
original”.

Albert Einstein

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	28
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	29
3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	30
<b>3.2.1 Ovariectomia</b> .....	30
<b>3.2.2 Indução de disfunção diastólica</b> .....	31
<b>3.2.3 Tratamento com ácido elágico</b> .....	32
<b>3.2.4 Avaliação hemodinâmica</b> .....	32
<b>3.2.5 Coleta de tecidos</b> .....	33
<b>3.2.6 Expressão proteica pela técnica de Western Blotting</b> .....	33
3.2.6.1 Quantificação de proteínas e preparo das amostras .....	33
3.2.6.2 Eletroforese e Transferência das amostras .....	34
3.2.6.3 Incubação com os Anticorpos.....	34
3.2.6.4 Detecção das Bandas de Proteínas .....	35
<b>3.2.7 Análise da atividade antioxidante da SOD e Catalase</b> .....	35
<b>3.2.8 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE)</b> .....	36
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>4 RESULTADOS</b> .....	38
4.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E CONGESTÃO PULMONAR.....	38
4.2 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS .....	38
4.3 DISFUNÇÃO DIASTÓLICA .....	39



4.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA FLUORESCÊNCIA DE DIHYDROETHIDIUM .....	40
4.5 EXPRESSÃO PROTEICA OXIDANTE E ANTIOXIDANTE .....	42
4.6 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO DO Ca <sup>2+</sup> ...	43
4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE .....	44
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeitos do AE nos parâmetros ponderais de ratas ovariectomizadas com disfunção diastólica.....38
- Tabela 2.** Parâmetros hemodinâmicos quatro semanas após tratamento com AE em ratas ovariectomizadas com disfunção diastólica.....39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reação de Fenton no tecido cardíaco.....	22
<b>Figura 2.</b> Representação estrutural e funcional da CaMKII no tecido cardíaco.....	24
<b>Figura 3.</b> Representação das reações antioxidantes enzimáticas da SOD, Catalase e GPx no tecido cardíaco.....	25
<b>Figura 4.</b> Ilustração dos fatores e vias biomoleculares que levam a disfunção diastólica ventricular.....	27
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da distribuição dos grupos.....	29
<b>Figura 6.</b> Representação do esquema cronológico do protocolo experimental.....	30
<b>Figura 7.</b> Etapas do procedimento para indução de disfunção diastólica.....	31
<b>Figura 8.</b> Representação da onda de pressão ventricular com suas respectivas variáveis.....	33
<b>Figura 9.</b> Parâmetros funcionais cardíaco.....	40
<b>Figura 10.</b> Avaliação "in situ" da produção de ânion superóxido no tecido cardíaco.....	41
<b>Figura 11.</b> Expressão proteica das enzimas antioxidantes e oxidantes no tecido cardíaco.....	43
<b>Figura 12.</b> Expressão das proteínas de sinalização do Ca <sup>2+</sup> do tecido cardíaco.....	44
<b>Figura 13.</b> Atividade das enzimas antioxidantes SOD e Catalase no tecido cardíaco.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AE** – Ácido elágico

**AVE** – Acidente vascular encefálico

**Ca<sup>2+</sup>** – Cálcio

**CaM** – Calmodulina

**CaMKII** – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina

**CAT** – Catalase

**DCNT** – Doenças crônicas não transmissíveis

**DCV** – Doenças cardiovasculares

**DD** – Disfunção diastólica

**DDVE** – Disfunção diastólica do ventrículo esquerdo

**DHE** – Dihidroetídeo

**DIC** – Doença isquêmica do coração

**dP/dt-** – Taxa máxima de decaimento da pressão ventricular

**dP/dt+** – Taxa máxima de desenvolvimento da pressão ventricular

**E2** – Estrogênio

**EPM** – Erro padrão da média

**ERN** – Espécies reativas de nitrogênio

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**FC** – Frequência cardíaca

**Fe<sup>2+</sup>** – Ferro

**GPÉR** – Receptor de estrogênio acoplado a uma proteína G

**GSH** – Glutathiona reduzida

**GSH-Px** – Glutathiona peroxidase

**H<sub>2</sub>O** – Água

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**i.m** – Intramuscular

**i.p** – Intraperitoneal

**IC** – Insuficiência cardíaca

**ICFEP** – Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada

**ICFER** – Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida

**IM** – Infarto do miocárdio

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NO** – Óxido nítrico

**NOS** – Óxido nítrico sintase

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Ânion Superóxido

**OH<sup>•</sup>** – Radical hidroxil

**ONOO<sup>-</sup>** – Peroxinitrito

**OVX** – Ovariectomia

**PA** – Pressão arterial

**PAD** – Pressão arterial diastólica

**PAM** – Pressão arterial média

**PAS** – Pressão arterial sistólica

**PC** – Peso corporal

**p-CaMKII** – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina fosforilada

**PDFVE** – Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

**PKA** – Proteína quinase A

**PLB** – Fosfolamban

**PSVE** – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

**RE** – Receptor de estrogênio

**RE- $\alpha$**  – Receptor de estrogênio alfa

**RE- $\beta$**  – Receptor de estrogênio beta

**RS** – Retículo sarcoplasmático

**RyR** – Receptor de rianodina

**SERCA** – Retículo sarco/endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

**Sham** – Animais submetidos à cirurgia fictícia

**SOD** – Superóxido dismutase

**TRH** – Terapia de reposição hormonal

**VE** – Ventrículo esquerdo

## RESUMO

O estresse oxidativo, resultante das doenças cardiovasculares e deficiência de estrogênio, é uma condição propícia para o desenvolvimento da disfunção diastólica ventricular, bem como, progressão e gravidade da insuficiência cardíaca. Nesse sentido, estudos buscam novas opções terapêuticas que possam reduzir o estresse oxidativo por meio de terapia alternativa natural, no qual, o ácido elágico (AE) tem se mostrado como opção por apresentar propriedades antioxidantes. O objetivo deste estudo foi analisar se o tratamento com AE é capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e prevenir a disfunção diastólica (DD), bem como investigar o envolvimento da CaMKII nesta fisiopatologia. Ratas *Wistar* ovariectomizadas foram subdivididas em 4 grupos: SHAM disfunção diastólica (Sham); Sham + AE; DD; DD + AE. O tratamento com AE foi realizado por 4 semanas, sendo iniciado no primeiro dia após a indução de DD. Ao término do tratamento, foi realizada a hemodinâmica cardíaca para análise das pressões sistólica (PSVE) e diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) e das derivadas máxima de contração e relaxamento do VE ( $dP/dt+$  e  $dP/dt-$ , respectivamente). Foi avaliado o estresse oxidativo cardíaco "in situ" pela fluorescência do dihydroethidium, expressão proteica da CaMKII e enzimas pró e antioxidantes por Western blotting, assim como, atividade enzimática antioxidante por espectrofotometria. Os animais com DD apresentaram aumento da PDFVE e redução das derivadas  $dP/dt+$  e  $dP/dt-$ , no entanto, o tratamento com AE atenuou a PDFVE, além disso, reduziu a PSVE no grupo DD+AE. A alta produção de EROs no grupo DD foi acompanhada pelo aumento na expressão de gp91phox e redução da superóxido dismutase (SOD-2), o que foi revertido no grupo DD+AE juntamente com o aumento na expressão da catalase. Foi observado aumento da atividade da SOD no grupo DD+AE, por outro lado, o mesmo não ocorreu com a catalase. Além disso, o tratamento com AE reduziu a ativação da CaMKII, analisado pela baixa expressão da p-CaMKII no grupo DD tratado, comparado ao não tratado. Diante disso, conclui-se que o tratamento com AE é capaz de atenuar a disfunção diastólica em modelo experimental de menopausa, via redução do estresse oxidativo associada à diminuição da p-CaMKII, o que torna o AE ser uma opção terapêutica natural promissora para melhor prognóstico da disfunção cardíaca em mulheres acometidas no período da menopausa.

**Palavras-chave:** Disfunção diastólica, ovariectomia, ácido elágico, estresse oxidativo, antioxidante.

## ABSTRACT

Oxidative stress, resulting from cardiovascular disease and estrogen deficiency, is a favorable condition for the development of ventricular diastolic dysfunction as well as progression and severity of cardiac insufficiency. In this sense, studies seek new therapeutic options that can reduce oxidative stress through natural alternative therapy, in which ellagic acid (EA) has been shown as an option for presenting antioxidant properties. The aim of this study was to analyze whether treatment with EA can reduce the production of reactive oxygen species (ROS) and preventing diastolic dysfunction (DD), as well as investigating CaMKII's involvement in this pathophysiology. Wistar rats were ovariectomized and subdivided into 4 groups: SHAM diastolic dysfunction (Sham); Sham + EA; DD; DD + EA. Treatment with EA was carried out for 4 weeks, starting on the first day after induction of DD. At the end of treatment, cardiac hemodynamics was performed to analyze the systolic (LVSP) and final diastolic pressure of the left ventricle (LVEDP) and the maximum LV contraction and relaxation derivatives ( $dP/dt+$  and  $dP/dt-$ , respectively). Cardiac oxidative stress "in situ" was evaluated by dihydroethidium fluorescence, CaMKII protein expression and pro and antioxidant enzymes by Western blotting, as well as antioxidant enzymatic activity by spectrophotometry. The animals with DD showed an increase in LVEDP and a reduction in the derivatives  $dP/dt+$  and  $dP/dt-$ , however, the treatment with EA attenuated the LVEDP and, in addition, it reduced the LVSP in the DD+EA group. The high production of EROS in the DD group was accompanied by an increase in gp91phox expression and a reduction in superoxide dismutase (SOD-2), which was reversed in the DD+EA group together with the increase in catalase expression. An increase in SOD activity was observed in the DD+EA group, on the other hand, the same did not occur with catalase. In addition, treatment with EA reduced CaMKII activation, analyzed by the low expression of p-CaMKII in the treated DD group, compared to the untreated one. Therefore, it is concluded that treatment with EA is able to attenuate diastolic dysfunction in an experimental model of menopause, via reduction of oxidative stress associated with decreased p-CaMKII, which makes EA a promising natural therapeutic option for better prognosis of cardiac dysfunction in women affected during menopause.

**Keywords:** Diastolic dysfunction, ovariectomy, ellagic acid, oxidative stress, antioxidant.



## 1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são consideradas um dos maiores problemas globais de saúde pública (WHO, 2018), representando a principal causa de morte e incapacidade no mundo. Entretanto, a mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) é significativamente maior do que por outras doenças, sendo estimadas 17,7 milhões de mortes no ano de 2015, representando 31% de todas as mortes em nível mundial (OPAS, 2017).

No Brasil, as DCV são responsáveis por mais de 308 mil mortes anualmente, que equivale a 29,4% de todos os óbitos registrados no País em um ano, sendo o infarto e acidente vascular encefálico (AVE) as principais causas (BRASIL, 2011). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), no ano de 2017 foram estimadas 383.961 mortes de cidadãos brasileiros por DCV e, ao final do ano de 2020, estima-se quase 400 mil mortes. Apesar da alta mortalidade, de acordo com o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, a maioria das secretarias monitoram as DCNT e os fatores de risco, evidenciando a vigilância epidemiológica como uma importante ferramenta para o desenvolvimento de estratégias no enfrentamento das DCNT no Brasil (BRASIL, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a maioria das mortes por DCNT são ocasionadas por um conjunto de fatores de risco, dentre os quais destacam-se a inatividade física, alimentação inadequada, consumo excessivo de álcool e tabagismo (WHO, 2014). Além destes fatores, há outros determinantes subjacentes nas DCV que incluem dentre eles a pobreza, estresse, fatores hereditários e envelhecimento da população (OPAS, 2017).

A doença isquêmica do coração (DIC) é responsável pela maioria dos casos de DCV incluindo, principalmente, infarto agudo do miocárdio (IAM), angina estável crônica, aterosclerose e insuficiência cardíaca devido a DIC (FOROUZANFAR et al., 2012; ROTH et al., 2017). Dentre os fatores que contribuem para a mortalidade por DIC estão o índice de massa corporal, a pressão arterial sistólica, o colesterol e o tabagismo (FOROUZANFAR et al., 2012). As doenças isquêmicas podem resultar na disfunção diastólica (DD), que refere-se a anormalidades mecânicas e funcionais presentes durante o relaxamento e o enchimento do ventrículo, independentemente

da fração de ejeção ser normal ou reduzida (DESWAL et al., 2005; FARIA et al., 2015).

A disfunção diastólica é evidenciada pelo aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo em repouso (PDFVE), aumentando o risco de mortalidade na DIC (SALEM et al., 2006; LI et al., 2009). Em estudos clínicos, foi observado uma incidência de disfunção diastólica em mulheres com sinais e sintomas de isquemia cardíaca com ausência de doença arterial coronariana obstrutiva (NELSON et al., 2014; WEI et al., 2016).

A menopausa, um dos principais eventos fisiológicos que acontece nas mulheres um ano após a última menstruação (HARLOW et al., 2012) é caracterizado por alterações dos hormônios sexuais, perfil lipídico, deposição de gordura corporal, (EL KHOUDARY, 2017), aumento de peso corporal, tolerância reduzida à glicose e o aumento da pressão arterial, que são responsáveis por aumentar o risco de desenvolvimento de DCV (ROSANO et al., 2007) e, com o processo de envelhecimento, as mulheres ficam ainda mais suscetíveis a esse risco (SHUFELT et al., 2016). Na disfunção diastólica, a prevalência é aumentada com o avanço da idade e presença de comorbidades cardiovasculares (REDFIELD et al., 2003; ABHAYARATNA et al., 2006), além disso, a DD foi descrita como parte da síndrome pós-menopausa, indicando um papel potencial das alterações hormonais (MASLOV et al., 2019).

Em relação às alterações hormonais, há um declínio natural na produção de estrogênio (E2) folicular ovariano (SHIFREN; GASS, 2014), no qual, pode aumentar o risco de desenvolver DCV, uma vez que o E2 apresenta efeitos cardioprotetores (MENDELSON; KARAS, 1999; IORGA et al., 2017). Os efeitos do E2 são mediados por receptores de estrogênio (RE) expressos no tecido vascular e cardíaco, dos quais compreendem os receptores de estrogênio alfa (RE- $\alpha$ ), beta (RE- $\beta$ ) (GROHÉ et al., 1997; MENDELSON; KARAS, 1999) e, mais recentemente, o receptor de estrogênio acoplado a uma proteína G (GPER) (DESCHAMPS; MURPHY, 2009).

Estudos experimentais demonstraram os efeitos protetores do E2 mediados pelo RE- $\alpha$  na resposta à lesão vascular (PARE et al., 2002) e proteção do coração pós

isquemia-reperfusão por meio da redução da necrose de cardiomiócitos, infiltração de neutrófilos e espécies reativas de oxigênio (EROs) (JEANES et al., 2008). Além disso, foi sugerido importante papel do RE- $\beta$  na atenuação da resposta hipertrófica cardíaca à sobrecarga de pressão (SKAVDAHL et al., 2005) e demonstrado a contribuição de ambos RE- $\alpha$  e  $\beta$  na ativação de células progenitoras endoteliais circulantes, melhora da neovascularização após lesão isquêmica e preservação da função cardíaca após o IM (HAMADA et al., 2006). Quanto à ativação do receptor GPER, estudos experimentais em corações isolados submetidos à isquemia-reperfusão, também demonstraram melhora na recuperação funcional cardíaca (DESCHAMPS; MURPHY, 2009; BOPASSA et al., 2010).

Para reverter a baixa produção de estrogênio, a terapia de reposição hormonal (TRH) foi a solução durante muitos anos (PITKIN, 2012). Em revisão sistemática publicada pela Cochrane, foi apontado eficácia da terapia hormonal sintética na prevenção da osteoporose pós-menopausa, porém, não demonstrou efeito nem para prevenção primária ou secundária de DCV, além disso, tanto a reposição com estrogênio quanto terapia combinada aumentam significativamente o risco de AVE e o uso ao longo prazo da terapia combinada aumenta o risco de eventos coronários, câncer de mama, morte por câncer de pulmão e demência (MARJORIBANKS et al., 2017). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento e investigação de terapias alternativas naturais sem riscos de efeitos adversos para o tratamento e prevenção de DCV em mulheres acometidas na menopausa.

Para a maioria das mulheres, a menopausa espontânea, conhecida também como menopausa natural, inicia-se entre 45 e 55 anos (HALL, 2015), apresentando uma idade média de 51 anos (HALE; ROBERTSON; BURGER, 2014). No entanto, em alguns casos a menopausa pode ocorrer antes da faixa etária esperada, sendo caracterizado como menopausa precoce com idade entre 40 e 45 anos, prematura com menos de 40 anos e induzida por meio de cirurgia ou ablação ovariana por radiação (STUENKEL et al., 2015).

Cerca de três quartos de todas as mortes de mulheres na pós-menopausa podem ser atribuídas às doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, entretanto, as DCV apresentam-se como as principais causas de morte em mulheres (ROGER et al., 2012), sendo rara em jovens, e na maioria dos países desenvolvidos ela se torna a

principal causa de mortalidade e morbidade em mulheres com faixa etária acima de 50 anos de idade (EBERHARDT, 2001).

A menopausa precoce e a histerectomia (com ou sem preservação dos ovários) guardam relação quanto ao surgimento de diabetes, doenças neurológicas, osteoporose, DCV e aumento da mortalidade (GALLAGHER, 2007; SHUSTER et al., 2010; INGELSSON et al., 2011; BRAND et al., 2013). Embora a histerectomia não seja considerada uma menopausa induzida, este procedimento com preservação ovariana demonstrou resultar diminuição na função dos ovários (TRABUCO et al., 2016) e, quando realizado em mulheres com 50 anos ou menos, aumenta consideravelmente o risco de DCV, sendo intensificado pelo procedimento de ovariectomia (HOWARD et al., 2005).

