

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO ETANÓLICO DE ROMÃ (*Punica granatum* L.) EM RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

LAÍS OLIVEIRA DELLACQUA

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Julho de 2012

LAÍS OLIVEIRA DELLACQUA

**EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO
ETANÓLICO DE ROMÃ (*Punica granatum* L.) EM RATAS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Margareth Ribeiro Moyses

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Julho de 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Dellacqua, Laís Oliveira, 1983-

D357e Efeitos do tratamento com extrato etanólico de romã (*Punica granatum* L.) em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) / Laís Oliveira Dellacqua. – 2012.

85 f. : il.

Orientadora: Margareth Ribeiro Moyses.

Coorientador: Roger Lyrio dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Hipertensão. 2. Romã. 3. Antioxidantes. I. Moyses,
Margareth Ribeiro. II. Santos, Roger Lyrio dos. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 612

LAÍS OLIVEIRA DELLACQUA

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO ETANÓLICO DE ROMÃ (*Punica granatum* L.) EM RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 06 de Julho de 2012 por:

Prof.^a Dr.^a Margareth Ribeiro Moyses - Orientadora, UFES

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos - Co-orientador, UFES

Prof.^a Dr.^a Denise Coutinho Endringer – UVV/Ifes

Prof. Dr. Helder Mauad, UFES

Prof.^a Dr.^a Ivanita Stefanon- Coordenadora do PPGCF, UFES

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Reatividade Vascular – Estudos em coração isolado, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, com apoio da seguinte instituição:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação àqueles que incansavelmente estiveram ao meu lado em todos os momentos, me dando apoio e força necessários para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Muito obrigada pai, mãe, Lele e meus queridos amigos espirituais, sem vocês teria sido muito mais difícil.

“Os segredos das ciências foram dados aos homens para o seu progresso, mas
jamais ele poderá ultrapassar os limites estabelecidos por Deus”

(Allan Kardec)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, força maior que me deu a dádiva de todos os dias poder exercer o meu trabalho.

Pai e mãe, muito obrigada por toda confiança depositada em mim, pelo carinho e amor incondicional. Pai, muito obrigada pelas incansáveis conversas, por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Muito obrigada mesmo! Obrigada por acreditar em meus sonhos e apostar neles sempre! Lele, irmão querido, parceiro de todas as horas, obrigada pelo carinho, pelas incansáveis ajudas científicas, pelo apoio e pelo incentivo sempre! Eu amo muito todos vocês!

Queridas amigas, Mari, Carol e Livia, muito obrigada pela amizade, pelo apoio constante, por sempre acreditarem em mim, e por terem estado sempre ao meu lado torcendo pelo meu sucesso. Parte dele está aí, e dedico a todas vocês! Muito obrigada!

Minhas tias queridas, em especial minha madrinha que considero minha segunda mãe, e vovó Aurea, muito obrigada por torcerem sempre pelo meu sucesso, por sorrirem sempre comigo! Amo vocês!

Minhas primas queridas, Bárbara e Juliana, que sempre estiveram presentes, muito obrigada pelas agradáveis conversas regadas sempre a comidinhas muito gostosas. Bárbara, muito obrigada pela amizade, pelas conversas na varanda, pelos conselhos, enfim, por tudo, muito obrigada!

Professora Margareth, mais do que uma orientadora, uma “mãezona” que me acolheu no seu laboratório sem sequer me conhecer, apostou em mim como pessoa e como pesquisadora, e com muito orgulho te retribuo toda confiança com esse lindo trabalho. Muito obrigada!

Meus amigos de laboratório, Thiago, sem o qual eu estaria até hoje tentando anestesiar um rato, João Guilherme, meu companheiro de guilhotina, Juliana, Izabela, Nataly, Letícia, minhas queridas ICs, alguns já não estão mais no laboratório, mas todos vocês foram de alguma forma muito importantes para que este trabalho pudesse ser realizado. Roger, muito obrigada pelo apoio e pela

amizade. Sempre pude contar com você em todos os momentos e te considero um co-orientador de coração, pois suas atitudes sempre fizeram jus a este título.

Meus queridos amigos da pós-graduação, Cristie, Rubia, Carol, Thiago e Pedro. Muito obrigada pela amizade de vocês, pelos momentos de descontração, pelo cafezinho depois do RU, pelas risadas, pelos sorrisos, pelos abraços. Muito obrigada!

Professora Ivanita Stefanon e professor Dalton Valentim Vassalo, vocês foram os responsáveis por tudo, pela minha paixão pela fisiologia desde a faculdade. Sempre foram meus exemplos. Estiveram sempre de portas abertas quando precisei. Muito obrigada por tudo!

Ao professor José Geraldo Mill, pelo uso do pletismógrafo.

Ao Professor Hélder Mauad, pelo auxílio na produção do extrato de romã.

À parceria com a professora Silvana Meyrelles e ao Leandro, muito obrigada pelas exaustivas horas de trabalho para realização da histologia.

À professora Nazaré Bissoli, pelo apoio constante. À amiga Poly, muito obrigada pela paciência em me ensinar a dissecar as coronárias e pela dosagem da ECA.

Enfim, muito obrigada a todos aqueles que mesmo não citados aqui contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, sem vocês não teria sido possível.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica é um importante fator de risco para doenças com comprometimento cardíaco, cerebral, renal e vascular periférico. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que pessoas que consomem uma dieta rica em antioxidantes possuem menor risco de desenvolverem desordens cardiovasculares. Assim, utilizamos o extrato de *Punica granatum* L. a fim de prevenir o aumento ou atenuar a hipertensão arterial, bem como suas conseqüentes complicações relacionadas ao sistema cardiovascular. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com extrato de romã na pressão arterial, na atividade da ECA, no estresse oxidativo e na morfologia vascular. Para tanto, utilizamos ratas SHR com 4 e 28 semanas de idade e ratas Wistar com 4 semanas de idade, que receberam extrato de romã (250 mg/kg) ou veículo (água filtrada), por gavagem, durante 30 dias. Ao final do tratamento os animais apresentavam 8 e 32 semanas. Os animais foram submetidos a três protocolos experimentais. Protocolo 1: Medida da pressão arterial sistólica nos animais com 8 semanas (SHR-Controle n=6, SHR-Romã n=7) e com 32 semanas (SHR-Controle n=6, SHR-Romã n=6). Protocolo 2: Medida da atividade da ECA coronariana nos animais com 8 semanas (SHR-Controle n=3, SHR-Romã n=4) e nos animais com 32 semanas (SHR-Controle n=4, SHR-Romã n=3). Protocolo 3: Análise morfométrica (SHR-Controle n=6, SHR-Romã n=5, Wistar-Controle n=6) e medida do estresse oxidativo (SHR-Controle n=4, SHR-Romã n=4) dos animais com 8 semanas. A PAS foi aferida por pletismografia de cauda e as coronárias foram dissecadas para análise histológica e dosagem da atividade da ECA. Os cortes coronarianos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise morfométrica e marcadas com dihidroetídeo (DHE) para análise da expressão de ânion superóxido. O tratamento crônico com extrato bruto de romã diminuiu significativamente a PA somente nos animais com 32 semanas (200 ± 2 mmHg para 188 ± 3 mmHg). Com relação à atividade da ECA, houve uma redução na atividade da mesma tanto nos animais com 32 semanas (SHR-Controle 232 ± 19 RFU/mg/ml vs SHR-Romã 95 ± 39 RFU/mg/ml), quanto nos animais com 8 semanas (SHR-Controle 209 ± 11 RFU/mg/ml vs SHR-Romã 79 ± 28 RFU/mg/ml) quando comparado o grupo no grupo SHR-Romã com o SHR-Controle. A análise da marcação do $O_2^{\cdot -}$ (DHE) nos mostra que os animais do grupo SHR-Romã

apresentaram um estresse oxidativo significativamente menor ($1,2 \pm 0,1$ U.A.) do que aquele encontrado nos animais do grupo SHR-Controle ($3,2 \pm 0,4$ U.A.). Nas artérias dos animais tratados com romã observamos ausência de remodelamento vascular. Desde modo, o tratamento com romã foi capaz de diminuir o estresse oxidativo nas artérias coronárias dos animais com 8 semanas e de inibir a atividade da ECA nas artérias dos animais mais jovens e mais velhos. Assim, o tratamento com romã foi efetivo em reduzir os efeitos deletérios observados na hipertensão.

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension is an important risk factor to diseases with heart, brain, kidney and peripheral vascular damage. Epidemiological studies have shown that people who consume a diet rich in antioxidants have lower risk of developing cardiovascular disorders. Thus, we used *Punica granatum* L. extract to prevent the increase or to reduce the arterial hypertension as well as its following complications related to the cardiovascular system. The objective of this study was to observe the effects of treatment with pomegranate extract on blood pressure, in ACE activity, on oxidative stress and on the vascular morphology. We used 4- week-old and 28-week-old female SHR rats and 4-week-old female Wistar rats, who received pomegranate extract (250mg/kg) or vehicle (filtered water) by gavage for 30 days. At the end of the treatment the animals were 8-week-old and 32-week-old. The animals were submitted to 3 experimental protocols. Protocol 1: Measurement of systolic blood pressure. 8-week-old animals (SHR-Control n=6, SHR-Pomegranate n=7) and 32-week-old animals (SHR-Control n=6, SHR-Pomegranate n=6). Protocol 2: Measurement of ACE activity. 8 week-old animals (SHR-Control n=3, SHR-Pomegranate n=4) and 32-week-old animals (SHR-Control n=4, SHR-Pomegranate n=3). Protocol 3: Morphometric analysis (SHR-Control n=6, SHR-Pomegranate n=5, Wistar-Control n=6) and the oxidative stress (SHR-Control n=4, SHR-Pomegranate n=4) from 8-week-old rats. SBP was measured by plethysmography and the coronary arteries were dissected for histological analysis and measurement of ACE activity. The coronary cut sections were stained with hematoxylin and eosin for morphometric analysis and marked by DHE for analysis of superoxide anions expression. Chronic treatment with pomegranate significantly reduced BP only in 32-week-old animals (200 ± 2 mmHg to 188 ± 3 mmHg) as well as the coronary ACE activity (SHR-Control 232 ± 19 RFU/mg/ml vs SHR-Pomegranate 95 ± 39 RFU/ mg /ml). In the 8-week-old animals, there was a significant decreased in ACE activity in the SHR-Pomegranate group (79 ± 28 RFU/mg/ml) when compared to SHR-Control group (209 ± 11 RFU/mg/ml). The analysis of $O_2^{\cdot -}$ (DHE) shows the presence of a significantly lower oxidative stress in the animals of the SHR-Pomegranate group (1.2 ± 0.1 AU) than that found in the animals of the SHR-Control group (3.2 ± 0.4 AU). In the arteries of rats treated with pomegranate we observed a lack of vascular remodeling.