Os mecanismos fisiopatológicos das DCV são diversos, mas apresentam como característica comum o estresse oxidativo (HILL; SINGAL, 1996; JURÁNEK; BEZEK, 2005; SENONER; DICHTL, 2019), no qual também é evidenciado na deficiência de E2 (STREHLOW et al., 2003). Essa correlação é especialmente importante, no que diz respeito ao aumento das DCV em mulheres no período pós-menopausa, caracterizado pela interrupção na produção de E2 (PIRO et al., 2010; dos SANTOS et al., 2014).

O estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre a alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a falha dos sistemas de defesa antioxidante do organismo (KUNSCH; MEDFORD, 1999; TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011; STEINBERG, 2013). Fisiologicamente, quando em baixos níveis, as EROs estão envolvidas em importantes funções sinalizadoras de diferentes mecanismos, como na vasodilatação (GORDISH; BEIERWALTES, 2014) e defesa contra microorganismos patogênicos por meio dos neutrófilos via superóxido (PHAN et al., 2018), no entanto, o aumento dos níveis das EROs é caracterizado como um processo patológico, capaz de provocar estresse oxidativo (MORIS et al., 2017; PIZZINO et al., 2017; SENONER; DICHTL, 2019).

Como resultado do metabolismo celular fisiológico, as EROs são produzidas a partir do oxigênio molecular. As EROs são divididas em um grupo composto por espécies radicalares, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), radicais peroxila

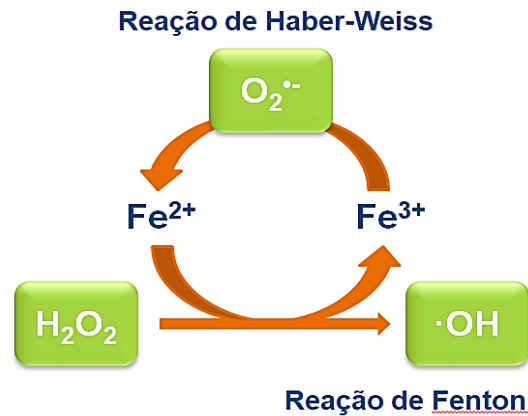
(ROO-) e outro por espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio ( $O_3$ ). Já as espécies radicalares e não radicalares à base de nitrogênio estão o dióxido de nitrogênio ( $\bullet NO_2$ ), radicais óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) e peroxinitrito (ONOO-), chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Os radicais são espécies com alta reatividade e instáveis, ao contrário dos não radicais que são menos reativos e mais estáveis com um tempo de meia-vida maior (HALLIWELL, 2006; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; APEL; HIRT, 2004; MCCORD, 2000).

A alta produção de EROs, mais precisamente de  $O_2^{\bullet -}$ , foi observada nos tecidos cardíaco e vascular de ratas ovariectomizadas (JOHAR et al., 2006; CLAUDIO et al., 2017). Além disso, a privação de estrogênio, característico da ovariectomia, exacerba o aumento da pressão de enchimento ventricular, elevando a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) e diminui o relaxamento do miocárdio em modelos de hipertensão (CHAPPELL et al., 2003; MORI et al., 2011; WANG et al., 2012). Essas alterações cardíacas são observadas na disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (DDVE), na qual estudos têm relacionado essa disfunção à diversas alterações intracelulares e biomoleculares, inclusive com o estresse oxidativo (SILBERMAN et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

A disfunção diastólica pode ser ocasionada por vários fatores como o envelhecimento (HIROTA, 1980; CHEN et al., 1998), hipertensão (HOGG; SWEDBERG; MCMURRAY, 2004; SANDERS; DUDLEY; GROBAN, 2009), síndrome metabólica (de las FUENTES et al., 2007), doença renal crônica (CORREA de Sa et al., 2010; VOGEL et al., 2012), diabetes mellitus, estenose aórtica e isquemia cardíaca (KITZMAN; LITTLE, 2012). Quanto à isquemia do miocárdio, observa-se o aumento da produção de EROs, especialmente devido a grande liberação de ferro nestas condições, que levam a produção de radical hidroxil ( $OH\bullet$ ) a partir de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2^{\bullet -}$  (MERKOFER et al., 2006).

Resumidamente, o  $O_2^{\bullet -}$  pode facilitar a geração de demais EROs por meio de outras vias que envolve a reação de  $O_2^{\bullet -}$  com  $Fe^{3+}$  para gerar  $Fe^{2+}$ , ou seja, forma reduzida de ferro (pela aquisição de elétrons), no qual vai reagir com  $H_2O_2$  ocorrendo a reação de Fenton para gerar  $OH\bullet$ , conforme demonstrado na Figura 1. A reação de Haber-Weiss é definida pelas reações que acontecem entre  $O_2^{\bullet -}$  e  $H_2O_2$  para gerar  $OH\bullet$  na

presença de ferro (MÜNDEL et al., 2015). O radical  $\text{OH}\cdot$  é classificado como o mais reativo das EROs podendo causar danos a proteínas, lipídeos, carboidratos e ao DNA das células (BIRBEN et al., 2012).



**Figura 1.** Reação de Fenton no tecido cardíaco. O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reage com o Ferro que, posteriormente, reage com  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar  $\text{OH}\cdot$  por meio da Reação de Fenton. Adaptado de Münzel et al., 2015.

Em condições fisiológicas, a contração ventricular ocorre pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) através do receptor de rianodina (RyR), aumentando a concentração intracitosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) durante a sístole, enquanto que no relaxamento do miocárdio ocorre, principalmente, quando o  $\text{Ca}^{2+}$  é transportado de volta para o RS pelo retículo sarco/endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) (BAKER et al., 1998; PERIASAMY; HUKE, 2001; DUPONT et al., 2012). A atividade da SERCA é regulada por seu inibidor fosfolambam (PLB), no qual, quando fosforilado em Ser16 (p16-PLB) pela proteína quinase A (PKA) e / ou Thr17 por quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII), reduz os efeitos inibitórios de PLB sobre a SERCA, aumentando a recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  (EDES; KRANIAS, 1987; DUPONT et al., 2012). No entanto, quando ocorre alteração nesse mecanismo de homeostase e remoção do  $\text{Ca}^{2+}$ , o relaxamento ventricular é prejudicado levando a disfunção diastólica (KASS; BRONZWAER; PAULUS, 2004).

Em estudo experimental foi demonstrado a atuação do óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase (NOS) envolvendo a isoforma neuronal (nNOS) na modulação do relaxamento cardíaco por meio dos mecanismos de fosforilação de PLB (ZHANG et al., 2008). No entanto, em condições de estresse oxidativo cardíaco, foi demonstrado em modelo de camundongos hipertensos que há o desacoplamento da NOS e, como

consequência, redução na recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico resultando na disfunção diastólica (SILBERMAN et al., 2010).

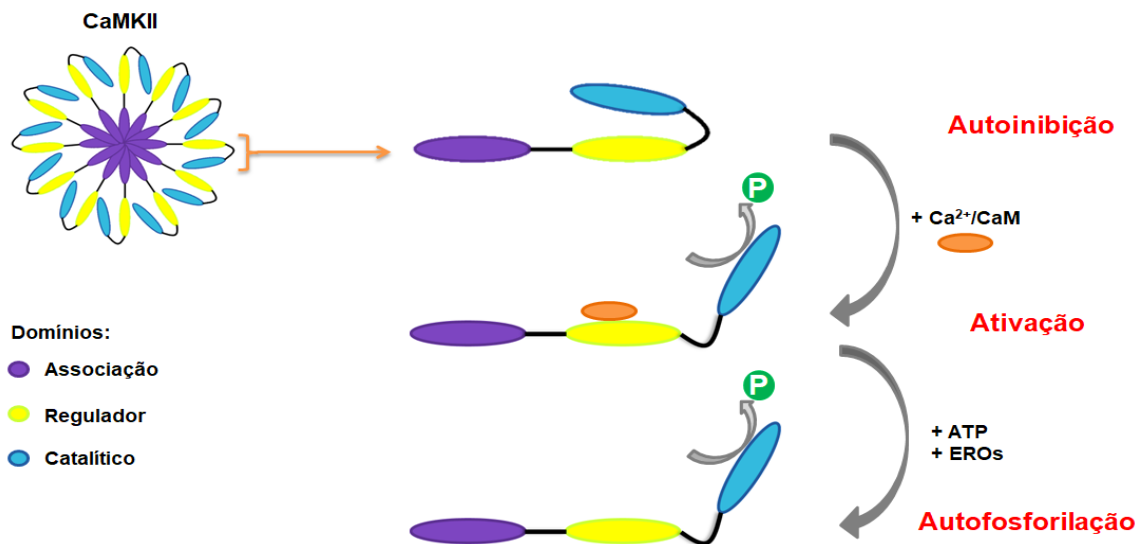
Além disso, estudos sugerem o envolvimento da quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) na disfunção diastólica (SOSSALLA et al., 2011; ZHANG et al., 2005). A proteína CaMKII é considerada um mediador chave na regulação de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração (WAGNER et al., 2013). A CaMKII é encontrada em diferentes tecidos, sendo as isoformas CaMKII $\alpha$  e  $\beta$  expressas no tecido neuronal (MILLER; KENNEDY, 1985; HUDMON; SCHULMAN, 2002) e as isoformas CaMKII $\delta$  e  $\gamma$  expressas no tecido cardíaco, com predomínio da isoforma  $\delta$  no coração (TOBIMATSU; FUJISAWA, 1989; EDMAN; SCHULMAN, 1994; MAIER; BERS, 2007; BACKS et al., 2009), portanto, sendo responsável pela maior parte das atividades da CaMKII nos cardiomiócitos (KREUSSER et al., 2014; GRIMM et al., 2015).

A holoenzima CaMKII é constituída por subunidades contendo três domínios principais: os domínios de associação C-terminal se ligam para compor a parte central na holoenzima direcionando a montagem multimérica; o domínio regulador que controla a ativação (quando se liga a calmodulina) e a autoinibição enzimática (quando se liga ao domínio catalítico); e o domínio catalítico que desempenha a função quinase de CaMKII de fosforilação dos alvos (HUDMON; SCHULMAN, 2002; GAERTNER et al., 2004; ROSENBERG et al., 2005).

Sob condições de repouso, a CaMKII é inativa pelo fato do domínio catalítico estar retringido a uma conformação inativa, porém, quando há o aumento da concentração intracelular de cálcio [ $\text{Ca}^{2+}_i$ ], o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a calmodulina (CaM) formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  que se liga ao domínio regulatório levando a uma alteração conformacional que interrompe o efeito autoinibitório do domínio regulador no domínio catalítico, ativando a CaMKII (SAITOH; SCHWARTZ, 1985; HUDMON; SCHULMAN, 2002; ROSENBERG et al., 2005; ANDERSON, 2011), permitindo o acesso do substrato e do ATP ao domínio catalítico (SAITOH; SCHWARTZ, 1985) conforme demonstrado na Figura 2.

A ativação da CaMKII pode se tornar de forma sustentada, ou seja, sem a dependência da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 2). Isso ocorre em

situações de aumentos sustentados de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  na presença, por exemplo, de ATP, resultando em autofosforilação na região autoinibitória do domínio regulatório e isso impede a associação entre os domínios regulatório e catalítico (LOU; LLOYD; SCHULMAN, 1986; MEYER et al., 1992).



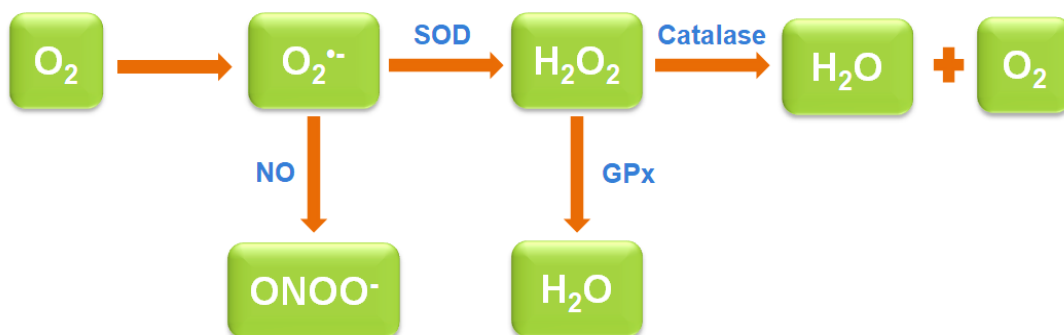
**Figura 2.** Representação estrutural e funcional da CaMKII no tecido cardíaco. A CaMKII é formada por várias subunidades compostas por três domínios (associação, regulador e catalítico). Em repouso, a CaMKII permanece no seu estado de autoinibição pela interação entre os domínios regulatório e catalítico, porém, quando aumenta as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , é formado o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  que ativa a CaMKII pela ligação no domínio regulatório. A atividade autônoma/sustentada da CaMKII ocorre quando há um aumento prolongado de  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de ATP ou até mesmo pelas EROs. Adaptado de Anderson, 2009; Erickson, 2014.

Estudos demonstram que a atividade e expressão da CaMKII está aumentada em doenças cardíacas marcadas por ativação neuro-humoral, como no IM (SINGH et al., 2012; LUO et al., 2013). Uma das vias de ativação da CaMKII é por meio do aumento na formação das EROs produzidas por várias fontes, incluindo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, mitocôndrias (ERICKSON et al., 2008). No entanto, as EROs podem ser neutralizadas no organismo por um sistema de defesa antioxidante enzimático que incluem principalmente a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutiona peroxidase (GSH-Px) e não enzimático como a glutiona reduzida (GSH) e coenzima Q10 (CoQ10) presentes no próprio organismo, assim como, antioxidantes adquiridos na dieta, dentre eles o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C),  $\beta$ -caroteno, flavonóides, polifenóis, entre outros



(EVANS; HALLIWELL, 2001; VENARDOS et al., 2007; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; RODRIGO; PRIETO; CASTILLO, 2013).

Como relatado anteriormente, o  $O_2^{\cdot-}$  é produzido fisiologicamente pelo metabolismo celular a partir do  $O_2$ , porém, devido aos seus efeitos oxidativos no tecido cardíaco, as enzimas antioxidantes convertem as EROs em outras moléculas (Figura 3), como no caso da SOD que desmota o  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  (DUPUY et al., 1991). A SOD é encontrada em três isoformas sendo a CuZnSOD (SOD1) encontrada no citosol, a MnSOD (SOD2) encontrada nas mitocôndrias e a EC-SOD (SOD3) que é extracelular (WALTERS et al., 2016). Por conseguinte, outras enzimas antioxidantes entram em ação para degradar o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (por meio da GPx) e em  $H_2O + O_2$  (por meio da Catalase) a fim de eliminar as moléculas oxidantes do tecido cardíaco. Além disso, o  $O_2^{\cdot-}$  pode reagir com o  $\cdot NO$  para formar  $ONOO^-$ , reduzindo então a biodisponibilidade de NO que é citoprotetor (TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011; MÜNDEL et al., 2015).



**Figura 3.** Representação das reações antioxidantes enzimáticas da SOD, Catalase e GPx no tecido cardíaco. As enzimas antioxidantes possuem a função de transformar as EROs em moléculas não prejudiciais às células como, por exemplo, água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). Adaptado de Münzel et al., 2015.

Estudos demonstram que o aumento ou prevenção na diminuição da expressão das enzimas antioxidantes SOD e CAT estão envolvidos no efeito vaso e cardioprotetor em ratas ovariectomizadas submetidas ao IM (de OLIVEIRA et al., 2019; ALMEIDA et al., 2014). Com isso, é de suma importância a realização contínua de estudos experimentais e clínicos para compreensão dos mecanismos de ação envolvidos tanto no tratamento quanto na prevenção das doenças que envolvem o sistema cardiovascular.

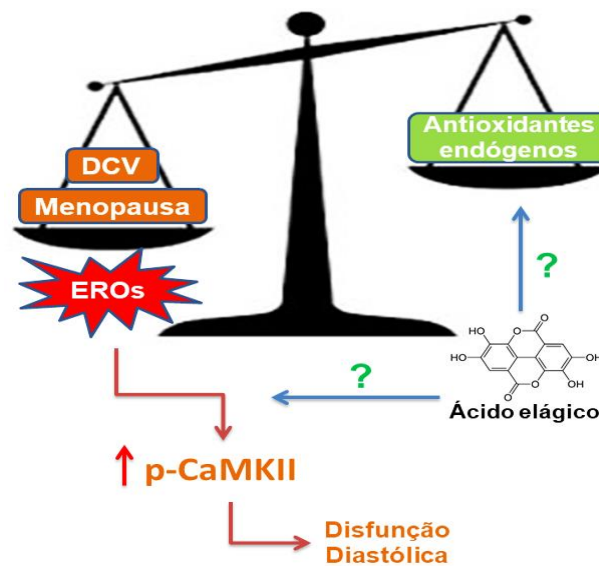
Atualmente, diversas drogas sintéticas são usadas para o tratamento das DCV, porém, elas não são equivalentes para todas as situações devido a seus efeitos adversos e diferentes fatores etiológicos no desenvolvimento das doenças que acometem o sistema cardiovascular (ALSHEIKH-ALI; KUVIN; KARAS, 2004). Portanto, alternativas naturais com menores efeitos adversos podem ser novas opções terapêuticas na prevenção e tratamento das disfunções cardíacas relacionadas ao estresse oxidativo.

As terapias alternativas com o uso de fitonutrientes vêm se tornando cada vez mais populares, pelo fato desses nutrientes não apresentarem efeitos colaterais indesejáveis e por serem baratos (AMAKURA et al., 2000). O ácido elágico (4,4', ácido 5,5', 6,6'-hexa-hidroxi-difênico 2,6,2', 6'-dilactona) (AE) é um dos compostos naturais polifenólicos considerado como cardioprotetor por apresentar propriedades farmacológicas antiinflamatória e antioxidante (AMAKURA et al., 2000; GARCIA-NINO; ZAZUETA, 2015). O AE é encontrado naturalmente em várias frutas como romãs, morango, framboesas, uvas, groselhas, amora, bem como nozes e vegetais (TALCOTT; LEE, 2002; ASCACIO-VALDÉS et al., 2011).