Therefore, the treatment with pomegranate was able to decrease the oxidative stress in coronary arteries and to inhibit the ACE activity in them. Consequently, treatment with pomegranate was effective in reducing the damage effects observed in hypertension.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Obtenção do extrato de romã.....	35
3.2 Obtenção do Peso Seco.....	35
3.3 Animais Experimentais.....	36
3.4 Protocolos Experimentais.....	36
3.4.1 Protocolo 1.....	36
3.4.2 Protocolo 2.....	37
3.4.3 Protocolo 3.....	38
3.5 Avaliação não invasiva da Pressão Arterial.....	38
3.6 Determinação da atividade da ECA plasmática e coronariana.....	39
3.7 Histoquímica.....	40
3.8 Análise Morfométrica.....	41
3.9 Medida de ânion superóxido.....	42
3.10 Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Medida de Pressão Arterial Sistólica.....	44
4.2 Medida da atividade da ECA Coronariana.....	47

4.3	Medida da área vascular total.....	49
4.4	Medida da área de luz vascular.....	49
4.5	Medida da área de parede vascular.....	50
4.6	Razão de Remodelamento.....	51
4.7	Medida de ânion superóxido.....	52
5.	DISCUSSÃO.....	55
6.	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO I – Premiação.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte transversal de uma artéria muscular (médio calibre)	25
Figura 2: Tipos de remodelamento vascular	27
Figura 3: Valores da pressão arterial sistólica nos dias 0 e 30 obtidos em fêmeas (SHR) com 8 semanas. A: grupo SHR-Controle B: grupo SHR-Romã.....	44
Figura 4: Valores da pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle e do grupo SHR-Romã em animais com 8 semanas aferidas no 30 dia de tratamento.....	45
Figura 5: Valores da pressão arterial sistólica nos dias 0 e 30 obtidos em fêmeas SHR com 32 semanas. A: grupo SHR-Controle B: grupo SHR-Romã.	46
Figura 6: Valores da pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle e do grupo SHR-Romã em animais com 32 semanas aferidas no 30 dia de tratamento.....	47
Figura 7: Animais com 8 semanas:Valores da atividade da ECA coronariana nos animais do grupo SHR-Controle do grupo SHR-Romã no dia 30 do tratamento.....	48
Figura 8: Animais com 32 semanas:Valores da atividade da ECA coronariana nos animais do grupo SHR-Controle do grupo SHR-Romã no dia 30 do tratamento.....	48
Figura 9: Animais com 8 semanas:Valores da área vascular total dos animais do grupo Wistar-Controle, SHR-Controle e SHR-Romã no dia 30 do tratamento.....	49
Figura 10: Animais com 8 semanas:Valores da área de luz vascular dos animais do grupo Wistar-Controle, SHR-Controle e SHR-Romã no dia 30 do tratamento.....	50
Figura 11: Animais com 8 semanas:Valores da área de parede vascular dos animais do grupo Wistar-Controle, SHR-Controle e SHR-Romã no dia 30 do tratamento.....	51

Figura 12: Animais com 8 semanas: Cortes transversais de coronária marcados com dihidroetidina.....	53
Figura 13: Animais com 8 semanas:Valores de unidades arbitrárias de fluorescência, indicando estresse oxidativo dos animais do grupo SHR-Controle e SHR-Romã no dia 30 do tratamento.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ADH	Hormônio antidiurético
ADP	Difosfato de adenosina
ALv	Área de luz vascular
ANOVA	Análise de Variâncias
APv	Área de parede vascular
ATv	Área total vascular
BH₄	5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DHE	Dihidroetidina
DPI	<i>Diphenyleneiodonium</i>
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GMPc	3',5'-Guanosina Monofosfato Cíclica
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GTP	Guanosina Trifosfato
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
O₂⁻	Ânion Superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAS	Pressão Arterial sistólica
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (<i>platelet-derived growth factor</i>)
RR	Razão de Remodelamento
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão arterial é uma condição crônica que acomete milhões de pessoas no mundo inteiro (Lawes *et al.*, 2008). É um importante fator de risco para doenças com comprometimento cardíaco, cerebral, renal e vascular periférico (Passos *et al.*, 2006). Cerca de 54 % dos derrames, 47 % das doenças isquêmicas, 75 % das doenças hipertensivas e 25 % de outras doenças cardiovasculares no mundo, foram atribuídas a elevados níveis de pressão arterial. Além disso, em 2001, cerca de 7,6 milhões dos óbitos no mundo foram atribuídos a níveis pressóricos elevados (Lawes *et al.*, 2008).

A prevalência estimada de hipertensão no Brasil atualmente é de 35% da população acima de 40 anos. Isso representa em números absolutos um total de 17 milhões de portadores da doença, segundo estimativa de 2004, do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) (DATASUS, 2011). Além disso, em 2007, ocorreram cerca de 308 mil óbitos por doenças do aparelho circulatório (Malta *et al.*, 2009).

A hipertensão essencial, primária ou idiopática ocorre em 95 % de todos os casos de hipertensão, e pode ser definida como sendo uma hipertensão na qual causas secundárias como doença renovascular, insuficiência renal, feocromocitoma e aldosteronismo não estão presentes. É uma doença heterogênea que ocorre normalmente entre famílias e representa uma coleção de doenças genéticas ou síndromes hereditárias que resultam em anomalias bioquímicas. A hipertensão essencial permanece como um dos maiores fatores de risco de doenças cardiovasculares, apesar dos importantes avanços no conhecimento de sua fisiopatologia e da grande variabilidade de tratamentos efetivos. Níveis pressóricos elevados aumentam os riscos de doenças cardiovasculares em milhões de pessoas no mundo inteiro, e este problema vem se agravando ao longo do tempo (Carretero & Oparil, 2000).

Na tentativa de entender os mecanismos que desencadeiam a hipertensão essencial, foi desenvolvido um modelo de hipertensão espontânea em ratos (SHR). Diversas similaridades entre hipertensão primária e hipertensão espontânea podem ser ressaltadas, tanto na fisiopatologia quanto no curso clínico da doença hipertensiva (Carretero & Oparil, 2000; Henning *et al.*, 2010). Uma dessas similaridades é a disfunção endotelial, que pode ser atribuída a um desequilíbrio

entre os fatores relaxantes, como o óxido nítrico (NO), e os constritores (Zalba *et al.*, 2000). Além disso, o aumento do estresse oxidativo, que é uma condição onde há um desequilíbrio entre a produção e degradação de radicais livres (Hamilton *et al.*, 2001), frequentemente encontrado na hipertensão, pode contribuir para esta disfunção. Isto ocorre, uma vez que as espécies reativas de oxigênio (EROs), que são radicais livres derivados do oxigênio, possuem a capacidade de reagirem com o NO diminuindo sua biodisponibilidade (Hamilton *et al.*, 2001).

Embora seja frequentemente indicado que as causas da hipertensão essencial não sejam conhecidas, isto é apenas parcialmente apropriado, uma vez que podemos associar muitos fatores fisiopatológicos à gênese do aumento dos níveis pressóricos na hipertensão essencial (Carratero & Oparil, 2000). Dentre esses fatores podemos citar: aumento da atividade do sistema nervoso simpático, deficiência de vasodilatadores, como prostaglandinas e NO, anomalia na resistência dos vasos, obesidade e aumento da secreção de renina com conseqüente aumento na produção de angiotensina II e aldosterona (Johnson *et al.*, 2002).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem importante atuação na regulação da pressão arterial, equilíbrio hidroeletrolítico, estruturação e função cardiovascular (Johnston, 1992). O eixo renina-angiotensina-aldosterona está relacionado a inúmeras áreas da síndrome hipertensiva, tanto em sua origem, como em sua progressão. A ativação excessiva do SRAA tem sido reconhecida como elemento de importância na progressão de lesões de órgãos-alvo, como hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva, hipertrofia vascular, remodelamento ventricular pós-infarto do miocárdio e alterações renais (Cheng & Frishman, 1998).

Suas ações são mediadas principalmente pela angiotensina II, um potente vasoconstritor responsável pelo aumento da pressão arterial (Issa *et al.*, 2012). A formação da angiotensina II envolve uma clivagem sequencial do angiotensinogênio, proteína derivada principalmente da zona pericentral dos lóbulos hepáticos (Matsusaka *et al.*, 2012). Pela ação da enzima glicoproteolítica, sintetizada no rim, denominada renina, mas também encontrada em outros tecidos como cérebro, vasos sanguíneos do trato genital, suprarenais e tumores (Kostis, 1998), o angiotensinogênio é hidrolisado no decapeptídeo angiotensina I, que é então hidrolisado no octapeptídeo angiotensina II, pela ação da enzima conversora de

angiotensina (ECA) (Becari *et al.*, 2011). Além de sua formação plasmática, a angiotensina II pode ser formada localmente nos rins, nos vasos e no coração proporcionando sua função autócrina e parácrina (Bader & Ganten, 2008; Dzau, 1998) A presença de todos os componentes que participam da cascata biológica (renina, angiotensinogênio, ECA e receptores de angiotensina) suporta a possibilidade do SRAA local, complementando o SRAA plasmático (Dzau, 1988 ;Johnston, 1992).

A angiotensina II é responsável pela homeostasia cardiovascular, agindo por meio do aumento da pressão arterial pela interação, direta ou indireta, com vários mecanismos. Dentre eles podemos citar: modulação da homeostasia de sódio e água, constrição de vasos de resistência, estímulo da síntese e liberação de aldosterona, estímulo da sede, liberação do hormônio antidiurético (ADH) e aumento da descarga simpática do sistema nervoso central (Griendling *et al.*, 1993 ; Oparil *et al.*, 2003).

Sabe-se que a angiotensina II está envolvida não somente na patogênese da hipertensão, mas também em mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, infarto do miocárdio, remodelamento vascular e cardíaco e insuficiência cardíaca congestiva (Griendling *et al.*, 1996; Ross , 1999; Strawn, 2000 ; Vaughan, 2000). A maioria das funções da angiotensina II são mediadas através de sua interação com receptores AT₁, expresso nas células musculares lisas dos vasos, coração, pulmão, cérebro, fígado, rim, nas glândulas adrenais e várias outras glândulas (Becari *et al.*, 2011), e uma das maiores consequências de sua ativação, particularmente no sistema cardiovascular, é a produção e liberação de EROs (Dzau, 1998 ; Romero & Reckelhof, 1999).

Evidências mostram que a ativação de receptores AT₁ leva a produção de EROs na parede dos vasos, em parte devido à ativação do sistema NADPH-oxidase nas células vasculares (Griendling *et al.*, 1994). Este sistema é uma das maiores fontes de EROs nas células endoteliais e nas células musculares lisas, e consiste em um sistema formado por pelo menos cinco subunidades (Hamilton *et al.*, 2001), podendo ser encontrado tanto no citoplasma quanto na membrana plasmática. Neste, o ânion superóxido (O₂⁻) é formado a partir da redução do oxigênio molecular utilizando o NADPH como doador de elétron (Griendling *et al.*, 2000; Bedard *et al.*, 2007).

A formação de O_2^- é vital para a defesa do organismo contra microorganismos, e sua presença ocorre em células com atividade fagocítica, como neutrófilos, macrófagos e monócitos (Curnutte & Babior, 1987). A produção de EROs também ocorre em células não fagocíticas, como fibroblastos (Meier & Radeke, 1989), células mesangiais glomerulares (Radeke *et al.*, 1991), células endoteliais (Matsubara & Ziff, 1986) e células musculares lisas (Griendling *et al.*, 1994), nas quais exercem a função de estímulo do crescimento celular nestes sistemas.