A ingestão total de polifenóis encontrados nos alimentos pode chegar a 100-150 mg por dia, sendo considerado muito maior do que todas as outras classes de fitoquímicos (MANACH et al., 2004). Os polifenóis possuem efeitos antioxidantes devido a ação protetora contra danos causados pela formação de EROs e, também, pela sua capacidade quelante de ferro (PERRON; BRUMAGHIM, 2009). De acordo com estudos, a ação antioxidante do AE está associada à inibição de necrose do miocárdio (KANNAN; QUINE, 2011), proteção da membrana celular da peroxidação lipídica (TÜRK et al., 2008), redução no desenvolvimento da lesão aterosclerótica e disfunção endotelial (DING et al., 2014) e melhora na recuperação estrutural e funcional do metabolismo energético do miocárdio com o uso combinado de AE e indapamida (DOUGAN; CHEKMAN, 2015).

De fato, o AE parece exercer efeitos cardioprotetores, com potenciais promissores para o tratamento de desordens clínicas, contudo, poucos são os estudos utilizando o AE como forma de tratamento nas disfunções cardíacas e, além do mais, a literatura carece de estudos experimentais para entender a via de ação nas disfunções cardíacas em situação de privação de estrogênio.

Em virtude de estudos experimentais anteriores utilizando o AE como forma de tratamento não serem com modelo experimental de menopausa, uma vez que os hormônios sexuais feminino são considerados cardioprotetores, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento com AE é capaz de reduzir a formação de EROs e prevenir a disfunção diastólica em ratas ovariectomizadas, bem como investigar o envolvimento da CaMKII nesta fisiopatologia cardíaca (Figura 4).



**Figura 4.** Ilustração dos fatores e vias biomoleculares que levam a disfunção diastólica ventricular. Nas DCV e menopausa, observa-se o aumento da produção de EROs, em contrapartida, redução do sistema antioxidante endógeno o que leva ao estresse oxidativo. Em condições pró-oxidantes, a CaMKII é altamente ativada por meio da fosforilação (p-CaMKII), resultando na alteração da atividade das proteínas responsáveis pela liberação e recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à disfunção diastólica. Logo, o AE surge como uma terapia antioxidante alternativa no combate as EROs em doenças cardíacas. Fonte: O autor (2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa tem como objetivo analisar os efeitos do Ácido Elágico sobre a disfunção diastólica em ratas ovariectomizadas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

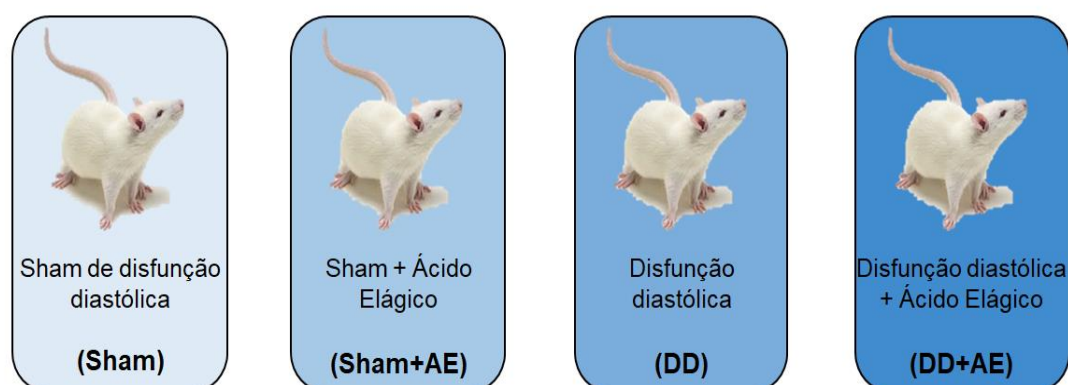
Avaliar os efeitos do tratamento com AE no ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas com disfunção diastólica, investigando as seguintes análises:

- Parâmetros funcionais cardíacos de pressão sistólica, diastólica,  $dP/dt+$  e  $dP/dt-$ ;
- Produção de Ânion Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pela fluorescência produzida na oxidação do dihidroetídeo (DHE);
- Expressão das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase e Catalase;
- Expressão proteica pró-oxidante da subunidade da NADPH oxidase (gp91phox);
- Expressão das proteínas CaMKII e p-CaMKII;
- Atividade das enzimas antioxidante Superóxido Dismutase e Catalase.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização desta pesquisa foram solicitados do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 160 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com oito semanas de vida e peso corporal entre 200 e 300g. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas (4/1), com livre acesso à água e ração (Purina Labina®, SP, Brazil). Foi controlada as condições de temperatura do ambiente (22-24°C), umidade (40-60%) e luminosidades (12 h claro e 12 h escuro). Todos os animais foram submetidos ao procedimento de Ovariectomia (OVX) e separados aleatoriamente em quatro grupos de 8 animais identificados de acordo com os tratamentos (Figura 5):

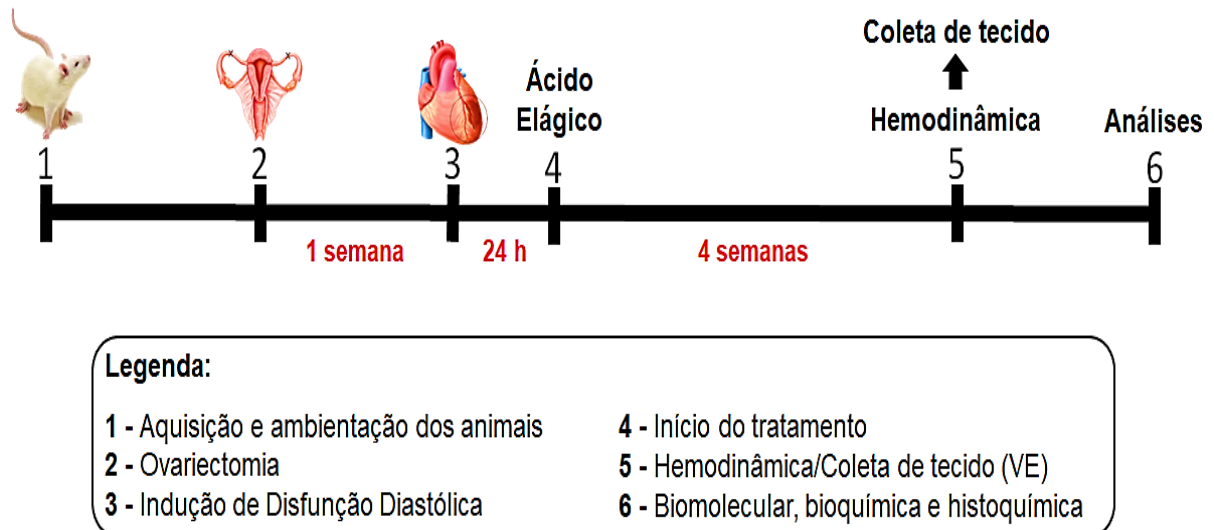


**Figura 5.** Representação esquemática da distribuição dos grupos.

Esta pesquisa foi submetida a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da UFES e aprovada sob número 13/2019. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme a orientação do “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011)”, seguindo as normas do manual de biossegurança. As eutanásias foram feitas por meio da sobredosagem anestésica com Cetamina e Xilazina (150mg/kg e 30mg/kg *i.p.*, respectivamente) e os animais foram descartados apropriadamente em freezers instalados no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

### 3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O esquema cronológico dos protocolos experimentais representado abaixo (Figura 6) compreende desde a aquisição e ambientação dos animais até as análises do tecido cardíaco coletado.



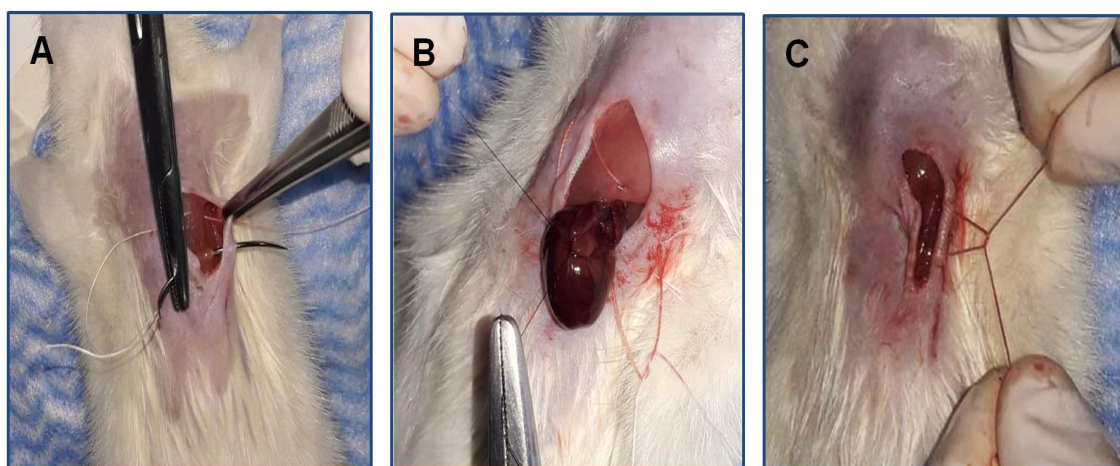
**Figura 6.** Representação do esquema cronológico do protocolo experimental.

#### 3.2.1 Ovariectomia

O procedimento de ovariectomia foi realizado de acordo com a técnica descrita por Hernández et al., (2000), em que os animais foram anestesiados e sedados com Cetamina e Xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg *i.p.*, respectivamente) e, posteriormente, foi realizado incisões sequenciais sobre a pele e o músculo, de aproximadamente 1 a 1,5 cm, na região intermédia entre o último rebordo costal e a coxa para exposição do ovário, onde o mesmo foi exteriorizado e extirpado e a trompa uterina foi laqueada com fio cirúrgico. Estes procedimentos foram realizados bilateralmente em todos os animais. Após a retirada dos ovários, a musculatura e a pele foram suturadas e todos os animais receberam uma injeção de antibiótico (Enrofloxacina – 2,5% - 0,1 mL – intramuscular - *i.m.*) e analgésico (Dipirona Monoidratada 500 mg/ml – 2 gotas via oral).

### 3.2.2 Indução de disfunção diastólica

Após uma semana do procedimento de ovariectomia, os animais foram novamente anestesiados com Cetamina e Xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg *i.p.*, respectivamente). Para induzir à disfunção diastólica, foi realizado a oclusão da artéria coronária de acordo com Baldo et al., (2012), sendo realizado uma incisão no nível do quarto espaço intercostal esquerdo para exposição do coração. Em seguida, o coração foi exteriorizado e o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi permanentemente ocluído por um fio de mononylon 6.0 montado em agulha não traumática. Após a oclusão, o coração foi retornado para cavidade torácica e o tórax foi imediatamente fechado com uma sutura previamente preparada conforme demonstrado na Figura 7. Os animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham) passaram por todos os procedimentos descritos anteriormente, exceto a oclusão do ramo da artéria coronária. O eletrocardiograma (ECG) foi realizado antes e após a oclusão da artéria coronária como critério usado para avaliação de isquemia cardíaca (BASHAR; SAMIR EL-SHERBEINY; BORAIE, 2018). Após o procedimento, todos os animais receberam uma injeção de antibiótico (Enrofloxacina - 2,5% - 0,1 mL - intramuscular - i.m.) e analgésico (Dipirona Monoidratada 500 mg/ml - 2 gotas via oral - associada com o opioide Tramadol 100mg/ml – 1 gota via oral).



**Figura 7.** Etapas do procedimento para indução de disfunção diastólica. (A) Incisão da pele, dissecação dos músculos e realização da técnica de sutura em bolsa que consiste na sutura da pele juntamente com os músculos; (B) Exteriorização do coração e ligadura do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda; (C) Retorno do coração para a caixa torácica e fechamento do tórax por meio da sutura em bolsa previamente preparada. Fonte: arquivo pessoal.

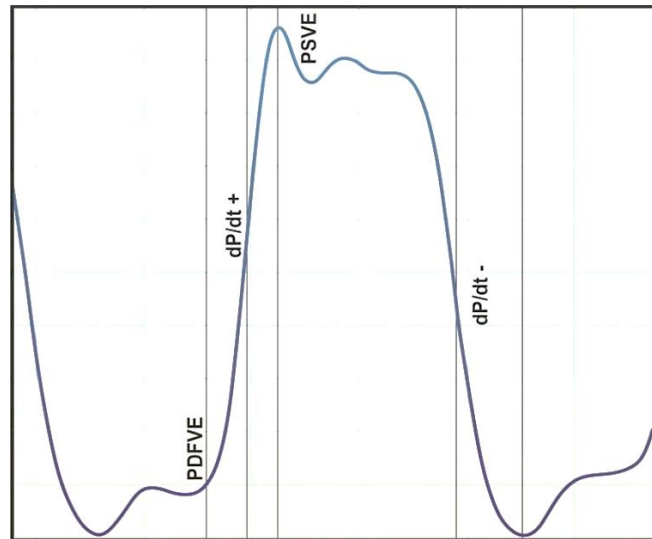
### 3.2.3 Tratamento com ácido elágico

O ácido elágico (Sigma-Aldrich, EUA) foi diluído em carboximetilcelulose (CMC), às proporções de 30 mg/kg/dia para os grupos a serem tratados. A administração de AE por gavagem foi por um período de 4 semanas, sendo iniciado no primeiro dia após a ligadura da artéria coronária para indução de disfunção diastólica, já os animais Sham receberam somente veículo (CMC) por gavagem durante o mesmo período. O peso corporal foi medido semanalmente e a dose foi ajustada em conformidade. A dose utilizada no presente estudo baseou-se entre as doses (7,5 mg/kg/dia) e (50 mg/kg/dia) como descrito na literatura (KANNAN; QUINE, 2011; WEI et al., 2017).

### 3.2.4 Avaliação hemodinâmica

Quarenta e oito horas após o último dia de tratamento com AE, os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg *i.p.*, respectivamente) para a avaliação da pressão arterial (PA) e da função do ventrículo esquerdo (VE). Um cateter de polietileno (PE50) preenchido com solução salina heparinizada (50 U/ml – Ariston Heparina Sódica, São Paulo, SP, Brazil) foi introduzido na artéria carótida direita e, em seguida, conectado a um transdutor de pressão (FE221 Bridge Amp, ADInstruments, Austrália) o qual foi acoplado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/35) para registrar as pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM). Posteriormente, o cateter foi conduzido cuidadosamente até o VE, onde foram obtidas as pressões sistólica (PSVE) e diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), taxa máxima de desenvolvimento da pressão ventricular ( $dP/dt +$ ) e taxa máxima de decaimento da pressão ventricular ( $dP/dt -$ ) (Figura 8). Após a avaliação da função ventricular, o cateter foi recuado para a artéria carótida para verificar a integridade da valva aórtica pela pressão arterial inalterada. Animais que apresentaram PDFVE acima de 20 mmHg foram considerados com DDVE (ALMEIDA et al., 2014).





**Figura 8.** Representação da onda de pressão ventricular com suas respectivas variáveis. Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE); taxa máxima de desenvolvimento da pressão ventricular ( $dP/dt +$ ); pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e taxa máxima de decaimento da pressão ventricular ( $dP/dt -$ ).

### 3.2.5 Coleta de tecidos

Após o término da avaliação hemodinâmica, os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica e o coração foi rapidamente removido, lavado em solução salina e dissecado o ventrículo esquerdo. Para as análises do estresse oxidativo, expressão proteica e atividade enzimática, o VE foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os pulmões também foram removidos e, em seguida, limpos, pesados e levados à estufa ( $98^{\circ}\text{C}$ ) por um período de 24 horas para avaliar a congestão pulmonar por meio da determinação do percentual de água. O útero foi removido e pesado para verificar a eficiência do procedimento de castração.

### 3.2.6 Expressão proteica pela técnica de Western Blotting

#### 3.2.6.1 Quantificação de proteínas e preparo das amostras

As amostras do VE foram homogeneizadas em tampão de lise contendo: Tris-HCL pH 7,4 (10 mM),  $\text{NaVO}_3$  (1 mM), SDS (1%), DTT (0,5 mM), EDTA (5 mM), PMSF (1

mM) e inibidor de protease (diluição 1: 100). Os homogeneizados do tecido cardíaco foram centrifugados por 20 minutos a 12.000 rpm com temperatura a 4° C (Eppendorff, Alemanha). Após a centrifugação foi coletado o sobrenadante para quantificar a concentração de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

### 3.2.6.2 Eletroforese e Transferência das amostras

As amostras homogeneizadas (100 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) a 10-12,5% (gel de corrida: Tris 1,5M – SDS (0,1%) pH 8,6, Bis/Acrilamida 30%, APS 10% e Temed) e 4% (gel de entrada: Tris 0,5M – SDS (0,1%) pH 6,8, Bis/Acrilamida 30%, APS 10% e Temed). Após a polimerização dos géis, os mesmos foram colocados em uma cuba contendo tampão de corrida para eletroforese (Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%) e foi pipetado as amostras nos poços do gel de entrada. Logo após, foi realizado a corrida das proteínas por meio da eletroforese por aproximadamente 2 horas e 30 minutos a uma corrente constante de 60V nos primeiros 20 min e depois a 100V, observando sempre o marcador de peso molecular (PowerPac™ HC, BioRad, CA, EUA). Em seguida, foi montado um sistema de sanduíche contendo o gel, membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), papel filtro e esponjas para colocar na cuba com uma solução de tampão de transferência (Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20%) que foi mantida em aproximadamente 4° C durante todo processo de transferência das proteínas para as membranas por um período de 2 horas à 80V.