Uma produção excessiva de EROs, que ocorre no tabagismo, na hipercolesterolemia, no diabetes, na insuficiência cardíaca e na hipertensão, está envolvida na fisiopatologia do sistema cardiovascular (Harrison, 1997). Vários eventos ocorrem devido a esta produção excessiva. O ânion superóxido (O_2^-), por exemplo, pode reagir com o NO, um potente vasodilatador produzido pelas células endoteliais, gerando peroxinitrito ($ONOO^-$), reduzindo assim a biodisponibilidade de NO (Toda & Toda, 2011).

Vários estudos sugerem que alteração na biodisponibilidade de NO contribui para as alterações vasomotoras encontradas da hipertensão (Félétou & Vanhoutte, 2006) e que o NO é o vasodilatador primário encontrado em grandes artérias coronarianas epicárdicas assim como um mediador de dilatação induzida por fluxo na microcirculação coronariana (Kelm & Schrader, 1990).

O fluxo coronariano é regulado para que possa manter uma adequada demanda metabólica que é imposta pelo miocárdio a cada batimento cardíaco (Feigl, 1983; Muller *et al.*, 1996; Tune *et al.*, 2004 ;Westerhof *et al.*, 2006). Os mecanismos que controlam o tônus arterial coronariano são: metabólico, miogênico, neuro-hormonais e endotelial. Mudanças na hemodinâmica coronariana que acompanham a hipertensão ocorrem como resultado de adaptações estruturais e funcionais da vasculatura coronariana. Fatores genéticos, neuro-humorais e locais contribuem para estas adaptações, o que resulta no aumento da resistência, redução do fluxo e aumento da distância de difusão, o que prejudica o fornecimento de oxigênio para o miocárdio (Feigl, 1983; Tune *et al.*, 2004 ;Westerhof *et al.*, 2006).

Múltiplos produtos derivados do endotélio podem contribuir para o controle da vasculatura coronariana. Sabe-se que um ou mais fatores hiperpolarizante derivados do endotélio contribuem para o controle da microvasculatura coronariana (Liu &

Gutterman, 2009), e que estes tornam-se mais proeminentes quando ocorre diminuição da biodisponibilidade de NO (Heintz *et al.*, 2008).

Além disso, sabe-se que o NO é produzido pelas células endoteliais quando a L-arginina é transformada em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A ativação tanto da NOS endotelial (eNOS) quanto da neuronal (nNOS) depende de Ca^{2+} , o que não ocorre com a NOS induzível (iNOS). A nNOS é constitutiva e é expressa no cérebro, em nervos periféricos (Bredt & Snyder, 1990) e no coração, a eNOS é expressa somente em células endoteliais (Förstermann *et al.*, 1991), enquanto a iNOS é induzida pela liberação de citocinas. A ativação da NOS nas células endoteliais depende da concentração de Ca^{2+} , da presença de calmodulina (para formação do complexo cálcio-calmodulina), da redução de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) e da presença de tetrahydrobiopterina (BH_4) para otimizar sua ação (Bredt & Snyder, 1990).

O NO formado, se difunde para o músculo liso vascular onde estimula a guanilatociclase solúvel, que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosinamonomofosfato cíclica (GMPc). Este aumento de GMPc leva uma diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , com conseqüente relaxamento (Toda & Okamura, 2003).

O NO é liberado pelo endotélio vascular e atua como um mensageiro intercelular. Possui papel importante na modulação do tônus microvascular e no fluxo sanguíneo regional (Moncada *et al.*, 1991). Além disso, o NO inibe agregação plaquetária e migração e adesão de leucócitos, ajudando a prevenir a formação de trombos e aterosclerose (Toda & Okamura, 2003).

Estudos experimentais e clínicos sugerem que o prejuízo da função endotelial é um importante fator para uma série de desordens cardiovasculares, incluindo doença arterial coronariana (Zhang *et al.*, 2000), aterosclerose (Li & Förstermann, 2009), hipertensão (Taddei *et al.*, 1993) e disfunção endotelial (Widlansky *et al.*, 2003). Mecanismos envolvidos no processo de disfunção endotelial decorrentes da diminuição da biodisponibilidade do NO, incluem a diminuição da expressão da óxido nítrico sintase (eNOS), geração de inibidores de NO e aumento do estresse oxidativo (Toda & Toda, 2011), que pode levar a uma resposta vasodilatadora dependente de endotélio prejudicada.

O aumento do estresse oxidativo pode também levar a modificações de DNA, peroxidação lipídica, modificações de proteínas e ativação de genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas nas doenças cardiovasculares. Dentre essas podemos citar as moléculas de adesão vascular (VCAM-1), moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e proteínas quimiotáticas de monócitos. A ativação dessas proteínas pró-inflamatórias gera um estado inflamatório crônico que ativa leucócitos e a liberação do fator de crescimento derivado do endotélio, estes, promovem proliferação das células musculares lisas e de matriz extracelular. (Luft *et al.*, 1999; Pueyo *et al.*, 2000 ; Usui *et al.*, 2000). Outra significativa consequência das EROs é a modificação de funções enzimáticas. Um excelente exemplo é a ativação de metaloproteinases que são enzimas que possuem o papel de degradar a matriz extracelular e de permitir que qualquer célula cresça ou migre, sendo este processo crucial para o remodelamento tanto cardíaco quanto vascular (Funck *et al.*, 1997; Janiszewski *et al.*, 1998 ;Siwik *et al.*, 2001).

Como mostrado na figura 1, as artérias são formadas pela camada íntima, que contém a lâmina elástica interna, camada mais externa da íntima, que a separa da camada média. Além da camada íntima, as artérias também são compostas pela camada média, que é formada principalmente por fibras musculares lisas, dispostas circularmente, às quais se agregam quantidades variáveis de fibras elásticas, fibras reticulares (colágeno tipo III) e proteoglicanas. Nas artérias, a camada média possui também a lâmina elástica externa, que a separa da camada adventícia. A camada mais externa, denominada adventícia, consiste em tecido conjuntivo, com fibras colágenas (tipo I), elásticas e fibroblastos (Junqueira & Carneiro, 1999).

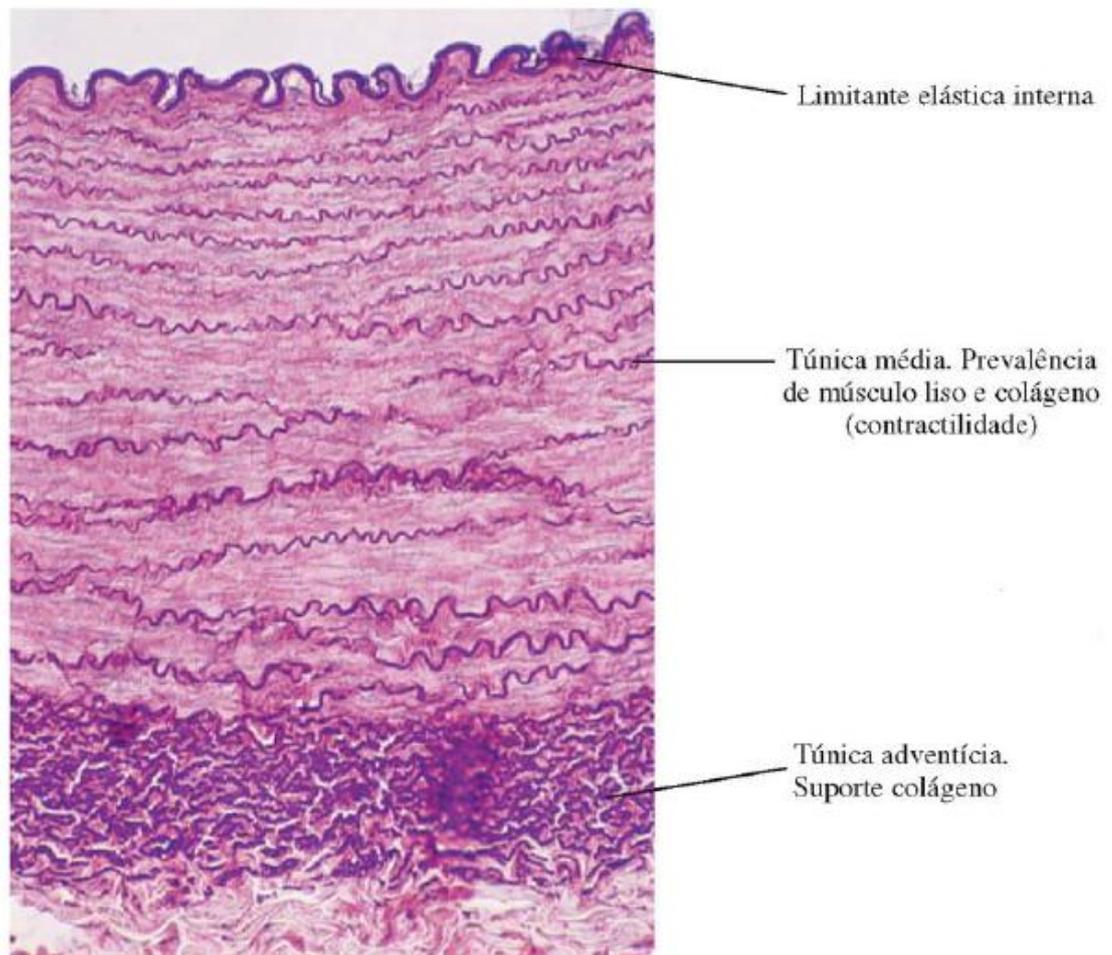


Figura 1: Corte transversal de uma artéria muscular (médio calibre). Em sua constituição predominam células musculares lisas, responsáveis pela regulação do tônus e ajuste da pressão arterial. Observar as três camadas que constituem a artéria: 1. camada íntima, 2. camada média e 3. camada adventícia. Aumento pequeno. Fonte: Junqueira e Carneiro.

A característica funcional primária dos vasos é o diâmetro do lúmen, que determina a resistências dos mesmos. Esta característica é determinada pelas propriedades ativas e estruturais do vaso. As propriedades ativas são determinadas pelo estado de contração das células musculares lisas, seu número e arranjo. As propriedades estruturais do vaso são determinadas pelo diâmetro do lúmen, a espessura da camada média e a espessura da parede (Mulvany, 2002).

A proliferação das células do músculo liso vascular é um fator importante que contribui para a fisiopatologia da hipertensão e aterosclerose (Ross, 1993). As EROs, como O_2^- e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são capazes de estimular esta proliferação (Rao & Berk, 1992 ; Sundaresan *et al.*, 1995). Estes oxidantes são

produzidos rapidamente pelo músculo liso após exposição ao fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) ou à angiotensina II (Griendling *et al.*, 1994; Sundaresan *et al.*, 1995). Na hipertensão, a produção excessiva de radicais livres induzida por estímulo da angiotensina II ocorre principalmente na camada média do vaso, processo este que contribui para o remodelamento hipertrófico que pode ocorrer na hipertensão (Rajagopalan *et al.*, 1996).

Em 1987, Glagov apresentou um conceito sobre remodelamento arterial em um processo de aterosclerose em artéria coronária. Este fenômeno descrevia que uma estenose causada por placa aterosclerótica de até 40% de comprometimento do lúmen levava a um aumento da área do lúmen (Glagov *et al.*, 1987).

O termo “remodelamento arterial” foi previamente usado para descrever qualquer mudança na estrutura da parede do vaso. Este termo tem sido utilizado especificamente para se referir a mudanças no tamanho do vaso (ou área de secção transversa dentro da lâmina elástica externa (Ward *et al.*, 2000).