### 3.2.6.3 Incubação com os Anticorpos

Após a transferência em um sistema de blotting úmido, as membranas foram bloqueadas com TBS-T (NaCl 100 mM, Tris Base 10 mM, Tween 20 à 0,1%, pH 7,6) + leite desnatado (5%) por um período de aproximadamente 1 h e 30 min e depois lavadas com TBS-T por 4 vezes de 5 min. Após lavar as membranas, as mesmas foram incubadas overnight com anticorpos primário monoclonais de camundongo para catalase (CAT; 1: 2000; Sigma, Estados Unidos), GAPDH (1: 3000; Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), CAMKII e p-CAMKII (1: 500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anticorpos policlonais de coelho para SOD (SOD-2; 1: 500; Sigma, Estados Unidos) e gp91phox (1: 1000; BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). As membranas foram novamente lavadas com TBS-T e incubadas por 1 h e 30 min com anticorpos secundários conjugados à peroxidase IgG anti-mouse ou rabbit (1: 5000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de acordo com as especificações dos anticorpos primário. Os procedimentos de bloqueio, lavagem e incubação foram realizados sob agitação.

#### 3.2.6.4 Detecção das Bandas de Proteínas

Após a incubação com os anticorpos secundários, foi adicionado nas membranas 1 ml do reagente de detecção quimioluminescente ECL Prime Western Blotting (GE Healthcare, Reino Unido) e, por fim, iniciou a imunodeteção por meio do ChemiDoc (Bio-Rad). As proteínas foram quantificadas através do *software* Bio-Rad Image Lab 6.0.1. As mesmas membranas foram usadas para determinar a expressão de GAPDH que foi usado para normalizar os níveis de expressão das demais proteínas.

#### 3.2.7 Análise da atividade antioxidante da SOD e Catalase

A atividade antioxidante das enzimas SOD e catalase foram medidas por espectrofotometria. Para a medição da SOD foi utilizado o método descrito por Misra e Fridovich (1972). Resumidamente, as amostras do tecido cardíaco previamente homogeneizadas (40 µL) foram misturadas ao meio de reação contendo tampão carbonato de sódio (0,2 M; pH 10,2) e KCl (0,015 M) e, em seguida, foi adicionado solução de epinefrina (0,025 M) para iniciar a reação de auto-oxidação que passou por uma leitura à 480 nm com absorbâncias registradas a cada 15 s por 1 minuto. Os resultados são expressos em Unidade de SOD / mg de proteína que é considerado a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da auto-oxidação da epinefrina.

Já na atividade da catalase foi utilizado o método descrito por Aebi (1984) que consistiu na adição de peróxido de hidrogênio (0,066 M) ao meio de reação

contendo tampão fosfato (0,050 M; pH 7,4) e 60  $\mu$ L da amostra homogeneizada sendo, posteriormente, feito a leitura à 240 nm em intervalos de 15 s por 1 min. Os resultados são expressos como o coeficiente de extinção de peróxido por minuto ( $\Delta E \cdot \text{min} / \text{mg}$  de proteína). As análises de leitura de ambas atividades enzimáticas foram realizadas por meio do espectrofotômetro (espectrômetro T80 + UV / VIS, Pg Instruments, Ltd., Reino Unido).

### 3.2.8 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE)

Para avaliar o efeito do tratamento crônico com AE sobre a produção “in situ” de  $O_2^{\cdot-}$ , foi utilizado o método por fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE). Na presença de  $O_2^{\cdot-}$ , o hidroetídio oxida-se dentro da célula produzindo o composto brometo de etídio, que tem afinidade pelo DNA nuclear das células, emitindo fluorescência detectada pelo filtro vermelho. O VE foi mantido por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, este tecido foi congelado em meio adequado (meio de congelamento, Tissue Tek-OCT). Assim, as amostras foram mantidas a  $-80^{\circ} \text{C}$  até o dia do experimento. Seções congeladas não fixadas do coração foram cortadas em secções de 10  $\mu\text{m}$  de espessura e montadas em lâminas de vidro silanizadas. As amostras foram lavadas e incubadas com uma solução de Krebs modificada (contendo HEPES 20 mM) por 30 minutos em uma câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, foram incubadas com o corante fluorescente oxidativo dihidroetídio (DHE, 2  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) em uma câmara escura a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, para detectar  $O_2^{\cdot-}$ . As imagens foram visualizadas por meio do microscópio de fluorescência invertido (DMi8, Leica Microsystems, Alemanha), no qual a intensidade da fluorescência foi detectada a 585 nm e quantificada a partir das imagens de secções do tecido cardíaco utilizando o *software* ImageJ (National Institutes of Health, EUA) por um investigador cego ao protocolo experimental.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Os dados foram previamente analisados, quanto a normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os

dados foram analisados utilizando a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguido pelo teste *post-hoc* de Fisher. Os valores de alfa menores do que 5% foram considerados como estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Para a execução dos testes estatísticos e construção das figuras, foi utilizado o software GraphPad Prisma 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E CONGESTÃO PULMONAR

Não houve diferenças no peso corporal inicial entre os grupos. No entanto, o grupo Sham+AE apresentou menor ganho de peso quando comparado ao grupo Sham ao final do tratamento ( $p < 0.05$ ). No peso dos pulmões, os animais com disfunção diastólica apresentaram um aumento significativo no peso úmido comparado aos grupos Sham e Sham+AE, contudo, esse aumento foi prevenido nos animais que realizaram o tratamento com AE (DD+AE) ( $p < 0.05$ ). Entretanto, não foi observado diferença entre os grupos DD e DD+AE no que diz respeito ao percentual de água no pulmão. A atrofia do útero após a ovariectomia comprova a eficiência da cirurgia de castração e, como esperado, não houve diferença no peso do útero entre os grupos (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Efeitos do AE nos parâmetros ponderais de ratas ovariectomizadas com disfunção diastólica.

	Sham (n = 8)	Sham+AE (n = 8)	DD (n = 8)	DD+AE (n = 8)
PC inicial (g)	236,3 ± 9,2	214 ± 6,6	216,9 ± 8,3	224,9 ± 8,2
PC final (g)	306 ± 10,9	265,4 ± 11,3 *	276,3 ± 11,0	284 ± 15,9
Pulmão (g)	1,55 ± 0,05	1,36 ± 0,04	3,16 ± 0,30 * #	2,37 ± 0,19 * # †
Pulmão/PC (mg/g)	5,17 ± 0,29	4,267 ± 0,75	11,71 ± 1,28 * #	8,58 ± 0,95 * # †
% água no pulmão	75,2 ± 0,51	74,72 ± 0,50	78,97 ± 0,48 * #	78,46 ± 0,63 * #
Peso útero (mg)	0,118 ± 0,010	0,106 ± 0,002	0,142 ± 0,009	0,135 ± 0,022

Os dados são expressos como média ± EPM. PC, peso corporal. \*  $p < 0.05$  vs Sham; #  $p < 0.05$  vs Sham+AE; †  $p < 0.05$  vs DD.

### 4.2 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Os parâmetros hemodinâmicos arteriais dos animais nos diferentes grupos são apresentados na **Tabela 2**. Foi observado uma maior frequência cardíaca (FC) nos animais do grupo DD quando comparado aos grupos Sham e Sham+AE ( $p < 0.05$ ). Quando observado as pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), verificamos que os animais com disfunção diastólica submetidos ao tratamento com AE obtiveram menores níveis pressóricos em relação aos animais não tratados ( $p < 0.05$  vs DD), bem como pressões arteriais normalizadas ( $p > 0.05$  vs Sham e Sham+AE). Não foi observado diferença nas pressões arteriais entre os grupos Sham, Sham+AE e DD.

**Tabela 2.** Parâmetros hemodinâmicos quatro semanas após tratamento com AE em ratas ovariectomizadas com disfunção diastólica.

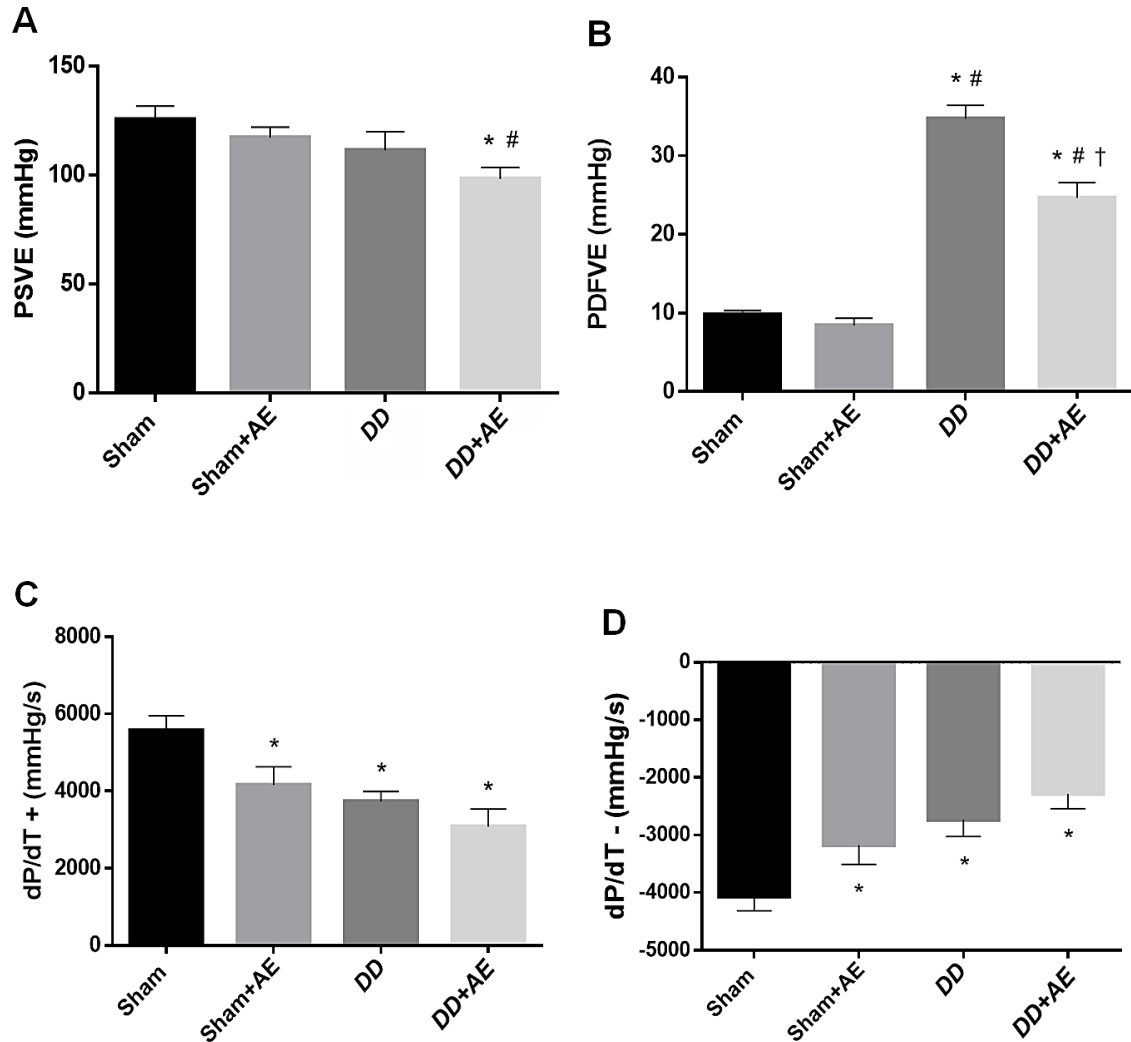
	<b>Sham</b> (n = 8)	<b>Sham+AE</b> (n = 8)	<b>DD</b> (n = 8)	<b>DD+AE</b> (n = 8)
FC (bpm)	200 ± 8	202 ± 8	234 ± 11 * #	225 ± 12
PAS (mmHg)	111 ± 4	114 ± 4	125 ± 10	100 ± 4 †
PAD (mmHg)	84 ± 4	86 ± 4	95 ± 6	76 ± 5 †
PAM (mmHg)	98 ± 3	100 ± 4	107 ± 7	88 ± 5 †

Os dados são expressos como média ± EPM. FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica e PAM, pressão arterial média. \*  $p < 0.05$  vs Sham; #  $p < 0.05$  vs Sham+AE; †  $p < 0.05$  vs DD.

#### 4.3 DISFUNÇÃO DIASTÓLICA

Após 48 horas do último dia de tratamento, foi realizado a análise da função cardíaca e verificamos que entre os grupos Sham, Sham+AE e DD não houve diferenças significativas na pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE). No entanto, após o tratamento com AE, o grupo DD+AE apresentou redução da PSVE quando comparado aos grupos Sham e Sham+AE ( $p < 0.05$ ) (Fig. 9A). Como esperado, a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) foi significativamente maior nos grupos submetidos a isquemia do miocárdio, o que indica presença de disfunção diastólica, entretanto, o tratamento com AE foi capaz de atenuar esse aumento no grupo DD+AE ( $p < 0.05$  vs DD) (Fig. 9B). Os valores das

derivadas  $dP/dt+$  e  $dP/dt-$  foram menores nos grupos com DD e, curiosamente, no grupo Sham+AE quando comparados ao grupo Sham ( $p < 0.05$ ) (Fig. 9C e 9D).



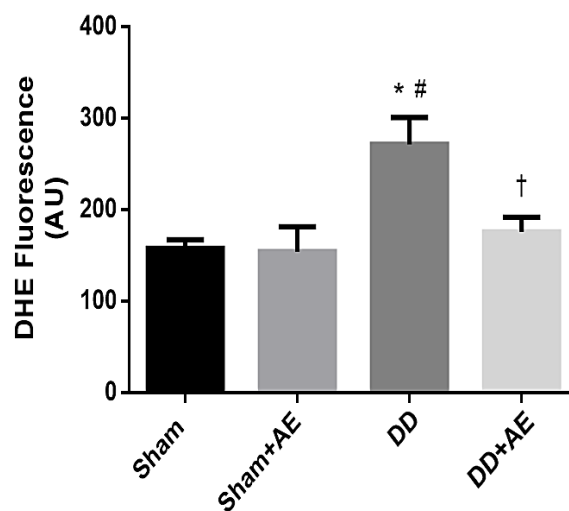
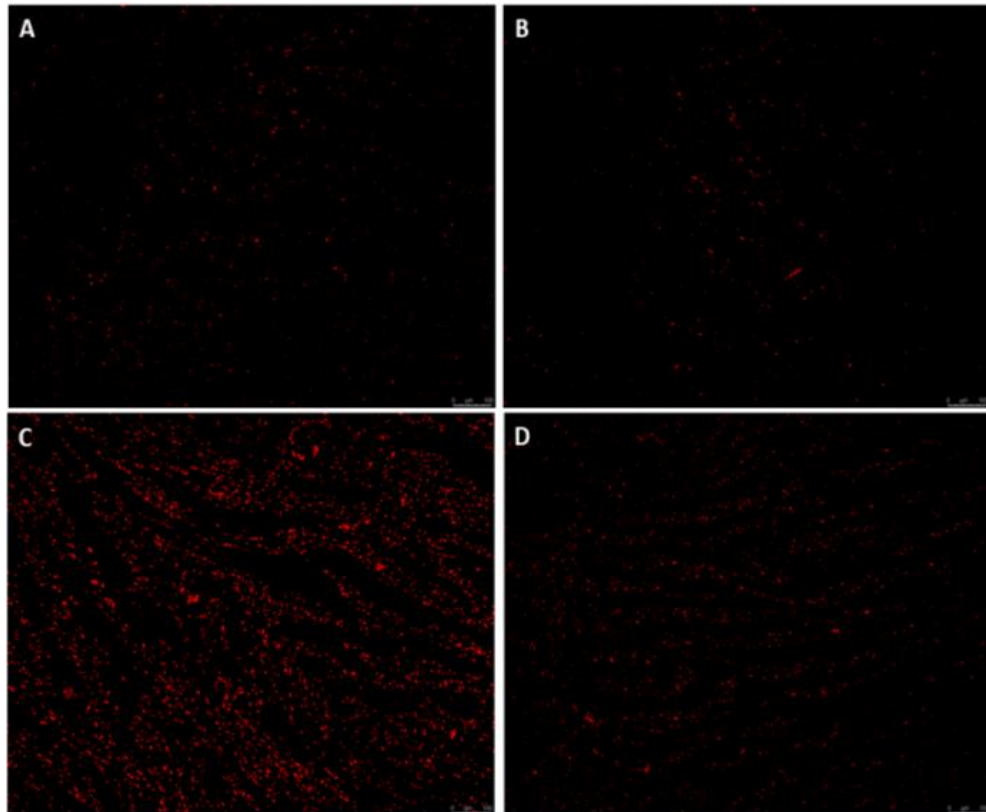
**Figura 9.** Parâmetros funcionais cardíaco. (A) pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); (B) pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE); (C) taxa máxima de desenvolvimento da pressão ventricular ( $dP / dt +$ ); (D) taxa máxima de decaimento da pressão ventricular ( $dP / dt -$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fisher. \*  $p < 0.05$  vs Sham; #  $p < 0.05$  vs Sham+AE; †  $p < 0.05$  vs DD.