O remodelamento vascular é uma resposta fisiológica a alterações no fluxo, na pressão e à aterosclerose. O remodelamento envolve mudanças no crescimento das células da musculatura lisa vascular e migração, assim como alterações na matriz do vaso (Mulvany *et al.*, 1996). Pode ser classificado de acordo com Mulvany, como demonstrado na figura 2, baseado na natureza das mudanças no diâmetro do vaso, podendo ser negativo, quando há diminuição do mesmo, ou positivo quando há aumento, e por mudanças na espessura da parede do vaso. Quando aumentada, é classificado como hipertrófico, quando diminuída como hipotrófico e sem modificações como eutrófico (Mulvany *et al.*, 1996). Como exemplo, temos o remodelamento positivo eutrófico, que ocorre com aumento do diâmetro do lúmen sem mudanças na quantidade de massa total ou características da parede do vaso, assim como ocorre quando há queda do fluxo ou na aterosclerose. Em contraste, temos o remodelamento negativo hipertrófico, que pode ser definido pela diminuição do diâmetro do lúmen com aumento na espessura de parede, assim como ocorre quando há aumento da pressão. Na hipertensão crônica, este aumento da parede do vaso é hipotetizado de acordo com a lei de Laplace, no qual o aumento da espessura da parede do vaso tem como objetivo diminuir o estresse de parede. Forças físicas e mecanismos autócrinos e parácrinos, responsáveis pelo

crescimento celular estimulado pela hipertensão, parecem ser os fatores responsáveis (Berk, 2001).

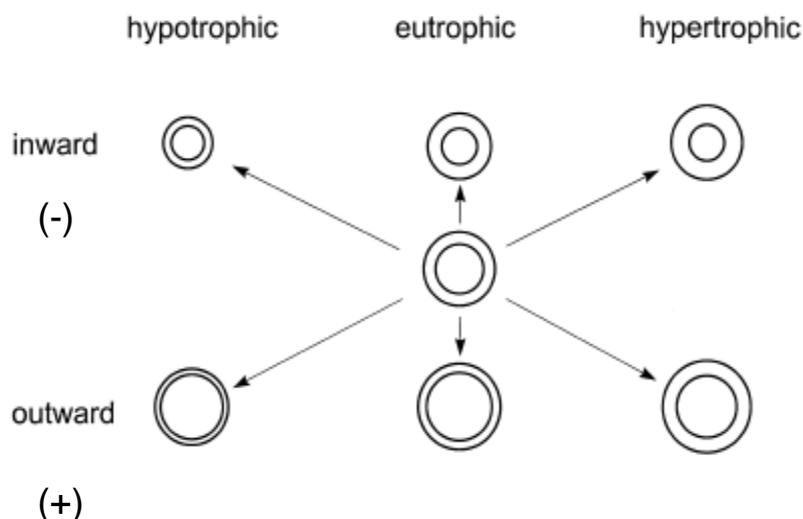


Figura 2: Diferentes maneiras que o remodelamento pode modificar a área de secção transversa da camada média e do lúmen dos vasos. No centro está representado um vaso normal. O remodelamento pode ser negativo ou positivo em relação ao diâmetro do lúmen, e com relação á área de secção transversa da camada média, pode ser subdividido em hipotrófico, eutrófico e hipertrófico. Modificado de: Mulvany, 1999.

A hipertensão é acompanhada de disfunção endotelial decorrente da diminuição da biodisponibilidade de NO e outros fatores vasoprotetores, além do aumento da produção de agentes pró-inflamatórios e vasoconstritores, como a angiotensina II, endotelina e EROs (Wong *et al.*, 2010). A disfunção endotelial decorrente de lesão, leva a respostas compensatórias que alteram as propriedades normais do endotélio. Deste modo, diferentes formas de lesão aumentam as propriedades de adesão ao endotélio em respeito aos leucócitos e plaquetas, assim como a permeabilidade dos mesmos. A lesão também induz ao endotélio propriedades pró-coagulantes ao invés de anticoagulantes, e a formar moléculas vasoativas, como citocinas e fatores de crescimento. Se a resposta inflamatória não cessar, este processo continua indefinidamente. Assim, a resposta inflamatória estimula a migração e proliferação das células da musculatura lisa vascular, levando

ao aumento da espessura da parede do vaso, que é compensado por gradual dilatação a fim de que o vaso permaneça com o lúmen inalterado (Ross, 1999).

A hipertensão é acompanhada de uma série de danos ao sistema cardiovascular, e intervenções que possam reduzir esses danos estão constantemente sendo buscadas (Intengan & Schiffrin, 2001; Wind *et al.*, 2010). Dentre estas podemos citar as plantas medicinais, que vem ocupando um espaço cada vez maior nos estudos relacionados a doenças do sistema cardiovascular (Aviram *et al.*, 2004; Veeramani *et al.*, 2012).

O consumo de plantas medicinais pela população desperta na comunidade científica um interesse cada vez maior em estudar os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos dessas plantas (Eichemberg *et al.*, 2009). O conhecimento etnofarmacológico acumulado ao longo de gerações tem servido como base para a descoberta de fármacos de grande importância, tais como: digoxina, quinina, morfina, hiosciamina, ácido salicílico e artemisina (Maraschin & Verpoorte, 1999).

Os vegetais podem originar recursos terapêuticos em várias instâncias, podendo ser utilizados de diversas maneiras, com diferentes propósitos. Sua utilização pode ser *in natura*, ou seja, com partes inteiras ou sob forma rasurada para preparação de chás e/ou outras preparações caseiras, destinadas ao uso doméstico, pode ser sob a forma de drogas pulverizadas, extratos brutos ou frações enriquecidas, extratos padronizados, tinturas, extratos fluidos, pós, comprimidos e cápsulas e finalmente podem ser submetidos a sucessivos processos de extração e purificação, para isolamento das substâncias de interesse. As substâncias isoladas podem ser ativas e diretamente utilizadas como fármacos (ex: quinina, digoxina e ergotamina), ou podem ser utilizadas como precursores em processos de síntese de fármacos (Rates, 2001).

O estudo de plantas medicinais, a partir de seu emprego pelas comunidades, pode fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre estas plantas (Eichemberg *et al.*, 2009). Desta forma, pode-se planejar a pesquisa a partir de um conhecimento empírico já existente, muitas vezes consagrado pelo uso contínuo (Brasileiro *et al.*, 2008).

A grande procura da população pelo uso de plantas medicinais, vem despertando interesse da comunidade científica em estudar substâncias bioativas

de origem natural, com o intuito de compreender e poder utilizar as plantas como recurso terapêutico, porém com a segurança proporcionada pela ciência aplicada. Inúmeras publicações confirmam importantes atividades farmacológicas de plantas, ervas e frutos de uso seculares e empíricos pela população (Carvalho *et al.*, 2005; Chidambara Murty *et al.*, 2002 ;Nigris, 2006).

Neste sentido, utilizamos a *Punica granatum* L., também conhecida como romã, uma fruta antiga e mística da família Punicaceae, considerada um fruto sagrado com poderes de sorte, fertilidade e abundância. Possui destaque nas cerimônias, arte e mitologia egípcia e grega, e era o emblema pessoal do imperador romano Maximiliano. A romã é o símbolo da antiga cidade de Granada, na Espanha, a partir do qual a cidade recebe o seu nome. O nome do gênero, *Punica*, era o nome romano para Cartago, antiga cidade ao norte da África, onde as melhores romãs cresciam. Além disso, a romã é conhecida pelos franceses como “grenade” e pelos espanhóis como “granada”. A romeira cresce tipicamente de 4 a 5 metros, possui muitos galhos espinhosos e pode viver por muitos anos, como evidenciado por árvores em Versalhes, na França, que são conhecidas por terem mais de 200 anos de idade. As flores são grandes, brancas com vermelho, possuem um cálice tubular que eventualmente torna-se o fruto, que contém muitas sementes separadas por uma membrana branca, o pericarpo, e cada uma é rodeada por pequenas quantidades de um suco vermelho e adstringente. A romã é nativa dos Himalaias ao norte da Índia, mas tem sido cultivada e naturalizada desde os tempos antigos sobre toda região do Mediterrâneo. Também é encontrada na Índia e em regiões áridas do sudeste Asiático e na África. A árvore também é cultivada nas regiões da Califórnia e Arizona (Jurenka, 2008).

Além do seu uso histórico, a romã tem sido usada em várias áreas da medicina para uma variedade de doenças. As propriedades potenciais da romã são abrangentes e incluem tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e aterosclerose, (Aviram *et al.*, 2004; Davidson *et al.*, 2009 ,Ghosh & Scheepens, 2009 ;Jadeja *et al.*, 2010).

Os extratos de todas as partes da romã parecem ter propriedades terapêuticas, e isso parece ser devido ao seu alto conteúdo de polifenóis, contudo, uma maior concentração de polifenóis parece ocorrer na casca da fruta (Gil *et al.*, 2000; Jurenka, 2008). Dentre os polifenóis encontrados na romã, temos os

flavonóides, representados pelo ácido elágico, antocianinas, flavonóis, flavonas, rutina e quercetina, e pelos taninos, representados pelo ácido gálico, punicalgina e catequinas (Gil *et al.*, 2000).

Muitos trabalhos podem ser encontrados em literatura a respeito das propriedades antioxidantes da romã (Aviram *et al.*, 2000; Aviram *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2000), e os níveis de antioxidantes encontrados no suco da romã parecem ser maiores do que os encontrados em outros sucos naturais e no vinho tinto (Aviram *et al.*, 2002). Os antioxidantes, no geral, possuem inúmeras propriedades biológicas, incluindo proteção contra oxidação do colesterol, contra o processo de aterogênese, contra o envelhecimento e contra a diminuição da biodisponibilidade de NO decorrente de reações com EROs (Reaven *et al.*, 1999 ; Napoli *et al.*, 2001).

As EROs são constantemente produzidas em nosso organismo, e necessitam ser neutralizadas para que possa ser evitado os danos decorrentes de sua presença (Wind *et al.*, 2010). Para isso, produzimos uma série de enzimas que desempenham papel de antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Jadeja *et al.*, 2010). Contudo, em estado patológico, essas enzimas não são suficientes para a neutralização dessas moléculas danosas (Althunibat *et al.*, 2010). Dessa forma, os polifenóis encontrados na romã possuem capacidade antioxidante devido à presença de grupos fenólicos, que possuem átomos de hidrogênio, capazes de neutralizar as EROs (Fraga, 2007).

Estudos encontrados em literatura mostram que uma dieta rica em flavonóides possui efeito protetor na função endotelial em humanos (Duffy *et al.*, 2001 & Stein *et al.*, 1999). Duarte *et al.* (2001) mostraram que o tratamento com quercetina melhorou a função vascular em ratos SHR.

Estudos epidemiológicos mostram que o consumo de frutas e vegetais ricos em conteúdos fenólicos estão correlacionados à redução de doenças cardio e cerebrovasculares e mortalidade relacionada a câncer (Hertoget *al.*, 1997), e estes efeitos benéficos são decorrentes da remoção de radicais livres. Além disso, pessoas que consomem dieta rica em antioxidantes têm menor risco de desenvolverem desordens cardiovasculares (Banerjee & Maulik, 2002).

A disponibilidade em literatura de trabalhos mostrando os efeitos cardioprotetores do extrato de romã em ratos SHR ainda é escassa. Baseado nisso,

hipotetizou-se que o consumo oral do extrato de romã em ratas SHR pudesse melhorar os parâmetros cardiovasculares e diminuir o estresse oxidativo, que estão prejudicados neste modelo experimental. Com isso, o presente estudo teve como objetivo a avaliação dos efeitos cardioprotetores do consumo crônico de extrato da casca de romã em ratas SHR.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos cardiovasculares e antioxidantes do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* L (Romã) em ratas espontaneamente hipertensas (SHR).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico de romã sobre a pressão arterial sistólica
- Determinar a atividade da ECA coronariana
- Avaliar parâmetros histomorfométricos das artérias coronárias de ratas SHR e compará-los com ratas Wistar
- Avaliar os níveis de estresse oxidativo coronariano pelo método de DHE

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato de romã

Foram utilizadas as cascas da romã (Exsicata nº 1097-9, depositada no herbário VIES/UFES, setor de botânica do Departamento de Ciências Biológicas), as quais foram submetidas à secagem em estufa, à 37 °C, por aproximadamente 10 dias. Após estarem completamente secas, as cascas foram trituradas, utilizando-se um moedor elétrico (DPM – Júnior). Para obtenção do extrato hidroalcoólico, o pó das cascas de romã foi adicionado em etanol 95 °GL (85,71g do pó da casca/1L de álcool), em um recipiente âmbar a temperatura ambiente (25 a 30 °C), até a completa extração dos componentes da casca. Após, o extrato foi filtrado a vácuo e a fase líquida foi submetida à rota-evaporação a pressão reduzida e temperatura de 60 °C, em um evaporador rotativo (TECNAL, modelo TE-210) com a finalidade de remover o solvente (etanol 95 °GL), sem que os componentes químicos do extrato fossem alterados. Ao final, o extrato foi colocado em vidro âmbar e mantido em geladeira até o momento da realização do protocolo experimental. O extrato hidroalcoólico foi diluído em água filtrada e administrado por gavagem diariamente por 30 dias na dose de 250mg/kg.

3.2 Obtenção do Peso Seco

Devido ao fato do extrato bruto apresentar certo grau de hidratação, mesmo após ter sido colocado no rota-evaporador, realizamos a determinação do peso seco para determinarmos a quantidade efetiva de extrato (não hidratado) que foi utilizada nos protocolos experimentais. Para isto, inicialmente um cadinho de porcelana vazio foi submetido a aquecimento em estufa à 60 °C. A seguir, foram feitas várias pesagens do cadinho em balança digital (AND) e anotado seu peso, até que fosse obtido o mesmo peso em três pesagens sucessivas. Em outro recipiente, foram pesados 500 mg do extrato bruto, os quais foram diluídos em 5 mL de água filtrada, misturando-se até obtenção de uma solução homogênea. Foi transferido 1 ml dessa solução (100 mg do extrato bruto) para o cadinho de porcelana previamente seco. O cadinho foi então colocado em estufa à 80 °C até a total evaporação do diluente, controlando cuidadosamente o aquecimento para evitar a perda do material devido à

fervura. A seguir, o cadinho foi pesado, por repetidas vezes e, mantido em aquecimento constante, até que o peso seco observado não se alterasse por três vezes consecutivas.

Para determinação do peso seco, do valor da pesagem final foi subtraído o valor do peso do cadinho vazio. O total obtido foi correspondente ao peso seco do extrato contido em 1 mL do extrato bruto diluído. As doses de extrato que foram utilizadas neste estudo foram baseadas no peso seco do extrato. O valor do peso seco do extrato bruto correspondeu a 68mg/100mg.

3.3 Animais experimentais

Foram utilizadas ratas com hipertensão espontânea (SHR) com 4 e 28 semanas de idade, divididas em grupo SHR-Controle, SHR-Romã e ratas Wistar com 4 semanas denominadas grupo Wistar-Controle. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em sala com controle de temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas. As gaiolas permitiam o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração. Os animais Wistar-Controle e SHR-Controle receberam como veículo água filtrada, e os animais do grupo SHR-Romã receberam extrato de romã. O tratamento foi realizado diariamente, uma vez ao dia por gavagem, por 30 dias. O protocolo experimental foi certificado pelo CEUA/UFES sob o número 107/2011.

3.4 Protocolos experimentais

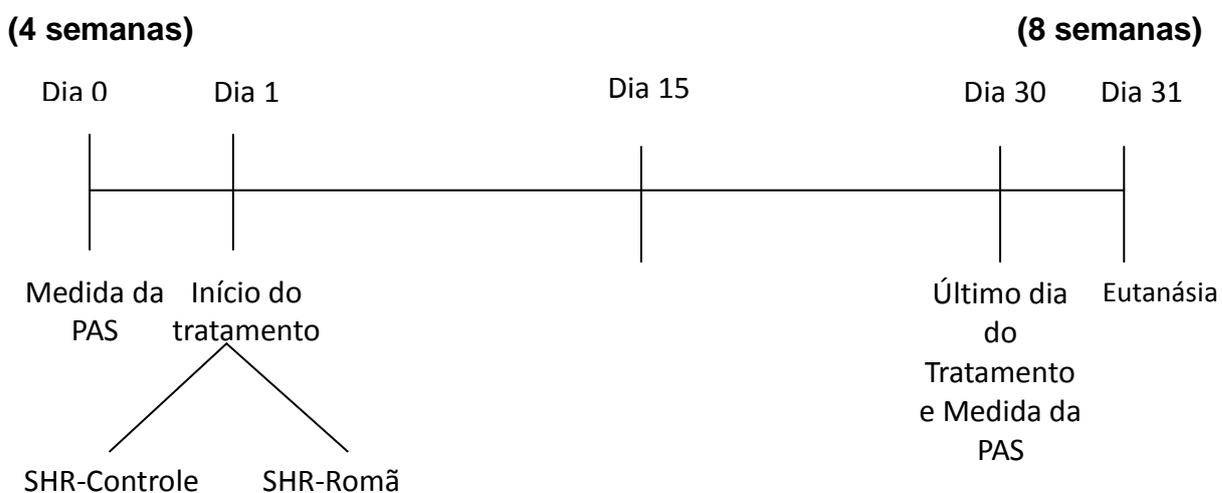
3.4.1 Protocolo 1

Com o objetivo de avaliar a atenuação da pressão arterial sistólica (SHR-Controle n=6, SHR-Romã n=6) e a atividade da ECA coronariana (SHR-Controle n=4, SHR-Romã n=3) utilizamos ratas SHR com 32 semanas de idade.



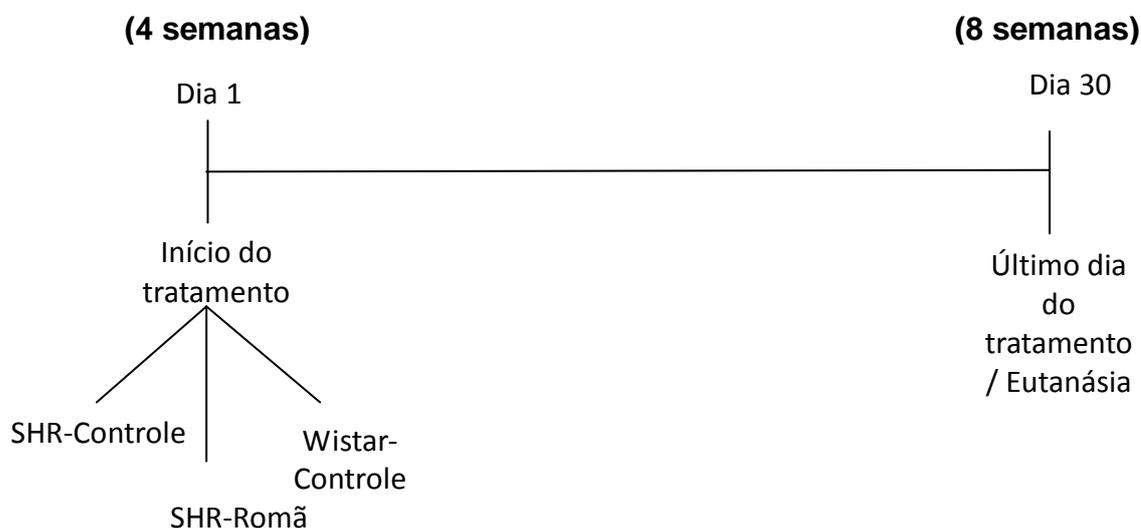
3.4.2 Protocolo 2

Com o objetivo de avaliar a prevenção do aumento da pressão arterial sistólica (SHR-Controle n=6, SHR-Romã n=7) e a atividade da ECA coronariana (SHR-Controle n=3, SHR-Romã n=4), utilizamos ratas SHR com 8 semanas de idade.



3.4.3 Protocolo3

Com o objetivo de avaliar a morfologia (SHR-Controle n=6, SHR-Romã n=5, Wistar-Controle n=6) e o estresse oxidativo das artérias coronárias (SHR-Controle n=4, SHR-Romã n=4), utilizamos ratas SHR e Wistar com 8 semanas de idade.



3.5 Avaliação não invasiva da Pressão Arterial

Antes da realização dos registros foi necessário aclimatar os animais no equipamento a ser utilizado (IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA). Para isso realizamos o processo de aclimação 3 dias antes à coleta do registro. A aclimação consistiu no acondicionamento do animal por cerca de 10 minutos no equipamento, evitando a influência do estresse sobre a pressão arterial. No dia do registro os animais foram acomodados na câmara aquecida dentro de um contentor com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região próxima a cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de pressão arterial sistólica foi obtido por meio de sinais do transdutor acoplado a um computador, como descrito em trabalhos anteriores (Baldo *et al.*, 2011; Mochha & Mustafa, 2005). A temperatura foi controlada entre 29 e 32 °C durante 40 minutos em que o animal permaneceu no equipamento. Foi obtida a média de 3 registros com diferença máxima de 10 mmHg, sendo descartados os registros associados à influências causadas por movimentos dos

animais. Os registros foram coletados 1 dia antes do início do tratamento e no 30^o dia do tratamento.

3.6 Determinação da atividade da ECA coronariana

Após o fim do tratamento, os animais foram anestesiados com pentobarbital intraperitoneal (50 mg/kg) e as coronárias septal anterior, descendente anterior e circunflexa foram dissecadas sob lupa (DF Vasconcellos AS, Brasil). As amostras foram armazenadas em temperatura de -80^oC em tubos tipo eppendorf.

As amostras de coronária foram posteriormente descongeladas e homogeneizadas em tampão Tris.HCl, pH 7,0 com 50 mM NaCl. Os tecidos foram em seguida centrifugados a 1000 g por 10 minutos a 4^oC. O sobrenadante foi coletado e a medida de concentração de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry, com albumina bovina como padrão. O restante do sobrenadante foi armazenado em temperatura de -80^oC para posterior análise da atividade da ECA.

O ensaio para a medida da atividade proteolítica da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I) empregou o substrato AbzFRK(Dnp)p-OH, ideal para estudos em cinéticas enzimáticas e para análise da atividade somática dos domínios C e N da ECA-I. Os ensaios foram realizados diretamente em Espectrofluorímetro (TECAN GENios) de microplaca automático equipado com controlador de temperatura e shaker, placa com 96 poços de poliestireno preta.