#### 4.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA FLUORESCÊNCIA DE DIHYDROETHIDIUM

Foi possível perceber um aumento significativo na formação de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pela intensidade da fluorescência aumentada do DHE no grupo DD (Fig. 10C)



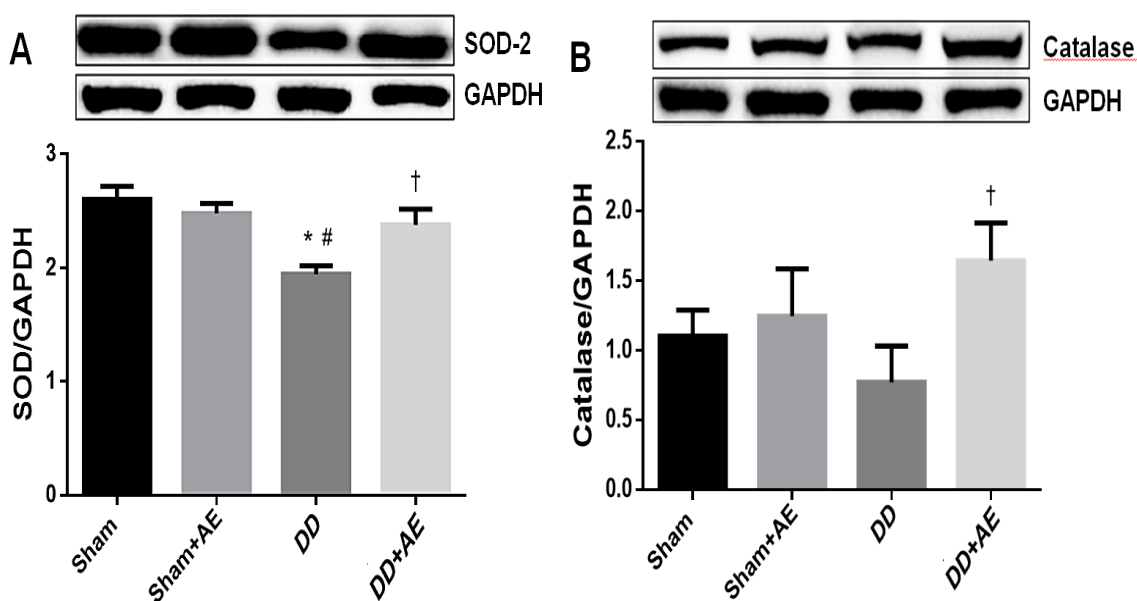
quando comparado aos grupos Sham e Sham+AE ( $p < 0.05$ ) (Fig. 10A e 10B). Por outro lado, o grupo DD submetido ao tratamento com ácido elágico por quatro semanas apresentou uma inibição na formação de  $O_2^{\cdot-}$ , contribuindo para uma redução do estresse oxidativo ( $p < 0.05$  vs DD) (Fig. 10D).

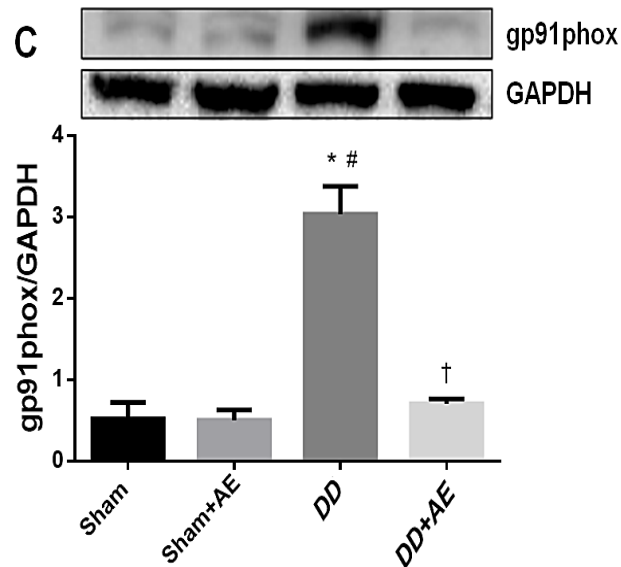


**Figura 10.** Avaliação "in situ" da produção de ânion superóxido no tecido cardíaco. Imagens referentes aos grupos Sham (A); Sham+AE (B); DD (C) e DD+AE (D). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fisher. \*  $p < 0.05$  vs Sham; #  $p < 0.05$  vs Sham+AE; †  $p < 0.05$  vs DD.

#### 4.5 EXPRESSÃO PROTEICA OXIDANTE E ANTIOXIDANTE

Foi analisada a expressão das proteínas do sistema oxidante e antioxidante (Figura 11) para tentar elucidar os mecanismos enzimáticos responsáveis pela diminuição da progressão do estresse oxidativo. Na análise da expressão das proteínas antioxidantes, foi observado redução na expressão da SOD-2 nos animais do grupo DD comparado aos grupos Sham e Sham+AE ( $p < 0.05$ ). Contudo, quando avaliado o efeito do tratamento com AE, os animais do grupo DD+AE apresentaram aumento na expressão da SOD-2 comparado ao grupo DD ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11A). Na expressão da CAT não houve alterações entre os grupos Sham, Sham+AE e DD. Entretanto, o efeito do tratamento pós indução de disfunção diastólica levou ao aumento na expressão desta proteína no grupo DD+AE quando comparado ao grupo DD ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11B). Além disso, ocorreu aumento significativo na expressão da gp91phox, proteína pró-oxidante, no grupo DD comparado aos demais grupos ( $p < 0.05$  vs Sham e Sham+AE), o que foi prevenido com o tratamento com AE no grupo (DD+AE;  $p < 0.05$ ) (Fig. 11C).

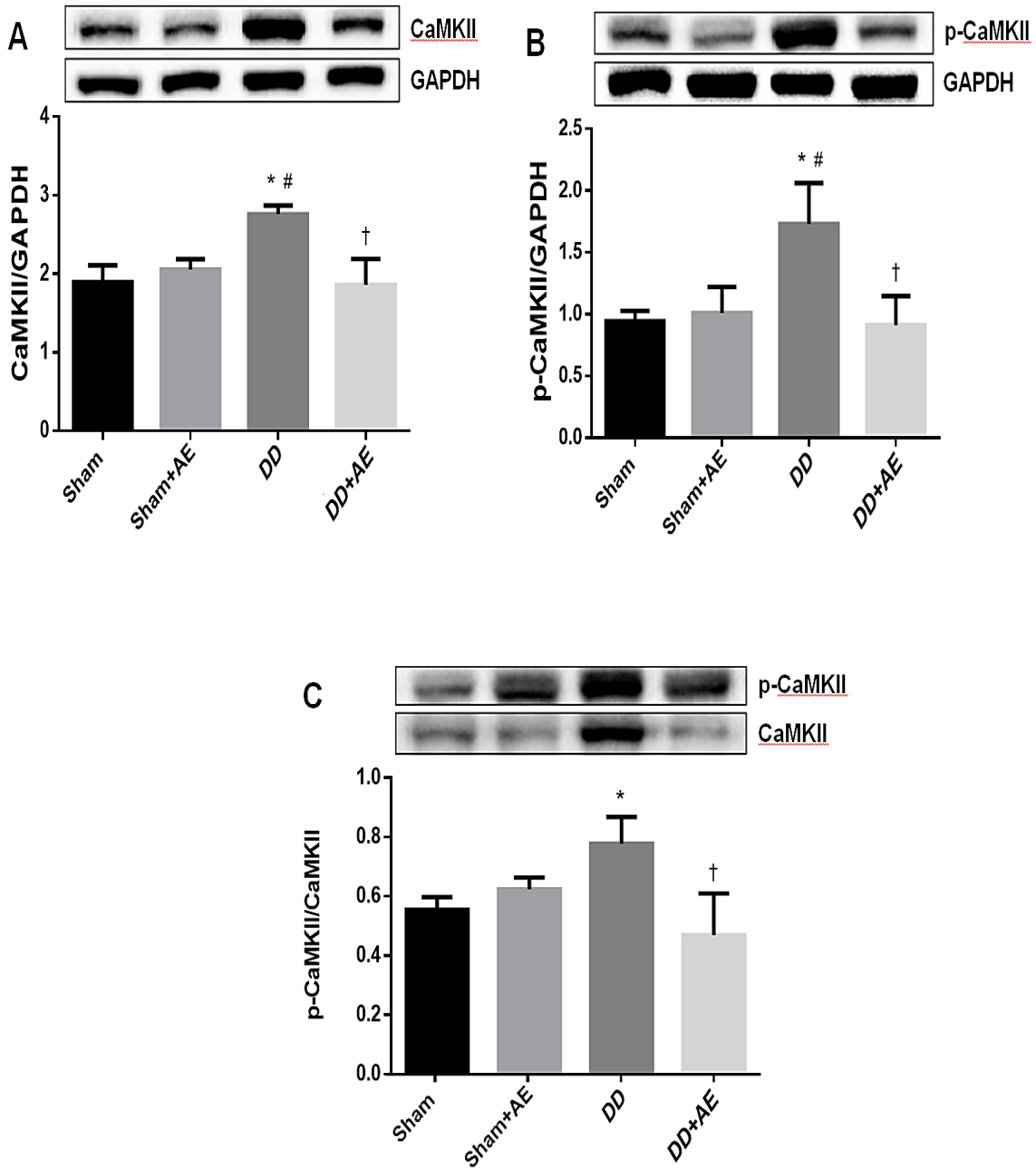




**Figura 11.** Expressão proteica das enzimas antioxidantes e oxidantes no tecido cardíaco. SOD (A), Catalase (B) e gp91-phox (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fisher. \*  $p < 0.05$  vs Sham; #  $p < 0.05$  vs Sham+AE; †  $p < 0.05$  vs DD.

#### 4.6 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO DO $\text{Ca}^{2+}$

O aumento na expressão da gp91phox após indução de disfunção diastólica foi acompanhado de alterações na expressão das proteínas envolvidas na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$ . Os animais com disfunção diastólica do VE que não realizaram o tratamento com AE apresentaram aumento na expressão da CaMKII e p-CaMKII ( $p < 0.05$  vs Sham e Sham+AE), no entanto, esse aumento foi revertido pelo tratamento no grupo DD+AE ( $p < 0.05$  vs DD), assim como normalizou a expressão dessas proteínas ( $p > 0.05$  vs Sham e Sham+AE) (Fig. 12A e 12B). Avaliada a razão p-CaMKII/CaMKII, observa-se que além da redução na atividade da p-CaMKII no grupo DD+AE ( $p < 0.05$  vs DD), houve também a normalização dessa atividade proteica ( $p > 0.05$  vs Sham e Sham+AE) (Fig. 12C).

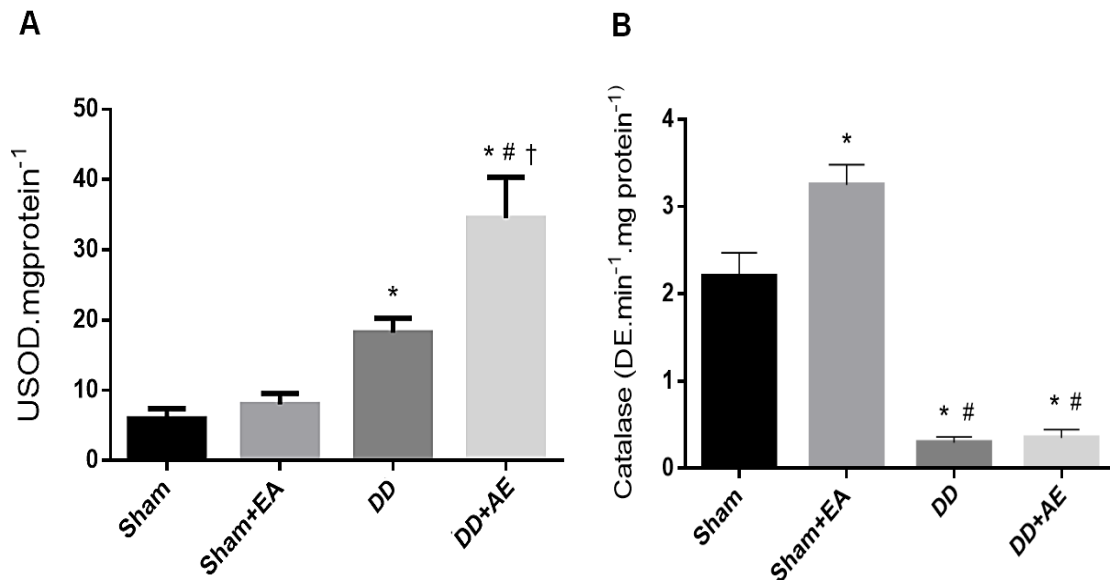


**Figura 12.** Expressão das proteínas de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  do tecido cardíaco. CaMKII (A), p-CaMKII (B) e a razão p-CaMKII/CaMKII (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fisher. \*  $p < 0.05$  vs Sham; #  $p < 0.05$  vs Sham+AE; †  $p < 0.05$  vs DD.

#### 4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

Além da expressão, foi analisado a atividade das proteínas antioxidante (Fig. 13). Foi possível observar a eficácia do tratamento com AE pelo aumento expressivo na atividade da SOD nos animais do grupo DD+AE em relação aos demais grupos,

especialmente, ao grupo DD não tratado ( $p < 0.05$  vs Sham, Sham+AE e DD) (Fig. 13A). Embora o tratamento com AE tenha sido eficaz no aumento da atividade da SOD na disfunção diastólica, o mesmo não ocorreu quando analisado a atividade da Catalase (Fig. 13B).



**Figura 13.** Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e Catalase (B) no tecido cardíaco. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fisher. \*  $p < 0.05$  vs Sham; #  $p < 0.05$  vs Sham+AE; †  $p < 0.05$  vs DD.

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo experimental objetivou analisar os efeitos do Ácido Elágico sobre a disfunção diastólica em ratas ovariectomizadas. Nossos principais achados demonstram que o uso do AE na DD foi capaz de reduzir a expressão de enzimas pró-oxidantes e aumentar antioxidantes, atenuar a disfunção diastólica do ventrículo esquerdo associado à redução da PDFVE e normalizar a expressão da p-CaMKII.

Quando analisado o peso corporal ao final do tratamento, observamos que todos os grupos aumentaram o peso, no entanto, o grupo Sham+AE apresentou menor ganho quando comparado ao grupo Sham. É válido lembrar que ambos os grupos foram ovariectomizados e, segundo estudo de Hügel e colaboradores (1999), a deficiência de estrogênio induzida pela OVX é demonstrada pelo aumento do peso corporal nos animais, correspondendo às alterações metabólicas e ganho de peso em mulheres na menopausa. Porém, o baixo ganho de peso do grupo Sham+AE pode ser explicado pelos efeitos do tratamento. Estudo *in vitro* com pré-adipócitos demonstrou que o AE, bem como seu metabólito (urolitina A), atenuaram o acúmulo de lipídios que é o resultado do equilíbrio entre eventos de lipogênese e lipólise (CISNEROS-ZEVALLOS; BANG; DELGADILLO-PUGA, 2020). Em revisão, a suplementação de AE puro ou adicionado com outros extratos pode atenuar a adiposidade e síndrome metabólica (KANG et al., 2016).

Quanto ao peso do útero, não houve diferença entre os grupos, o que comprova a eficiência da castração. A diminuição acentuada no peso uterino tem sido relatada como marcador biológico de estrogenicidade (LEMINI et al., 2015). Essa relação entre estrogênio e efeitos uterotróficos é confirmada em modelos de camundongos fêmeas nocautes para receptor de estrogênio (LUBAHN et al., 1993). Embora nosso estudo não apresente grupo Sham para comparação do peso do útero com os animais OVX, trabalhos publicados por nosso grupo de pesquisa demonstraram valores nos pesos dos úteros próximos ao apresentado neste estudo (ALMEIDA et al., 2014; CLAUDIO et al., 2017; ALMEIDA et al., 2018). Assim, os resultados do peso de útero apresentado neste estudo sugere deficiência estrogênica nos grupos submetidos ao procedimento de OVX.

Como consequência da disfunção diastólica (DD), além do coração, os pulmões também podem ser comprometidos (AURIGEMMA; GAASCH, 2004; KITZMAN; GROBAN, 2011), sendo assim, avaliamos o peso úmido dos pulmões e foi observado um aumento significativo nos animais com disfunção diastólica quando comparado aos animais dos grupos Sham e Sham+AE. Isso se deve pela função diastólica que é prejudicada, reduzindo então a capacidade de enchimento do VE e, para compensar, a pressão de enchimento do VE é elevada resultando no aumento da pressão atrial esquerda, logo, a pressão nos capilares pulmonares é aumentada causando congestão e edema pulmonar (NISHIMURA; TAJIK, 1997; GAASCH; ZILE, 2004; WARE; MATTHAY, 2005; NAGUEH, 2020).

No entanto, esse aumento no peso úmido do pulmão foi menor nos animais com disfunção diastólica tratados com AE (DD+AE), tendo como explicação a melhora da função cardíaca, principalmente, devido a inibição do aumento da PDFVE após o tratamento. Apesar disso, não foi observado diferença entre os grupos DD e DD+AE quanto ao percentual de água no pulmão. Em relação ao peso úmido do pulmão, um estudo experimental realizado por Faria e colaboradores (2011) demonstrou que as alterações de variáveis como o aumento na razão do peso do pulmão pelo peso corporal (Pulmão/PC) foi independentemente associada ao aumento da PDFVE em ratas com insuficiência cardíaca (IC). Portanto, esses achados confirmam a eficácia do tratamento quando observado a relação entre a diminuição da PDFVE e da razão Pulmão/PC nos animais com DD submetidos ao tratamento com AE.

Outro dado importante obtido neste estudo foi a mudança nos parâmetros hemodinâmicos arteriais nos diferentes grupos. Foi observado maior FC nos animais do grupo DD quando comparado aos grupos Sham e Sham+AE. Esse aumento da FC é descrito por Przyklenk et al (1986) como prejudicial ao miocárdio durante a oclusão coronária experimental, influenciando então na progressão da lesão miocárdica sob hipótese de que a FC alta aumenta o consumo de oxigênio e também compromete o tempo de enchimento ventricular podendo diminuir o fluxo sanguíneo dos vasos colaterais.