As amostras de homogenato de coronária foram descongeladas em gelo. Em cada poço da microplaca, foi colocado 20 µl de amostra do grupo pretendido (plasma/coronária), em seguida adicionou-se a mistura do tampão de ensaio (12,1 g de Tris.Base, 2,9g de NaCl em 1 L de água deionizada com pH 7,0 ajustado com HCl) e 10 Mm de Abz-FRK(dnp)p-OH. Gravou-se o aumento da fluorescência com excitação – λ_{ex} : 320 nm e emissão λ_{em} : 420 nm, com a temperatura de 37^oC e agitação constante. Todas as dosagens foram feitas em triplicata. A atividade da ECA foi expressa em AFU (unidades arbitrárias de fluorescência) por ml de amostra (Carmona *et al.*, 2006).

3.7 Histoquímica

Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com pentobarbital intraperitoneal (50 mg/kg) e os corações dissecados de suas conexões e imediatamente transferidos para o aparelho de perfusão isolada através da canulação da aorta, no nível de sua curvatura, começando a seguir a perfusão retrógrada, pelo método de Langerdorff modificado. Os corações foram perfundido por 5 minutos com solução de KREBS-Hepes (HEPES 9,4 mM; NaCl 132 mM; glicose 5 mM; KCl 4 mM; MgCl₂ 0,49 mM; CaCl₂ 1mM; pH 7,4 à 37 °C) seguido de 50 mL de paraformaldeído (4%). As soluções foram infundidas no coração com pressão controlada mimetizando a pressão arterial média do animal (100 mmHg) objetivando preservar o formato das artérias. Após, as coronárias (septais anteriores) foram dissecadas sob lupa (DF Vasconcellos AS, Brasil) e armazenadas em Tissue-Tek (Tissue-Tek; Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA, USA) e acondicionadas em temperatura de -20 °C.

As lâminas de vidro destinadas à histologia foram lavadas com água quente (≈ 45 °C) e detergente por cerca de 30 minutos, seguida de diversas lavagens com água quente e por último as lâminas foram lavadas com álcool absoluto para finalmente serem recobertas por uma fina camada de solução de gelatinização (1%) para que ocorresse adesão dos cortes na mesma. As lâminas permaneceram nessa solução a temperatura de 50 °C por 2 minutos e, posteriormente, foram secas em estufa a 37 °C por 24 h.

As amostras foram emblocadas em Tissue-Tek (Tissue-Tek; SakuraFinetek USA, Inc. Torrance, CA, USA) e seccionadas transversalmente (8 µm) a partir da porção da coronária mais próxima da base do coração, com distância de 160 µm entre os cortes, através de um micrótomo criostato (Leica, modelo CM 1850). Os cortes teciduais foram realizados em quadruplicata e posicionados em lâminas de vidro preparadas adequadamente para adesão do tecido e separados para realização de coloração por HE (hematoxilina-eosina) e expressão ânion superóxido.

Para coloração por HE, os cortes foram expostos primariamente à hematoxilina por 1 m, em seguida lavados por 15 min em água corrente para serem expostos a eosina por 3 min, seguidos de uma última lavagem em água corrente por 5 min. Ao término da impregnação por corantes dos cortes realizaremos a

montagem das lâminas para imersão. Para tal, utilizamos DPX (Mountant for histology, Sigma), que banhou os cortes, e lamínula de vidro para cobrí-los.

3.8 Análise Morfométrica das coronárias

Com o uso de um microscópio trinocular (DM 2500) acoplado a uma câmera digital (Leica DFC 310 FX) fez-se a captura de imagens das lâminas, e estas foram analisadas em programas de imagem específicos (Image J, versão 1.4). Para captura das imagens foram utilizadas objetivas de 40x e 100x. Foram analisados 12 cortes de cada animal.

Para medições das imagens capturadas com a objetiva de 40x, foram analisados três cortes transversos por animal e, por meio das ferramentas oferecidas pelo programa Image J (versão 1.4) foi realizada a medida de três parâmetros. A área total do vaso (ATv) foi calculada através do contorno do vaso, utilizando como delimitação externa a lâmina elástica externa, componente mais externo da camada média do vaso. Deste modo, toda área compreendida dentro desta delimitação foi calculada e referida como ATv. O segundo parâmetro medido foi a área da luz vascular (ALv). Para isto, um contorno tendo como referência externa o endotélio vascular foi realizado, e deste modo a área compreendida dentro desta delimitação foi referida como a ALv. A área de parede vascular (APv), contendo as camadas média e íntima, foi determinada pela diferença entre as duas áreas.

Também foi calculada a razão de remodelamento ou índice de remodelamento (RR), através da razão entre a ATv dos animais SHR-Controle e SHR-Romã pela ATv dos animais Wistar-Controle. Foi considerado remodelamento positivo quando o $RR > 1,05$; ausência de remodelamento quando o RR entre 0.95 e 1.05; e o remodelamento negativo, quando o $RR < 0.95$ (Pasterkamp *et al.*, 1995; Schoenhagen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). Passando esses valores do RR para percentual temos: ausência de remodelamento quando o RR está entre 95 e 105%, $RR > 105\%$ indica remodelamento positivo e o $RR < 95\%$ indica remodelamento negativo.

3.9 Medida de ânion superóxido em artérias coronárias

Após o preparo das lâminas, conforme descrito na histoquímica, os cortes, que estavam acondicionados em temperatura de -20°C foram secos por 1 h a 37°C . Após, foram incubados com uma solução dihidroetidina ($2\ \mu\text{M}$) diluído em Krebs-HEPES pH 7,4. Após serem recobertos por uma lamínula, as lâminas de vidro foram acondicionadas em uma câmara umedecida, protegida da luz, e então incubadas, à 37°C , por 30 minutos. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon Ti-S, EUA) equipado com filtro de comprimento de onda de 585 nm (G-2E/C; Nikon, EUA) e câmera digital (Ds-Ri1; Nikon, EUA), e os dados analisados utilizando o *software* NIS Elements (Nikon). Para captura e análise das imagens foi utilizada objetiva de 20x.

3.10 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pelos programas estatísticos Graph-PadPrism 4. Foi utilizada análise de variâncias (ANOVA) uma via seguida de *post hoc* de Tukey e teste “t” de Student. Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média (média \pm EPM) e os níveis de significância foram estabelecidos quando $*P < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Medida de Pressão Arterial Sistólica

Na figura 3, observa-se os valores de pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle (painel A) e SHR-Romã (painel B) aferidos nos dias 0 (134 ± 2 mmHg e 144 ± 2 mmHg) e 30 (163 ± 2 mmHg e 171 ± 4 mmHg) do tratamento. A pressão arterial sistólica, respectivamente foi significativamente maior no dia 30.

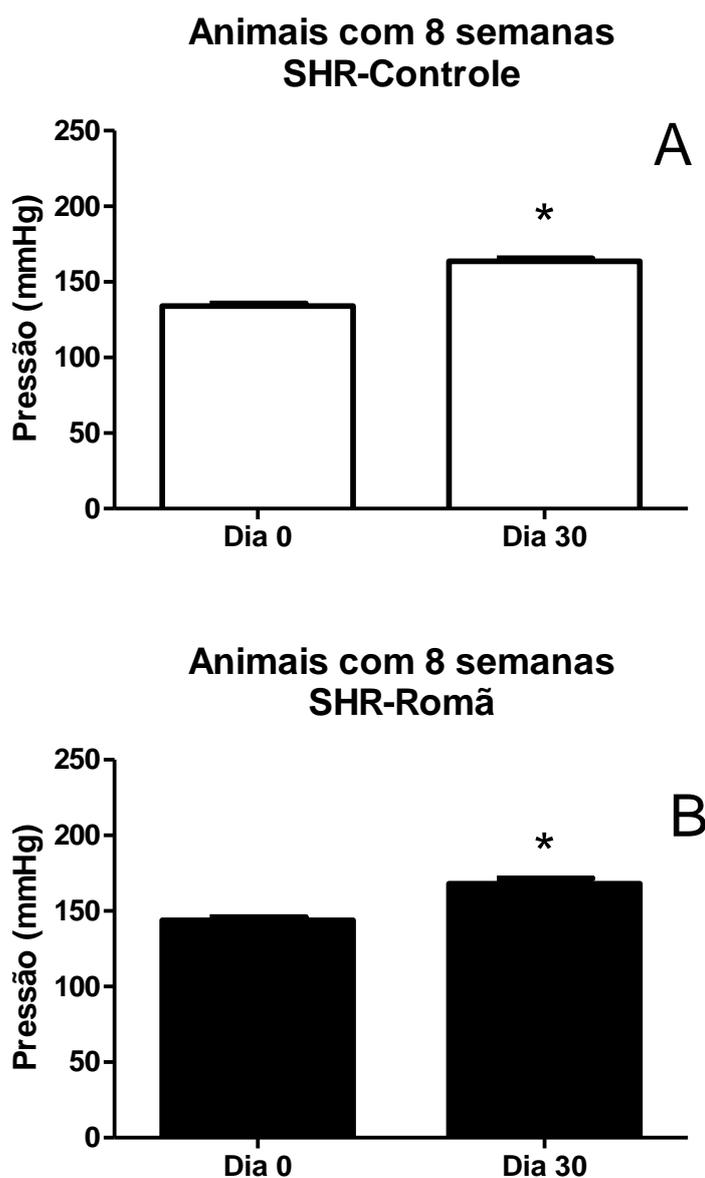


Figura 3: Valores da pressão arterial sistólica nos dias 0 (n=6) e 30 (n=6) obtidos em fêmeas espontaneamente hipertensas (SHR) com 8 semanas: A: grupo SHR-Controle B: grupo SHR-Romã. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

Na figura 4 observa-se os valores de pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle (163 ± 2 mmHg) e do grupo SHR-Romã (171 ± 4 mmHg) com 8 semanas, no dia 30 do tratamento. A pressão arterial sistólica não se apresentou significativamente diferente.

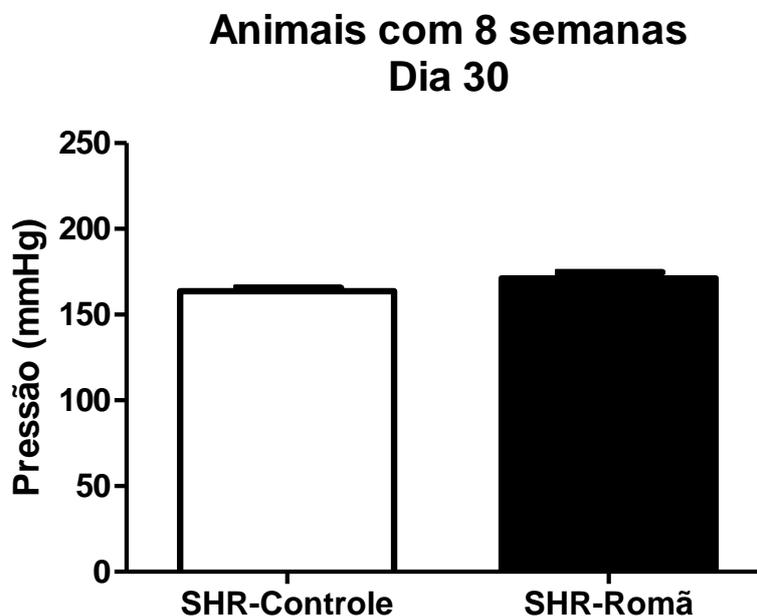


Figura 4: Valores da pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle (n=6) e do grupo SHR-Romã (n=7) em animais com 8 semanas aferidas no 30 dia de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

Na figura 5, observa-se os valores de pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle e SHR-Romã com 32 semanas, nos dias 0 e 30 do tratamento. Nota-se que houve um aumento significativo da pressão arterial sistólica após 30 dias de tratamento com veículo no grupo SHR-Controle (de 197 ± 4 mmHg para 208 ± 2 mmHg), e uma redução da mesma após 30 dias de tratamento com romã (200 ± 2 mmHg para 188 ± 3 mmHg).