Em estudo clínico realizado por Arcari et al., (2015), mostraram que as altas FC cardíacas registradas antes da reperfusão coronariana pós IM estão associadas a uma redução na recuperação do miocárdio. Em razão disso, é importante obter o

controle da FC e em um estudo experimental que utilizou o AE como forma de pré-tratamento em ratos macho infartados por isoproterenol mostrou eficácia na redução deste parâmetro (KANNAN; QUINE, 2011). Com base nesses achados, apesar de não apresentar diferença na FC entre os animais com DD, pode-se dizer que o tratamento foi benéfico no grupo DD+AE por impedir o aumento da FC quando comparado aos grupos Sham e Sham+AE.

A disfunção endotelial refere-se a um desequilíbrio entre a liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores (MICHIELS, 2003; PEARSON, 2000). Essas alterações demonstram se intensificar em modelo experimental de menopausa devido a privação estrogênica (BRAGA et al., 2015). Diversos estudos mostraram os efeitos do AE isolado e do suco de romã, rico em AE, na melhora da disfunção endotelial e atenuação da hipertensão em animais (MOHAN; WAGHULDE; KASTURE, 2010; DING et al., 2014; BERKBAN et al., 2015). Em humanos, Aviram e colaboradores (2004) investigaram os efeitos do suco de romã em pacientes ateroscleróticos e relataram que a PAS foi capaz de reduzir após consumo do suco e sugeriram a capacidade antioxidante como um possível mecanismo. Outro estudo clínico conduzido por Asgary et al., (2014) forneceu evidências benéficas do consumo do suco de romã tanto na redução da PAS, bem como PAD em indivíduos hipertensos, sendo observado também a diminuição significativa no VCAM-1 sérico, um biomarcador de inflamação vascular.

Diante disso, observa-se uma ação protetora do AE isolado e do suco de romã na disfunção endotelial implicando em melhores respostas hemodinâmicas. No presente estudo foi observado menores pressões arteriais sistólica, diastólica e média no grupo DD+AE em comparação ao grupo DD. Adicionalmente, um estudo experimental utilizando anéis de aorta torácica de ratos demonstrou que o AE, um dos principais compostos extraídos da romã, possui efeito vasodilatador modulado parcialmente por mecanismos dependentes do endotélio e pela inibição do influxo de cálcio (YILMAZ; USTA, 2013).

Com base nos achados supracitados podemos atribuir, principalmente, a redução na PAS dos animais com DD a uma possível ação vasodilatadora do AE. Pode-se inferir essa ação, devido aos parâmetros funcionais cardíacos do grupo DD+AE, que apresentou redução da PSVE quando comparado aos grupos Sham e Sham+AE, o



que pode ser explicado pela redução da pós-carga causada pela diminuição da PAS após o tratamento com AE, ou seja, menor pressão intraventricular durante a sístole foi necessário para vencer a resistência da PA.

Por outro lado, foi observado que a PSVE permaneceu inalterada no grupo DD. A DDVE é considerada precursora da IC com fração de ejeção preservada (ICFEP) (LAM et al., 2011; KANE et al., 2011; PFEFFER; SHAH; BORLAUG, 2019), ou seja, sem o comprometimento da função sistólica ventricular. De acordo com a Fundação do Colégio Americano de Cardiologia e a Associação Americana do Coração (ACCF/AHA) (JESSUP et al., 2009), foi identificado quatro estágios envolvidos na IC iniciando pelo estágio A que refere-se a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de IC como, por exemplo, doença arterial coronariana, mas sem função do VE prejudicada. O estágio B é representado por assintomatologia de IC, mas com a função ventricular esquerda prejudicada. O estágio C envolve presença de sintomas atuais ou passados de IC associado à doença cardíaca estrutural e o estágio D é designado por IC refratária, no qual já é indicado tratamento mais específico como o suporte circulatório mecânico ou até mesmo transplante cardíaco (JESSUP et al., 2009). Portanto, a disfunção diastólica com função sistólica normal e sem sintomas de IC está incluído no estágio B. Estudos demonstram que a disfunção diastólica é comum e altamente prevalente, tende a piorar com o tempo e está associada com o avanço da idade e aumentos na mortalidade por todas as causas (REDFIELD et al., 2003; KANE et al., 2011).

A ICFEP pode estar presente após IM (XU et al., 2018) e sua incidência em mulheres é atribuída à privação estrogênica devido à menopausa (DUNLAY; ROGER; REDFIELD, 2017; TADIC et al., 2019). As diferenças de gênero estão presentes em muitas doenças, inclusive as que acometem o sistema cardiovascular (KANDER; CUI; LIU, 2017), sendo observada uma importante proteção contra as DCV em mulheres na pré-menopausa em comparação com os homens, possivelmente devido aos efeitos cardioprotetores do estrogênio (CZUBRYT et al., 2006). No entanto, essa proteção é atenuada na menopausa uma vez que é considerada um fator de risco para desenvolvimento de DCV, pois, com a depleção do nível de estrogênio há um efeito prejudicial nas funções cardiovasculares e no metabolismo (ROSANO et al., 2007).

Quanto à PDFVE, observou-se alta em ambos os grupos DD e DD+AE, o que indica presença de disfunção diastólica (ALMEIDA et al., 2014), caracterizada por anormalidades mecânicas e funcionais durante o relaxamento e o enchimento do ventrículo (FARIA et al., 2015; DESWAL, 2005). Além de ser um marcador de disfunção diastólica, a elevação da PDFVE está associada a uma maior mortalidade na doença isquêmica cardíaca, independentemente da fração de ejeção ventricular esquerda, ou seja, da função sistólica (SALEM et al., 2006; LI et al., 2009).

Estudos prévios demonstraram a associação entre o aumento na formação das EROs e disfunção diastólica do VE (ZILE; BRUTSAERT, 2002; GONZALEZ et al., 2010). A DDVE é observada em ambos os sexos, porém, apresenta maior prevalência em mulheres na pós-menopausa, indicando uma relação com a deficiência de estrogênio (OWAN et al., 2006; OKURA et al., 2009; REGITZ-ZAGROSEK et al., 2010; BORLAUG et al., 2013)

A ação do estrogênio no sistema cardiovascular inclui a ativação de receptores estrogênico em células endoteliais e miocárdicas (PARE et al., 2002; HAMADA et al., 2006; DESCHAMPS; MURPHY, 2009; BOPASSA et al., 2010), promovendo efeito antioxidante protetor (MENDELSON; KARAS, 1999) demonstrado em estudos *in vitro* por meio da inibição da peroxidação dos fosfolípidios de membrana (SUGIOKA; SHIMOSEGAWA; NAKANO, 1987) e inibição oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL), no qual pode estar relacionado à proteção contra doença arterial coronariana em mulheres (SHWAERY; VITA; KEANEY, 1997). Além disso, foi demonstrado previamente em estudo experimental, aumento dos níveis da enzima antioxidante SOD nos cardiomiócitos de animais fêmeas não ovariectomizadas em comparação com os machos, havendo uma diminuição significativa da SOD após ovariectomia (BARP et al., 2002), podendo então favorecer o aumento de EROs.

Esses estudos reforçam a ideia de que a geração de EROs no tecido cardíaco com disfunção diastólica é intensificada na ausência de estrogênio, efeito esse que também foi observado no modelo experimental de menopausa do presente estudo. Por meio da avaliação da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE), foi observado aumento na formação de  $O_2^{\cdot-}$  no VE dos animais do grupo DD quando comparado aos grupos Sham e Sham+AE. Esses resultados corroboram

aos já apresentados na literatura, que relatam a participação das EROs nas alterações estruturais, bioquímicas e eletrofisiológicas no miocárdio isquêmico (MILL et al., 2011; ALMEIDA et al., 2014).

O aumento na formação de  $O_2^{\cdot-}$  no tecido cardíaco foi acompanhado de aumento na expressão da proteína gp91phox no coração do grupo DD. A geração de EROs pode advir de diversas fontes, incluindo das NADPH oxidases (NOX) que são uma família de sete enzimas ligadas à membrana (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; LI; SHAH, 2004) que catalisam a redução de oxigênio molecular em  $O_2^{\cdot-}$  utilizando NADPH como doador de elétrons (D'ORIA et al., 2020). Dentre elas, a NOX-2 (também descrita como gp91phox) que é abundantemente expressa em cardiomiócitos, sendo a principal via formadora de  $O_2^{\cdot-}$  no coração (BYRNE et al., 2003; BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2010; VIRDIS; DURANTI; TADDEI, 2011) e está envolvida na hipertrofia dos cardiomiócitos, deposição de colágeno e sinalização intracelular de  $Ca^{2+}$  (HAFSTAD; NABEEBACCUS; SHAH, 2013).

Deste modo, reduzir a produção das EROs no tecido cardíaco é importante e benéfica para o funcionamento adequado do coração. Estudos demonstram que o AE possui atividade antioxidante enzimática por aumentar as proteínas do sistema antioxidante e, também, atividade antioxidante não enzimática com o combate na formação de EROs de forma direta (HAN; LEE; KIM, 2006; MAKENA; CHUNG, 2007; PARI; SIVASANKARI, 2008; LARROSA et al., 2010).

Além dos efeitos do AE nos parâmetros hemodinâmicos, observamos também sua ação sob a geração de EROs no VE. No presente estudo, foi demonstrado que o tratamento proposto com AE preveniu o aumento na formação de  $O_2^{\cdot-}$  *in situ* evidenciado pela fluorescência ao DHE, além disso, reduziu a expressão da gp91phox e aumentou a expressão da SOD e Catalase, sugerindo assim, que o AE apresenta importante efeito cardioprotetor por meio da redução do estresse oxidativo na disfunção diastólica.

Quando analisado a atividade enzimática, foi possível observar aumento na atividade da SOD quando comparado aos demais grupos. Embora a atividade da Catalase não tenha sido alterada, estes resultados sugerem que a via pela qual o AE promove efeitos protetores parece estar mais relacionado com a SOD, responsável pela

degradação do  $O_2^{\cdot-}$  (BORRÁS et al., 2010; CAMPOS et al., 2014). Nas lesões oxidativas que ocorrem em diversos tecidos, incluindo no coração, a primeira linha de defesa celular contra essas lesões é realizada pelas enzimas antioxidantes SOD, Catalase e GSH-Px (RODRIGO; PRIETO; CASTILLO, 2013) sendo a SOD e GSH-Px relacionadas como enzimas dominantes que atuam como sequestradoras de radicais livres impedindo a geração de EROs (NIIZUMA et al., 2010).

Além disso, durante a isquemia o metabolismo do ferro é prejudicado e liberado como ferro livre em que nestas condições pode gerar EROs através da reação de Fenton, catalisando a produção de radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) a partir de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$  (MERKOFER et al., 2006). Nessas condições, observa-se um possível potencial terapêutico do AE (composto polifenólico). A literatura demonstra que os polifenóis podem atuar como quelantes de metais, neste caso o  $Fe^{2+}$ , reduzindo diretamente a taxa de reação de Fenton, impedindo a oxidação causada por  $OH\cdot$  altamente reativo (PERRON; BRUMAGHIM, 2009). O metabolismo dos polifenóis neutraliza os radicais livres por meio de doação de um átomo de elétron ou hidrogênio, inibindo a geração desses radicais ou desativando as espécies ativas e precursoras (YOSHIDA et al., 1999).

O aumento na formação de EROs altera a sinalização de  $Ca^{2+}$  intracelular (ERICKSON et al., 2008; HAFSTAD; NABEEBACCUS; SHAH, 2013). A homeostase do  $Ca^{2+}$  envolve algumas proteínas, incluindo a CaMKII (ANDERSON; BROWN; BERS, 2011; ROKITA; ANDERSON, 2012) que regula a ciclagem intracelular de  $Ca^{2+}$  por meio da fosforilação de proteínas como o canal  $Ca^{2+}$  do tipo L (LTCC), fosfolamban (PLB) e receptor de rianodina (RyR) (MAIER; BERS, 2007).

Como relatado previamente na introdução, na fase sistólica ventricular o  $Ca^{2+}$  é liberado no citosol pelo receptor RyR, em contrapartida, na fase diastólica o  $Ca^{2+}$  é recaptado para o retículo sarcoplasmático por meio da SERCA (BAKER et al., 1998; PERIASAMY; HUKE, 2001; DUPONT et al., 2012), no entanto, sua ação permanece inibida pelo PLB até que este seja fosforilado por PKA e/ou CaMKII, reduzindo assim os efeitos inibitórios de PLB sobre a SERCA para aumentar a recaptação de  $Ca^{2+}$  (EDES; KRANIAS, 1987; DUPONT et al., 2012).

Portanto, observa-se um papel fundamental da CaMKII sobre a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e função diastólica. Contudo, em condições pró-oxidantes a atividade de CaMKII é aumentada tanto via oxidação direta da CaMKII na metionina 281/282 (ERICKSON et al., 2008) quanto por fosforilação da CaMKII devido a inativação de fosfatases pelas EROs (HOWE et al., 2004; ANDERSON, 2011), fazendo com que a CaMKII permaneça ativa mesmo na ausência do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (ERICKSON et al., 2008; ANDERSON, 2011).

A ativação sustentada da CaMKII na lesão de isquemia/reperfusão do miocárdio e IM está envolvida na patogênese da hipertrofia cardíaca (SINGH; ANDERSON, 2011; ANDERSON, 2015), inflamação (SINGH; ANDERSON, 2011; RUSCIANO et al., 2019), apoptose (ANDERSON, 2015), insuficiência cardíaca e arritmia (SWAMINATHAN et al., 2012). Por outro lado, estudos demonstraram que a inibição de CaMKII é capaz de prevenir complicações como apoptose (YANG et al., 2006) e insuficiência cardíaca (ZHANG et al., 2005).

A CaMKII apresenta também estar envolvida na disfunção diastólica (ZHANG et al., 2005; SOSSALLA et al., 2011). A ativação sustentada da CaMKII afeta  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pela fosforilação aumentada de RyR2 e PLB, induzindo alterações no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e, como consequência, gera o vazamento diastólico de  $\text{Ca}^{2+}$  o que fisiologicamente deveria ocorrer a recaptação. Essas modificações moleculares levam a disfunção diastólica e a arritmogênese (SOSSALLA et al., 2011). Em estudo com modelo experimental de hipertensão foi avaliado a relação entre a disfunção diastólica do VE e a alteração da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sendo demonstrado que a disfunção diastólica do VE precede a hipertensão além de estar associado com o aumento da concentração diastólica de cálcio  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (DUPONT et al., 2012). Portanto, observa-se a grande importância da CaMKII, sob condições fisiológicas, na regulação das proteínas responsáveis pela liberação e recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o relaxamento adequado do ventrículo.

Em revisão, Anderson (2015) discute a direta relação entre a ativação da CaMKII via aumento na formação de EROs. Em nosso estudo observamos que além do aumento de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , os animais do grupo DD apresentaram aumento na expressão da CaMKII e p-CaMKII. Entretanto, esse aumento foi prevenido nos animais do grupo DD submetidos ao tratamento com AE. Estudo experimental realizado por Li e

colaboradores (2013) demonstraram que o resveratrol, composto natural com propriedades antioxidantes, também reduz a geração de EROs e previne a ativação de CaMKII, protegendo os miócitos ventriculares contra a atividade arritmogênica induzida pelo estresse oxidativo e a sobrecarga de  $Ca^{2+}$ .

Nesse sentido, os resultados do presente estudo sugerem que a redução na formação de EROs nos animais com disfunção diastólica tratados com AE foi capaz de prevenir o aumento na expressão da CaMKII e p-CaMKII, assim como, a sua atividade, demonstrado indiretamente na análise da razão p-CaMKII/CaMKII. Resumidamente, os antioxidantes podem agir através dos mecanismos de eliminação das EROs ou seus precursores, inibição da geração de EROs, diminuição da reação de Fenton, indução da geração de antioxidantes endógenos e redução da morte celular apoptótica por regulação positiva do gene antideath Bcl-2 (VENARDOS et al., 2007).

Estudos evidenciaram que a expressão e atividade da CaMKII está aumentada em doenças cardíacas marcadas por ativação neuro-humoral, como no IM (ERICKSON et al., 2008; HE et al., 2011), sendo recentemente demonstrado também que o aumento da ativação da CaMKII por oxidação e fosforilação está envolvido na disfunção cardíaca isquêmica, sugerindo que a inibição dessa ativação pode representar um importante alvo terapêutico (LIU; WANG; YAO, 2020).

Adicionalmente, um estudo experimental demonstrou aumento da CaMKII e p-CaMKII nos corações de ratas após ovariectomia, no entanto, essas mudanças foram revertidas pela reposição de estrogênio, evidenciando então o efeito cardioprotetor do estrogênio na supressão da CaMKII (MA et al., 2009). Com base nesses achados, observamos no presente estudo que o aumento na ativação da CaMKII parece ser intensificado na disfunção diastólica em condições de privação estrogênica, o que pode ter sido um fator agravante na função diastólica, uma vez que o estrogênio é considerado cardioprotetor (CZUBRYT et al., 2006; ROSANO et al., 2007; MA et al., 2009).

Já está bem estabelecido na literatura que a disfunção diastólica está presente na progressão e gravidade da insuficiência cardíaca, por meio da ativação de diferentes vias de sinalizações, dentre elas, a via da formação de EROs e mudanças na

expressão/atividade das proteínas envolvidas na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  (MAACK; BÖHM, 2011; MÜNDEL et al., 2015; JEONG; DUDLEY JR, 2015). Nesse sentido, estudos experimentais demonstraram essa relação entre a disfunção diastólica do VE e o estresse oxidativo (ZHANG et al., 2010; SILBERMAN et al., 2010; MA et al., 2012; JEONG et al., 2016), corroborando então com estudos clínicos (SZELENYI et al., 2015; RAAD et al., 2020).