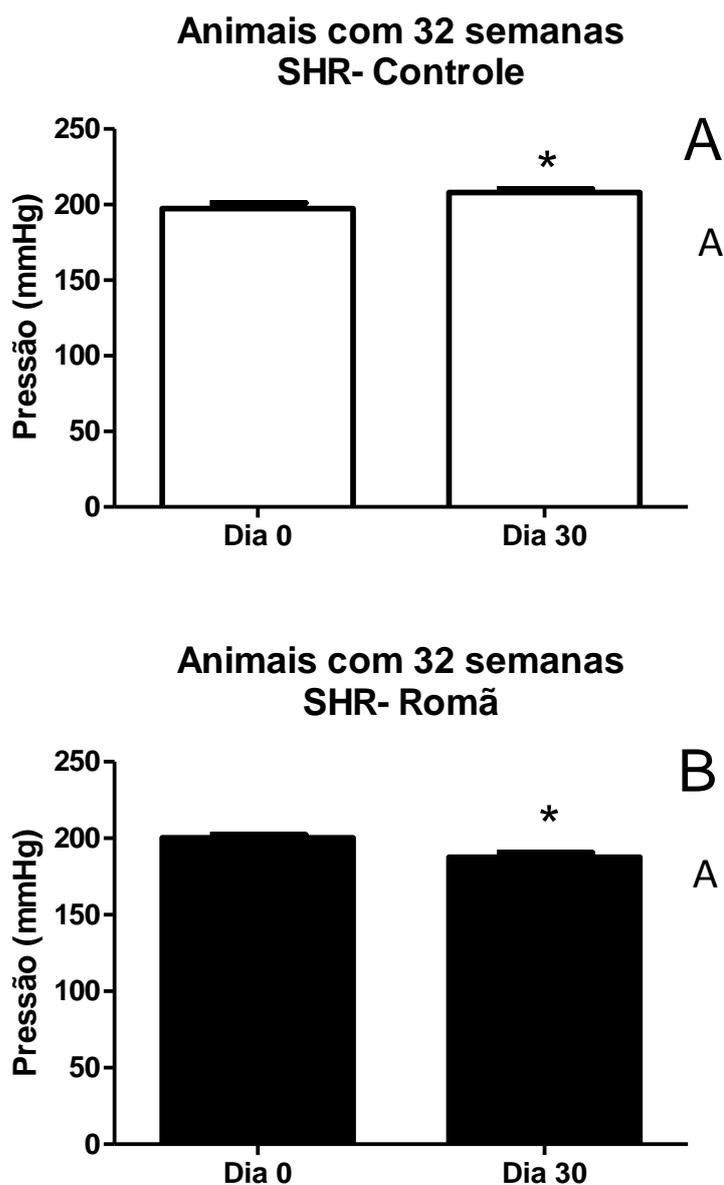


Figura 5: Valores da pressão arterial sistólica nos dias 0 (n=6) e 30 (n=6) obtidos em fêmeas espontaneamente hipertensas (SHR) com 32 semanas: A: grupo SHR-Controle B: grupo SHR-Romã. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

Na figura 6, observa-se os valores de pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle (208 ± 2 mmHg) e do grupo SHR-Romã (188 ± 3 mmHg) com 32 semanas, no dia 30 do tratamento. A pressão arterial sistólica apresentou-se significativamente menor nos animais tratados com romã.

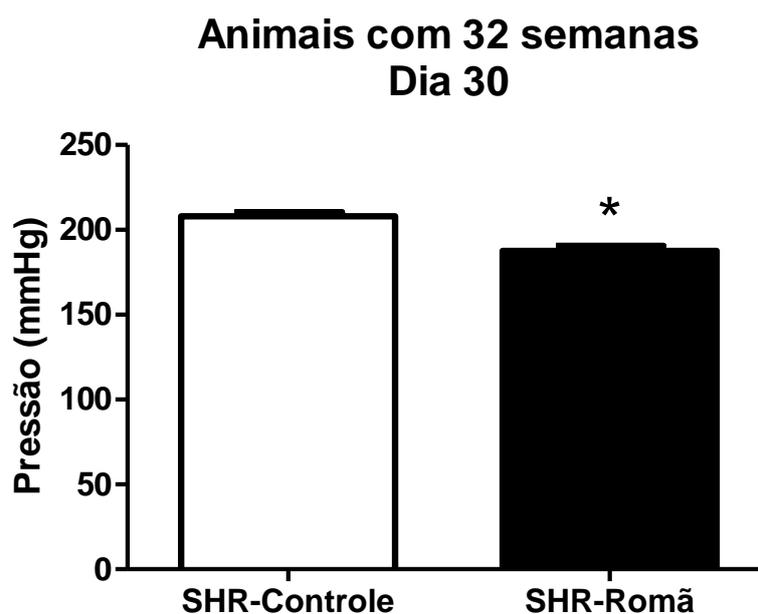


Figura 6: Valores da pressão arterial sistólica do grupo SHR-Controle (n=6) e do grupo SHR-Romã (n=6) em animais com 32 semanas aferidas no 30 dia de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

4.2 Medida da atividade da ECA Coronariana

Na figura 7, observa-se os valores da atividade da ECA coronariana no grupo SHR-Controle (209 ± 11 RFU/mg/ml) e no grupo SHR-Romã (79 ± 28 RFU/mg/ml) dos animais com 8 semanas, no dia 30 do tratamento. A atividade da ECA apresentou-se significativamente menor nos animais do grupo SHR-Romã.

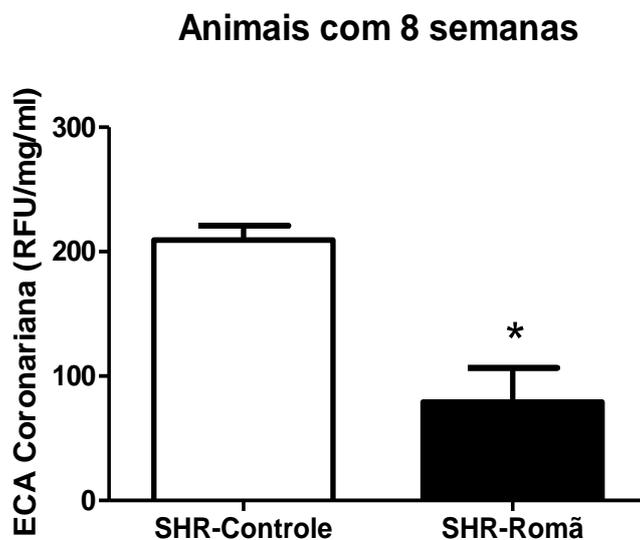


Figura 7: Animais com 8 semanas: Valores da atividade da ECA coronariana nos animais do grupo SHR-Control (n=4) e do grupo SHR-Romã (n=3) no dia 30 do tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

Na figura 8 observa-se os valores da atividade da ECA coronariana no grupo SHR-Control (232 \pm 19 RFU/mg/ml) e no grupo SHR-Romã (95 \pm 39 RFU/mg/ml) dos animais com 32 semanas, no dia 30 do tratamento. A atividade da ECA apresentou-se significativamente menor nos animais do grupo SHR-Romã.

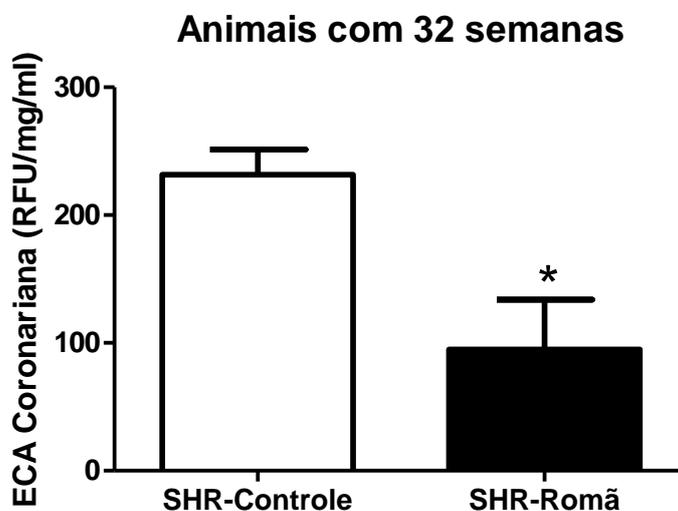


Figura 8: Animais com 32 semanas: Valores da atividade da ECA coronariana nos animais do grupo SHR-Control (n=3) e do grupo SHR-Romã (n=4) no dia 30 do tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

4.3 Medida da área vascular total

Na figura 9, observa-se que a área vascular total (AVt) dos animais do grupo SHR-Romã ($12407 \pm 478\mu\text{m}^2$) apresentou-se significativamente menor quando comparada com o grupo SHR-Controle ($21927 \pm 2117\mu\text{m}^2$). Entretanto, quando comparada com os animais do grupo Wistar-Controle ($12903 \pm 2298\mu\text{m}^2$), não se observa esta diferença. Logo, o tratamento com romã mostrou-se capaz de retomar a valores normais a AVt dos animais do grupo SHR-Romã.

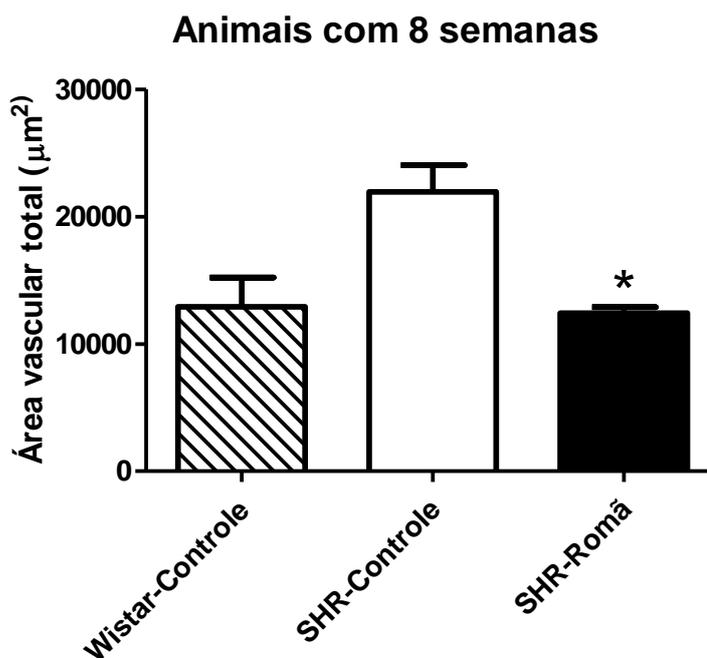


Figura 9: Animais com 8 semanas: Valores da área vascular total dos animais do grupo Wistar-Controle (n=6), SHR-Controle (n=6) e SHR-Romã (n=5) no dia 30 do tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado grupo SHR-Controle.