Analisando nossos resultados, observou-se que a redução de EROs foi acompanhada pela redução na expressão/atividade da CaMKII e p-CaMKII, assim como, redução da PDFVE, o que sugere melhora na via do estresse oxidativo com atenuação da disfunção diastólica do VE nos animais submetidos ao tratamento com AE (DD+AE). Além do mais, o AE foi capaz de normalizar os parâmetros biomoleculares (formação de  $\text{O}_2^-$ , expressão de SOD, gp91phox e p-CaMKII) do grupo DD+AE comparado ao grupo Sham. Portanto, esses resultados corroboram aos estudos *in vitro* (COZZI et al., 1995; FESTA et al., 2001; KILIC; YEŞILOĞLU; BAYRAK, 2014; PAVLOVA; ZOGRAFOV; SIMEONOVA, 2016) e *in vivo* (PARI; SIVASANKARI, 2008, KANNAN; QUINE; SANGEETHA, 2012; LIN; YIN, 2013; AYHANCI et al., 2016) que confirmam o efeito protetor do AE na supressão do estresse oxidativo.

Deste modo, observamos que o aumento na formação de EROs e, conseqüentemente, aumento na expressão e atividade da CaMKII, avaliados nesse estudo, apresentam-se como mecanismos envolvidos na disfunção diastólica com tendência a se agravar na condição de privação estrogênica. Contudo, observa-se que quatro semanas de tratamento com AE pode atenuar o agravamento da função diastólica em ratas ovariectomizadas.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento com AE durante quatro semanas foi capaz de prevenir a formação de EROs no tecido cardíaco pela redução de  $O_2^{\cdot-}$ , além de reduzir a expressão/atividade da proteína CaMKII que está diretamente relacionada com a alteração da homeostase e liberação de  $Ca^{2+}$  diastólico, o que por fim resultou na atenuação da disfunção diastólica em ratas ovariectomizadas. Além disso, os possíveis mecanismos envolvidos nessa atenuação parecem estar relacionados com a redução na expressão da enzima pró-oxidante gp91phox e aumento na expressão e atividade da enzima antioxidante SOD.

Estudos experimentais demonstram que há redução da SOD e aumento da expressão/atividade da CaMKII após ovariectomia, o que pode ter sido um fator agravante na disfunção diastólica dos animais do presente estudo, uma vez que o estrogênio é considerado cardioprotetor. No entanto, observou-se que após o tratamento os parâmetros biomoleculares de SOD e p-CaMKII foram normalizados, o que torna o AE ser uma opção terapêutica natural promissora para melhor prognóstico de disfunção diastólica em mulheres acometidas no período da menopausa.



## REFERÊNCIAS

ABHAYARATNA, W.P., et al. Characteristics of left ventricular diastolic dysfunction in the community: an echocardiographic survey. **Heart**. v. 92, n. 9, p. 1259-1264, 2006.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. v. 105, p. 121-126, 1984.

ALMEIDA, S.A., et al. Estrogen Therapy Worsens Cardiac Function and Remodeling and Reverses the Effects of Exercise Training After Myocardial Infarction in Ovariectomized Female Rats. **Front Physiol**. v. 9:1242, 2018.

ALMEIDA, S.A., et al. Exercise Training Reduces Cardiac Dysfunction and Remodeling in Ovariectomized Rats Submitted to Myocardial Infarction. **PLoS One**. v. 9, n. 12: e115970, 2014.

ALSHEIKH-ALI, A.A., KUVIN, J.T., KARAS, R.H. Risk of adverse events with fibrates. **Am J Cardiol**. v. 94, n. 7, p 935-938, 2004.

AMAKURA, Y., et al. Determination of ellagic acid in fresh and processed fruits by HPLC. **J Food Hyg Soc Jpn**. v. 41, n. 3, p. 206-211, 2000.

ANDERSON, M.E. CaMKII and a failing strategy for growth in heart. **J Clin Invest**. v. 119, n. 5, p. 1082-1085, 2009.

ANDERSON, M.E. Oxidant stress promotes disease by activating CaMKII. **J Mol Cell Cardiol**. v. 89, p. 160-167, 2015.

ANDERSON, M.E. Pathways for CaMKII activation in disease. **Heart Rhythm**. v. 8, n. 9, p. 1501-1503, 2011.

ANDERSON, M.E., BROWN, J.H., BERS, D.M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. **J Mol Cell Cardiol**. v. 51, n. 4, p. 468-473, 2011.

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**.v. 55, p. 373-399, 2004.

ARCARI, L., et al. Impact of Heart Rate on Myocardial Salvage in Timely Reperfused Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: New Insights from Cardiovascular Magnetic Resonance. **PLoS One**. v. 10, n. 12, e0145495, 2015.

ASCACIO-VALDÉS, J.A., et al. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. **Journal of Medical Plants Research**. v. 5, n. 19, p. 4696-4703, 2011.

ASGARY, S., et al. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endothelial function improving, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. **Phytother Res.** v. 28, n. 2, p, 193-199, 2014.

AURIGEMMA, G.P., GAASCH, W.H. Clinical practice. Diastolic heart failure. **N Engl J Med.** v. 351, n. 11, p. 1097-1105, 2004.

AVIRAM, M., et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. **Clin Nutr.** v. 23, n. 3, p. 423-433, 2004.

AYHANCI, A., et al. Protective effects of ellagic acid in D-galactosamine-induced kidney damage in rats. **Cytotechnology.** v. 68, n. 5, p. 1763-1770, 2016.

BACKS, J., et al. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 106, n. 7, p. 2342-2347, 2009.

BAKER, D.L., et al. Targeted Overexpression of the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Increases Cardiac Contractility in Transgenic Mouse Hearts. *Circulation Research.* v. 83, n. 12, p. 1205-1214, 1998.

BALDO, M.P., et al. Acute arrhythmogenesis after myocardial infarction in normotensive rats: influence of high salt intake. **Food Chem Toxicol.** v. 50, n. 3-4, p. 473-477, 2012.

BARP, J., et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Braz J Med Biol Res.** v. 35, n. 9, p. 1075-1081, 2002.

BASHAR, S.M., SAMIR EL-SHERBEINY, S.M., BORAIE, M.Z. Correlation between the blood level of irisin and the severity of acute myocardial infarction in exercise-trained rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.** v. 30, n. 1, p. 59-71, 2018.

BERKBAN, T., et al. Ellagic Acid Prevents L-NAME-Induced Hypertension via Restoration of eNOS and p47phox Expression in Rats. **Nutrients.** v. 7, n. 7, p. 5265-5280, 2015.

BIRBEN, E., et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J.** v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BOPASSA, J.C., et al. A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 298, n. 1, H16-23, 2010.

BORLAUG, B.A., et al. Longitudinal changes in left ventricular stiffness: a community-based study. **Circ Heart Fail.** v. 6, n. 5, p. 944-952, 2013.

BORRÁS, C., et al. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. **Biochim Biophys Acta**. v. 1802, n. 1, p. 205-211, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, V.A., et al. Aerobic Exercise Training Prevents the Onset of Endothelial Dysfunction via Increased Nitric Oxide Bioavailability and Reduced Reactive Oxygen Species in an Experimental Model of Menopause. **PLoS One**. v. 10, n. 4, e0125388, 2015.

BRAND, J.S., et al. Age at menopause, reproductive life span, and type 2 diabetes risk: results from the EPIC-InterAct study. **Diabetes Care**. v. 36, n. 4, p. 1012-1019, 2013.

BRANDES, R.P., WEISSMANN, N., SCHRÖDER, K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. **Free Radic Biol Med**. v. 49, n. 5, p. 687-706, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil 2011-2022. Brasília; 2011. Disponível em: <[http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/vigilancia\\_epidemiologica/doencas\\_não\\_transmissiveis](http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/vigilancia_epidemiologica/doencas_não_transmissiveis)>. Acesso em: 15 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Panorama da vigilância de doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2018. Brasília (DF); v. 50, n. 40, p. 1-9, dez. 2019.

BYRNE, J.A., et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Circ Res**. v. 93, n. 9, p. 802-805, 2003.

CAMPOS, C., et al. Efficacy of a low dose of estrogen on antioxidant defenses and heart rate variability. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2014, p. 1-7, 2014.

CHAPPELL, M.C., et al. Estrogen or the AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2. Lewis rat. **Hypertension**. v. 42, n. 4, p. 781-186, 2003.

CHEN, C.H., et al. Coupled systolic-ventricular and vascular stiffening with age: implications for pressure regulation and cardiac reserve in the elderly. **J Am Coll Cardiol**. v. 32, n. 5, p. 1221-1227, 1998.

CISNEROS-ZEVALLOS, L., BANG, W.Y., DELGADILLO-PUGA, C. Ellagic Acid and Urolithins A and B Differentially Regulate Fat Accumulation and Inflammation in 3T3-

L1 Adipocytes While Not Affecting Adipogenesis and Insulin Sensitivity. **Int J Mol Sci.** v. 21, n. 6, 2020.

CLAUDIO, E.R., et al. Swimming training prevents coronary endothelial dysfunction in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res.** v. 50, n. 1, e5495, 2017.

CORREA de Sa, D.D., et al. Progression of preclinical diastolic dysfunction to the development of symptoms. **Heart.** v. 96, n. 7, p. 528-532, 2010.

COZZI, R., et al. Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. **Environ Mol Mutagen.** v. 26, n. 3, p. 248-254, 1995.

CZUBRYT, M.P., et al. The role of sex in cardiac function and disease. **Can J Physiol Pharm.** v. 84, n. 1, p. 93-109, 2006.

de las FUENTES L., et al. Metabolic syndrome is associated with abnormal left ventricular diastolic function independent of left ventricular mass. **Eur Heart J.** v. 28, n. 5, p. 553-559, 2007.

de Oliveira, S.G., et al. Exercise training improves vascular reactivity in ovariectomized rats subjected to myocardial infarction. **Plos one.** v. 14, n. 4: e0215568, 2019.

DESCHAMPS, A.M., MURPHY, E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 297, n. 5, H1806-1813, 2009.

DESWAL, A. Diastolic dysfunction and diastolic heart failure: mechanisms and epidemiology. **Curr Cardiol Rep.** v. 7, n. 3, p. 178-183, 2005.

DING, Y., et al. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: role of Nrf2 activation. **Int J Cardiol.** v. 175, n. 3, p. 508-514, 2014.

D'ORIO, R., et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. **Oxid Med Cell Longev.** v. 2020: 5732956, 2020.

dos SANTOS, R.L., da SILVA, F.B., RIBEIRO, R.F. Jr., STEFANON, I. Sex hormones in the cardiovascular system. **Horm Mol Biol Clin Investig.** v. 18, n. 2, p. 89-103, 2014.

DOUGAN, R.S., CHEKMAN. I.S. Structural and functional changes myocardium hypertensive rats in applying indapamide and ellagic acid. **Lik Sprava.** v. 3, p. 145-150, 2015.

DUNLAY, S.M., ROGER, V.L., REDFIELD, M.M. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nat Rev Cardiol.** v. 14, n. 10, p. 591-602, 2017.

DUPONT, S., et al. The onset of left ventricular diastolic dysfunction in SHR rats is not related to hypertrophy or hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 302, n. 7, H1524-1532, 2012.

DUPUY, C., et al. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. **J Biol Chem.** v. 266, n. 6, p. 3739-3743, 1991.

EBERHARDT, V.M.S. Health, United States, 2001. **National Center for Health Statistics.** p. 189-192, 2001.

EDES, I., KRANIAS, E.G. Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum function by phospholamban. **Membr Biochem.** v. 7, n. 3, p. 175-192, 1987.

EDMAN, C.F., SCHULMAN, H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase isoforms. **Biochim Biophys Acta.** v. 1221, n. 1, p. 89-101, 1994.

EL KHOUDARY, S.R. Gaps, limitations and new insights on endogenous estrogen and follicle stimulating hormone as related to risk of cardiovascular disease in women traversing the menopause: a narrative review. **Maturitas.** v. 104, p. 44-53, 2017.

ERICKSON, J.R. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. **Front Pharmacol.** v. 5, article 59, 2014.

ERICKSON, J.R., et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. **Cell.** v. 133, n. 3, p. 462-474, 2008.

EVANS, P., HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **Br J Nutr.** v. 85, Suppl 2, S67-S74, 2001.

FARIA, A.P.C., et al. Effects of PDE type 5 inhibitors on Left Ventricular Diastolic Dysfunction in Resistant Hypertension. **Arq Bras Cardiol.** v. 104, n. 1, p. 85-89, 2015.

FARIA, T.O., et al. Body Weight Loss After Myocardial Infarction in Rats as a Marker of Early Heart Failure Development. **Arch Med Res.** v. 42, n. 4, p. 274-280, 2011.

FESTA, F., et al. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells in vitro revealed by the comet assay. **Anticancer Res.** v. 21, n. 6A, p. 3903-3908, 2001.

FOROUZANFAR, M.H., et al. Assessing the global burden of ischemic heart disease, part 2: analytic methods and estimates of the global epidemiology of ischemic heart disease in 2010. **Glob Heart.** v. 7, n. 4, p. 331-342, 2012.

GAASCH, W.H., ZILE, M.R. Left ventricular diastolic dysfunction and diastolic heart failure. **Annu Rev Med.** v. 55, p. 373-394, 2004.

GAERTNER, T.R., et al. Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of alpha, beta, gamma and delta isoforms of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II. **J Biol Chem.** v. 279, n. 13, p. 12484-12494, 2004.

GALLAGHER, J.C., et al. Effect of early menopause on bone mineral density and fractures. **Menopause.** v. 14 (3 Pt 2), p. 567-571, 2007.

GARCIA-NINO, W.R., ZAZUETA, C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacol Res.** v. 97, p. 84-103, 2015.

GONZALEZ, D.R., et al. Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure. **Journal of Biological Chemistry.** v. 285, p. 28938-28945, 2010.

GORDISH, K.L., BEIERWALTES, W.H. Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 306, n. 5, F542-550, 2014.

GRIENGLING, K.K., SORESCU, D., USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res.** v. 86, n. 5, p. 494-501, 2000.

GRIMM, M., et al. CaMKII $\delta$  mediates beta-adrenergic effects on RyR2 phosphorylation and SR Ca<sup>2+</sup> leak and the pathophysiological response to chronic beta-adrenergic stimulation. **J Mol Cell Cardiol.** v. 85, p. 282-291, 2015.

GROHÉ, C., et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. **FEBS Lett.** v. 416, n. 1, p. 107-112, 1997.

HAFSTAD, A.D., NABEEBACCUS, A.A., SHAH, A.M. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. **Basic Res Cardiol.** v. 108, n. 4, 2013.

HALE, G.E., ROBERTSON, D.M., BURGER, H.G. The perimenopausal woman: endocrinology and management. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 142, p. 121-131, 2014.

HALL, J.E. Endocrinology of the Menopause. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 44, n. 3, p. 485-496, 2015.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

- HAMADA, H., et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. **Circulation**. v. 114, n. 21, p. 2261-2270, 2006.
- HAN, D.H., LEE, M.J., KIM, J.H. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. **Anticancer Res**. v. 26, n. 5A, p. 3601-3606, 2006.
- HARLOW, S.D., et al. Executive Summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: Addressing the Unfinished Agenda of Staging Reproductive Aging. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 97, n. 4, p. 1159-1168, 2012.
- HE, B.J., et al. Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone. **Nat Med**. v. 17, n. 12, p. 1610-1618, 2011.
- HERNÁNDEZ, I., et al. 17 $\beta$ -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 279, n. 5, p. R1599-R1605, 2000.
- HILL, M.F., SINGAL, P.K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **Am J Pathol**. v. 148, n. 1, p. 291-300, 1996.
- HIROTA, Y. A clinical study of left ventricular relaxation. **Circulation**. v. 62, n. 4, p. 756-763, 1980.
- HOGG, K., SWEDBERG, K., MCMURRAY, J. Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. **J Am Coll Cardiol**. v. 43, n. 3, p. 317-327, 2004.
- HOWARD, B.V., et al. Risk of cardiovascular disease by hysterectomy status, with and without oophorectomy: The women's health initiative observational study. **Circulation**. v. 111, p. 1462-1470, 2005.
- HOWE, C.J., et al. Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. **J Biol Chem**. v. 279, n. 43, p. 44573-44581, 2004.
- HUDMON, A., SCHULMAN, H. Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. **Annu Rev Biochem**. v. 71, p. 473-510, 2002.
- HUDMON, A., SCHULMAN, H. Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. **Biochem J**. v. 364, n. Pt 3, p. 593-611, 2002.
- HÜGEL, S., et al. Evidence against a role of physiological concentrations of estrogen in post-myocardial infarction remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 34, n. 5, p. 1427-1434, 1999.

INGELSSON, E., et al. Hysterectomy and risk of cardiovascular disease: A population-based cohort study. **Eur Heart J**. v. 32, p. 745-750, 2011.

IORGA, A., et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biol Sex Differ**. v. 8, n. 1: 33, 2017.

JEANES, H.L., et al. Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER)alpha agonist and unaffected by an ER beta antagonist. **J Endocrinol**. v. 197, n. 3, p. 493-501, 2008.

JEONG, E.M., DUDLEY, S.C. Jr. Diastolic dysfunction: Potential New Diagnostics and Therapies. **Circ J**. v. 79, n. 3, p. 470-477, 2015.

JEONG, E.M., et al. Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic Dysfunction. **J Am Heart Assoc**. v. 5, n. 5: e003046, 2016.

JESSUP, M., et al. 2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. **Circulation**. v. 119, n. 14, p. 1977-2016, 2009.

JOHAR, S., et al. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. **FASEB J**. v. 20, n. 9, p. 1546-1548, 2006.

JURÁNEK, I., BEZEK, S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury?. **Gen Physiol Biophys**. v. 24, n. 3, p. 263-278, 2005.

KANDER, M.C., CUI, Y., LIU, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. **J Cell Mol Med**. v. 21, n. 5, p. 1024-1032, 2017.

KANE, G.C., et al. Progression of left ventricular diastolic dysfunction and risk of heart failure. **JAMA**. v. 306, n. 8, p. 856-863, 2011.

KANG, I., et al. Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. **Adv Nutr**. v. 7, n. 5, p. 961-272, 2016.

KANNAN, M.M., QUINE, S.D. Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced oxidative stress: Evidence from electrocardiological, biochemical and histological study. **Eur J Pharmacol**. v. 659, n. 1, p. 45-52, 2011.



- KANNAN, M.M., QUINE, S.D., SANGEETHA, T. Protective efficacy of ellagic acid on glycoproteins, hematological parameters, biochemical changes, and electrolytes in myocardial infarcted rats. **J Biochem Mol Toxicol**. v. 26, n. 7, p. 270-275, 2012.
- KASS, D.A., BRONZWAER, J.G., PAULUS, W.J. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure?. **Circ Res**. v. 94, n. 12, p. 1533-1542, 2004.
- KILIC, I., YEŞİLOĞLU, Y., BAYRAK, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**. v. 130, p. 447-452, 2014.
- KITZMAN, D.W., GROBAN, L. Exercise intolerance. **Cardiol Clin**. v. 29, n. 3, p. 461-477, 2011.
- KITZMAN, D.W., LITTLE, W.C. Left ventricle diastolic dysfunction and prognosis. **Circulation**. v. 125, n. 6, p. 743-745, 2012.
- KREUSSER, M.M., et al. Cardiac CaM Kinase II genes delta and gamma contribute to adverse remodeling but redundantly inhibit calcineurin-induced myocardial hypertrophy. **Circulation**. v. 130, n. 15, p. 1262-1273, 2014.
- KUNSCH, C., MEDFORD, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ Res**. v. 85, n. 8, p. 753-766, 1999.
- LAM, C.S., et al. Cardiac dysfunction and noncardiac dysfunction as precursors of heart failure with reduced and preserved ejection fraction in the community. **Circulation**. v. 124, n. 1, p. 24-30, 2011. Erratum in: **Circulation**. v. 124, n. 17: e458, 2011.
- LARROSA, M., et al. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. **Mol Aspects Med**. v. 31, n. 6, p. 513-539, 2010.
- LEMINI, C., et al. Ovariectomy differential influence on some hemostatic markers of mice and rats. **Exp Anim**. v. 64, n. 1, p. 81-89, 2015.
- LI, J.M., SHAH, A.M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 287, n. 5, R1014-1030, 2004.
- LI, W., et al. Resveratrol protects rabbit ventricular myocytes against oxidative stress-induced arrhythmogenic activity and Ca<sup>2+</sup> overload. **Acta Pharmacol Sin**. v. 34, n. 9, p. 1164-1173, 2013.
- LI, Y.Y., et al. Predictors of inpatient outcomes in hospitalized patients after left heart catheterization. **Am J Cardiol**. v. 103, p. 486-490, 2009.

LIN, M.C., YIN, M.C. Preventive effects of ellagic acid against doxorubicin-induced cardio-toxicity in mice. **Cardiovasc Toxicol.** v. 13, n. 3, p. 185-193, 2013.

LIU, T., WANG, Q., YAO, K. Huoxue Wentong Formula ameliorates myocardial infarction in rats through inhibiting CaMKII oxidation and phosphorylation. **Chin Med.** v. 15, n. 3, 2020.

LOU, L.L., LLOYD, S.J., SCHULMAN, H. Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 83, n. 24, p. 9497-9501, 1986.

LUBAHN, D.B., et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 90, p. 11162-11166, 1993.

LUO, M., et al. Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. **J Clin Invest.** v. 123, n. 3, p. 1262-1274, 2013. Erratum in: *J Clin Invest.* v. 123, n. 5: 2333, 2013.

MA, L., et al. Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the transgenic (mRen2) rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 302, n. 11, H2341-2351, 2012.

MA, Y., et al. Oestrogen confers cardioprotection by suppressing Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. **Br J Pharmacol.** v. 157, n. 5, p. 705-715, 2009.

MAACK, C., BÖHM, M. Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner. **J Am Coll Cardiol.** v. 58, n. 1, p. 83-86, 2011.

MAIER, L.S., BERS, D.M. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. **Cardiovasc Res.** v. 73, n. 4, p. 631-640, 2007.

MAKENA, P.S., CHUNG, K.T. Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity. **Food Chem Toxicol.** v. 45, n. 10, p. 1899-1909, 2007.

MANACH, C., et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARJORIBANKS, J., et al. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 1, n. 1:CD004143, 2017.

MASLOV, P.Z., et al. Is Cardiac Diastolic Dysfunction a Part of Post-Menopausal Syndrome?. **JACC Heart Fail.** v. 7, n. 3, p. 192-203, 2019.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J Med.** v. 108, n. 8, p. 652-659, 2000.

MENDELSON, M.E., KARAS, R.H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **N Engl J Med.** v. 340, n. 23, p. 1801-1811, 1999.

MERKOFER, M., et al. Fenton chemistry and iron chelation under physiologically relevant conditions: Electrochemistry and kinetics. **Chem Res Toxicol.** v. 19, n. 10, p. 1263-1269, 2006.

MEYER, T., et al. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. **Science.** v. 256, n. 5060, p. 1199-202, 1992.

MICHIELS, C. Endothelial cell functions. **J Cell Physiol.** v. 196, n. 3, p. 430-443, 2003.

MILL, J.G., et al. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. **Braz J Med Biol Res.** v. 44, n. 9, p. 890-898, 2011.

MILLER, S.G., KENNEDY, M.B. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. **J Biol Chem.** v. 260, n. 15, p. 9039-9046, 1985.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem.** v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MOHAN, M., WAGHULDE, H., KASTURE, S. Effect of pomegranate juice on Angiotensin II-induced hypertension in diabetic Wistar rats. **Phytother Res.** v. 24, Suppl 2, S196-203, 2010.

MORI, T., et al. Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats: a possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women. **Hypertens Res.** v. 34, n. 4, p. 496-502, 2011.

MORIS, D., et al. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. **Ann Transl Med.** v. 5, n. 16, 2017.

MÜNZEL, T., et al. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. **European Heart Journal.** v. 36, n. 38, p. 2555-2564, 2015.

NAGUEH, S.F. Left Ventricular Diastolic Function: Understanding Pathophysiology, Diagnosis, and Prognosis With Echocardiography. **JACC Cardiovasc Imaging.** v. 13, n. 1 (Pt 2), p. 228-244, 2020.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.

NELSON, M.D., et al. Diastolic dysfunction in women with signs and symptoms of ischemia in the absence of obstructive coronary artery disease: a hypothesis-generating study. **Circ Cardiovasc Imaging**. v. 7, n. 3, p. 510-516, 2014.

NIIZUMA, K., et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. **Biochim Biophys Acta**. v. 1802, n. 1, p. 92-99, 2010.

NISHIMURA, R.A., TAJIK, A.J. Evaluation of diastolic filling of left ventricle in health and disease: Doppler echocardiography is the clinician's Rosetta Stone. **J Am Coll Cardiol**. v. 30, n. 1, p. 8-18, 1997.

OKURA, H., et al. Age- and gender-specific changes in the left ventricular relaxation: a Doppler echocardiographic study in healthy individuals. **Circ Cardiovasc Imaging**. v. 2, n. 1, p. 41-46, 2009.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Doenças cardiovasculares. Brasília (DF); 2017. Available from:  
[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096).

OWAN, T.E., et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. **N Engl J Med**. v. 355, n. 3, p. 251-259, 2006.

PARAVICINI, T.M., TOUYZ, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**. v. 31, Suppl 2, S170-S180, 2008.

PARE, G., et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. **Circ Res**. v. 90, n. 10, p. 1087-1092, 2002.

PARI, L., SIVASANKARI, R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. **Fundam Clin Pharmacol**. v. 22, n. 4, p. 395-401, 2008.

PAVLOVA, E.L., ZOGRAFOV, N.N., SIMEONOVA, L.S. Comparative study on the antioxidant capacities of synthetic influenza inhibitors and ellagic acid in model systems. **Biomed Pharmacother**. v. 83, p. 755-762, 2016.

PEARSON, J.D. Normal endothelial cell function. **Lupus**. v. 9, n. 3, p. 183-188, 2000.

PERIASAMY, M., HUKU, S. SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+)homeostasis and cardiac contractility. **J Mol Cell Cardiol**. v. 33, n. 6, p. 1053-1063, 2001.

PERRON, N.R., BRUMAGHIM, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochem Biophys**. v. 53, n. 2, p. 75-100, 2009.

PFEFFER, M.A., SHAH, A.M., BORLAUG, B.A. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. **Circ Res**. v. 124, n. 11, p. 1598-1617, 2019.

PHAN, Q.T., et al. Neutrophils use superoxide to control bacterial infection at a distance. **PLoS Pathog**. v. 14, n. 7, e1007157, 2018.

PIRO, M., et al. Sex-related differences in myocardial remodeling. **J Am Coll Cardiol**. v. 55, n. 11, p. 1057-1065, 2010.

PITKIN, J. Alternative and complementary therapies for menopause. **Menopause Int**. v. 18, n. 1, p. 20-27, 2012.

PIZZINO, G., et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxid Med Cell Longev**. 2017:8416763, 2017.

PRZYKLENK, K., et al. Salvage of ischaemic myocardium by reperfusion: importance of collateral blood flow and myocardial oxygen demand during occlusion. **Cardiovasc Res**. v. 20, n. 6, p. 403-414, 1986.

RAAD, M., et al. Oxidative Stress Is Associated With Diastolic Dysfunction in Women With Ischemia With No Obstructive Coronary Artery Disease. **J Am Heart Assoc**. v. 9, n. 10: e015602, 2020.

REDFIELD, M.M., et al. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. **JAMA**. v. 289, n. 2, p. 194-202, 2003.

REGITZ-ZAGROSEK, V., et al. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. **Circ J**. v. 74, n. 7, p. 1265-1273, 2010.

RODRIGO, R., PRIETO, J.C., CASTILLO, R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. **Clin Sci (Lond)**. v. 124, n. 1, p. 1-15, 2013.

ROGER, V.L., et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics – 2012 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**. v. 125, p. 188-197, 2012.

ROKITA, A.G., ANDERSON, M.E. New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). **Circulation**. v. 126, n. 17, p. 2125-2139, 2012.

ROSANO, G.M.C., et al. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. **Climacteric**. v. 10, p. 19-24, 2007.

ROSENBERG, O.S., et al. Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. **Cell**. v. 123, n. 5, p. 849-860, 2005.

ROTH, G.A., et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **J Am Coll Cardiol**. v. 70, n. 1, p. 1-25, 2017.

RUSCIANO, M.R., et al. CaMKII Activity in the Inflammatory Response of Cardiac Diseases. **Int J Mol Sci**. v. 20, n. 18: 4374, 2019.

SAITOH, T., SCHWARTZ, J.H. Phosphorylation-dependent subcellular translocation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase produces an autonomous enzyme in Aplysia neurons. **J Cell Biol**. v. 100, n. 3, p. 835-842, 1985.

SALEM, R., et al. Left ventricular end-diastolic pressure is a predictor of mortality in cardiac surgery independently of left ventricular ejection fraction. **Br J Anaesth**. v. 97, n. 3, p. 292-297, 2006.

SANDERS, D., DUDLEY, M., GROBAN, L. Diastolic dysfunction, cardiovascular aging, and the anesthesiologist. **Anesthesiol Clin**. v. 27, n. 3, p. 497-517, 2009.

SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. Cardiômetro: mortes por doenças cardiovasculares no Brasil. Rio de Janeiro; 2020. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>>. Acesso em: 22 mar. 2020.

SENONER, T., DICHTL, W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target?. **Nutrients**. v. 11, n. 9: 2090, 2019.

SHIFREN, J.L., GASS, M.L.S. The North American Menopause Society Recommendations for Clinical Care of Midlife Women. **Menopause**. v. 21, n. 10, p. 1038-1062, 2014.

SHUFELT, C., et al. Carotid artery distensibility and hormone therapy and menopause: the Los Angeles Atherosclerosis Study. **Menopause**. v. 23, n. 2, p. 150-157, 2016.

SHUSTER, L.T., et al. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. **Maturitas**. v. 65, n. 2, p. 161-166, 2010.

SHWAERY, G.T., VITA, J.A., KEANEY, J.F. Jr. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. **Circulation**. v. 95, n. 6, p. 1378-1385, 1997.

SILBERMAN, G.A., et al. Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. **Circulation**. v. 121, n. 4, p. 519-528, 2010.

SINGH, M.V., ANDERSON, M.E. Is CaMKII a link between inflammation and hypertrophy in heart? **J Mol Med (Berl)**. v. 89, n. 6, p. 537-543, 2011.

SINGH, M.V., et al. MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CaMKII oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**. v. 52, n. 5, p. 1135-1144, 2012.

SKAVDAHL, M., et al. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 288, n. 2, H469-476, 2005.

SOSSALLA, S., et al. Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII $\delta$ (C) can be reversed by inhibition of late Na(+) current. **Basic Res Cardiol**. v. 106, n. 2, p. 263-272, 2011.

STEINBERG, S.F. Oxidative stress and sarcomeric proteins. **Circ Res**. v. 112, n. 2, p. 393-405, 2013.

STREHLOW, K., et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circ Res**. v. 93, n. 2, p. 170-177, 2003.

STUENKEL, C.A., et al. Treatment of Symptoms of the Menopause: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 100, n. 11, p. 3975-4011, 2015.

SUGIOKA, K., SHIMOSEGAWA, Y., NAKANO, M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. **FEBS Lett**. v. 210, n. 1, p. 37-39, 1987.

SWAMINATHAN, P.D., et al. Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. **Circ Res**. v. 110, n. 12, p. 1661-1677, 2012.

SZELÉNYI, Z., et al. Inflammation and oxidative stress caused by nitric oxide synthase uncoupling might lead to left ventricular diastolic and systolic dysfunction in patients with hypertension. **J Geriatr Cardiol**. v. 12, n. 1, p. 1-10, 2015.

TADIC, M., et al. Sex and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: From Pathophysiology to Clinical Studies. **J Clin Med**. v. 8, n. 6: 792, 2019.

TALCOTT, S.T., LEE, J.H. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. **J Agric Food Chem**. v. 50, p. 3186-3192, 2002.

TOBIMATSU, T., FUJISAWA, H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. **J Biol Chem**. v. 264, n. 30, p. 17907-17912, 1989.

TRABUCO, E.C., et al. Association of Ovary-Sparing Hysterectomy With Ovarian Reserve. **Obstet Gynecol**. v. 127, n. 5, p. 819-827, 2016.

- TSUTSUI, H., KINUGAWA, S., MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 301, n. 6, H2181-2190, 2011.
- TÜRK, G., et al. Improvement of Cisplatin-Induced Injuries to Sperm Quality, the Oxidant-Antioxidant System, and the Histologic Structure of the Rat Testis by Ellagic Acid. **Fertil Steril**. v. 89 (5 Suppl), p. 1474-1481, 2008.
- VENARDOS, K.M., et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. **Curr Med Chem**. v. 14, n. 14, p. 1539-1549, 2007.
- VIRDIS, A., DURANTI, E., TADDEI, S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. **Int J Hypertens**. v. 2011: 916310, 2011.
- VOGEL, M.W., et al. The natural history of preclinical diastolic dysfunction: a population-based study. **Circ Heart Fail**. v. 5, n. 2, p. 144-151, 2012.
- WAGNER, S., et al. Redox regulation of sodium and calcium handling. **Antioxid Redox Signal**. v. 18, n. 9, p. 1063-1077, 2013.
- WALTERS, J.W., et al. Mitochondrial redox status as a target for cardiovascular disease. **Curr Opin Pharmacol**. v. 27, p. 50-55, 2016.
- WANG, H., et al. Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodelling in oophorectomized mRen2.Lewis rats. **Cardiovasc Res**. v. 94, n. 1, p. 96-104, 2012.
- WARE, L.B., MATTHAY, M.A. Clinical practice. Acute pulmonary edema. **N Engl J Med**. v. 353, n. 26, p. 2788-2796, 2005.
- WEI, D., et al. Ellagic acid promotes ventricular remodeling after acute myocardial infarction by up-regulating miR-140-3p. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 95, p. 983-989, 2017.
- WEI, J., et al. Diastolic dysfunction measured by cardiac magnetic resonance imaging in women with signs and symptoms of ischemia but no obstructive coronary artery disease. **Int J Cardiol**. v. 220, p. 775–780, 2016.
- WHO – World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000 – 2016. Geneva: World Health Organization, 2018.
- WHO – World Health Organization. Global status report in noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.
- XU, M., et al. Predictors and prognosis for incident in-hospital heart failure in patients with preserved ejection fraction after first acute myocardial infarction: An observational study. **Medicine (Baltimore)**. v. 97, n. 24: e11093, 2018.



YANG, Y., et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 291, n. 6, H3065-3075, 2006.

YILMAZ, B., USTA, C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aortic rings and the underlying mechanism. **Phytother Res**. v. 27, n. 2, p. 285-289, 2013.

YOSHIDA, H., et al. Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. **Biochem Pharmacol**. v. 58, n. 11, p. 1695-1703, 1999.

ZHANG, H., et al. Resveratrol improves left ventricular diastolic relaxation in type 2 diabetes by inhibiting oxidative/nitrative stress: in vivo demonstration with magnetic resonance imaging. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 299, n. 4, H985-994, 2010.

ZHANG, R., et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. **Nat Med**. v. 11, n. 4, p. 409-417, 2005.

ZHANG, Y.H., et al. Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. **Circ Res**. v. 102, n. 2, p. 242-249, 2008.

ZILE, M.R., BRUTSAERT, D.L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. **Circulation**. v. 105, n. 11, p. 1387-1393, 2002.