4.4. Medida da área de luz vascular

Na figura 10, observa-se os valores da área de luz vascular (ALv) dos animais do grupo Wistar-Controle ($6311 \pm 1375 \mu\text{m}^2$), do grupo SHR-Controle ($9735 \pm 1247 \mu\text{m}^2$) e do grupo SHR-Romã ($5740 \pm 428 \mu\text{m}^2$). Não há diferença na ALv entre os grupos.

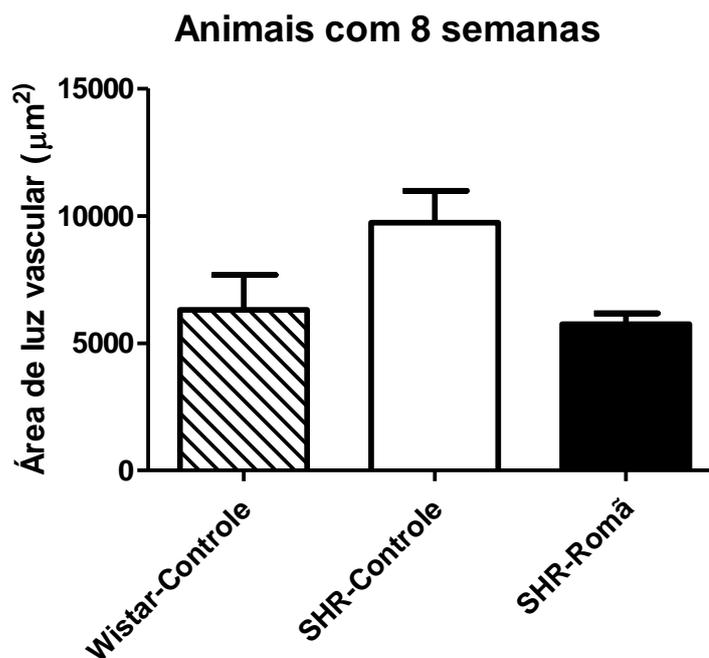


Figura 10: Animais com 8 semanas: Valores da área de luz vascular dos animais do grupo Wistar-Control (n=6), SHR-Control (n=6) e SHR-Romã (n=5) no dia 30 do tratamento. Os resultados foram expressos como média ± EPM. * p < 0,05 quando comparado grupo SHR-Control.

4.5 Medida da área de parede vascular

Na figura 11, observa-se que a área de parede vascular (APv) dos animais do grupo SHR-Romã ($6667 \pm 397 \mu\text{m}^2$) apresentou-se significativamente menor quando comparada com o grupo SHR-Control ($12192 \pm 1166 \mu\text{m}^2$). Entretanto, quando comparada com os animais do grupo Wistar-Control ($6592 \pm 997 \mu\text{m}^2$), não se observa esta diferença. Logo, o tratamento com romã mostrou-se capaz de retomar a valores normais a APv dos animais do grupo SHR-Romã.

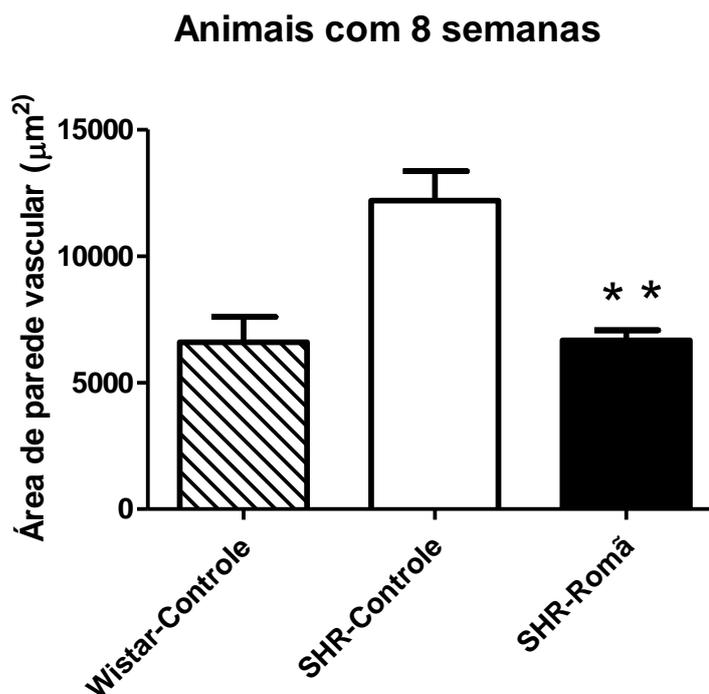


Figura 11: Animais com 8 semanas: Valores da área de parede vascular dos animais do grupo Wistar-Control (n=6), SHR-Control (n=6) e SHR-Romã (n=5) no dia 30 do tratamento. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ** p < 0,01 quando comparado grupo SHR-Control.

4.6 Razão de Remodelamento

A razão de remodelamento (RR) tem como referência a média da ATv dos animais Wistar-Control. Por isso, seu valor é considerado $1.0 \pm 0,05\%$, sendo este o padrão da normalidade. Lembrando-se que é considerado como remodelamento positivo quando $RR > 1.05$, ausência de remodelamento quando RR entre 0.95 e 1.05 e remodelamento negativo quando $RR < 0.95$.

Analisando a tabela 1, é possível observar a existência de um remodelamento positivo no grupo SHR-Control, uma vez que a média dos valores é superior a 1.05. Uma ausência de remodelamento ocorre no grupo SHR-Romã, uma vez que a média dos valores se enquadra no intervalo entre 0.95-1.05.

Tabela 1: Razão Remodelamento

Grupos (n)	RR
SHR-Controle (6)	1.69 ± 0.16
SHR-Romã (5)	0.96 ± 0.03

Dados Expressos em média±EPM

4.7 Medida de ânion superóxido

A geração de EROs foi determinada utilizando a dihidroetidina (DHE). A utilização de DHE permite avaliar o estresse oxidativo em determinado tecido, pois a mesma é oxidada a 2-hidroxi-etídio na presença de O_2^- , que se intercala ao DNA celular sob a forma de brometo de etídio, responsável pela emissão de fluorescência vermelha. Observa-se na figura 12A uma intensidade de fluorescência maior do que a observada na figura 12B, o que indica maior estresse oxidativo nos animais do grupo SHR-Controle. Esta análise qualitativa é confirmada pela figura 13, na qual nota-se que a determinação do estresse oxidativo através da análise quantitativa da fluorescência emitida, mostra ainda que os animais do grupo SHR-Romã apresentaram um estresse oxidativo significativamente menor ($1,2 \pm 0,1$ U.A.) do que aquele encontrado nos animais do grupo SHR-Controle ($3,2 \pm 0,4$ U.A.).

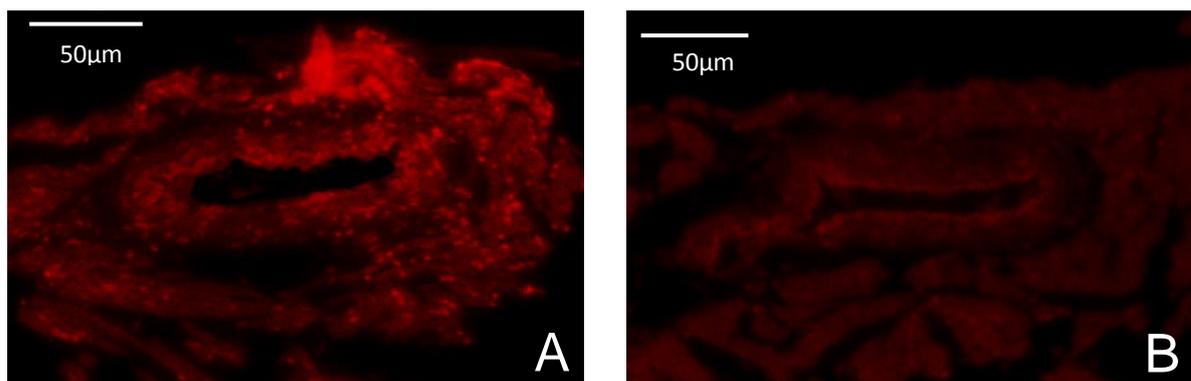


Figura 12: Animais com 8 semanas: Cortes transversais de coronária marcados com dihidroetidina. Os pontos com fluorescência vermelha indicam presença de estresse oxidativo. Figura A: Animal do grupo SHR-Controle. Figura B: Animal do grupo SHR-Romã. A barra preta possui 50 µm. Fotografia realizada com a objetiva de 40x.

Animais com 8 semanas

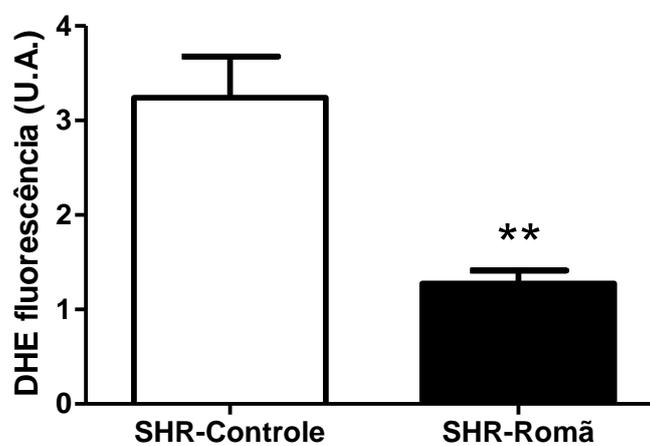


Figura 13: Animais com 8 semanas: Valores de unidades arbitrárias de fluorescência, indicando estresse oxidativo dos animais do grupo SHR-Controle (n=4) e SHR-Romã (n=4) no dia 30 do tratamento. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ** p < 0,01.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo evidenciam que o tratamento crônico com extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* foi capaz de diminuir a pressão arterial sistólica nos animais com 32 semanas, mas não foi capaz de prevenir o seu aumento nos animais com 8 semanas, apesar do efeito na redução da atividade da ECA coronariana ter sido observado em ambos os grupos. A análise das artérias coronárias nos permite concluir que o tratamento também foi capaz de promover uma redução no remodelamento vascular coronariano, bem como reduzir o estresse oxidativo nestas artérias dos animais com 8 semanas.

No presente estudo, o tratamento crônico com extrato de romã foi capaz de diminuir os níveis pressóricos apenas nos animais com 32 semanas, provavelmente devido à presença de um maior estresse oxidativo nestes animais sugerindo a relação entre idade, hipertensão e aumento na produção de EROs.

Um desbalanço entre a produção de EROs e mecanismos antioxidantes leva a um estresse oxidativo que está aumentado na hipertensão e com o avanço da idade (Hamilton et al., 2001). Um estudo recente, utilizando ratos velhos Wistar e SHR com 12-14 meses de idade, demonstrou ao analisar as aortas destes animais que, um aumento na produção de EROs ocorria em animais SHR em comparação com os normotensos. Utilizando inibidores do sistema NADPH oxidase, apocinina e DPI (*diphenyleneiodonium*), viu-se uma diminuição nos níveis dessas EROs. Neste trabalho também foi observado um aumento na atividade do sistema NADPH oxidase em homogenato de aorta em ratos SHR (Wind et al. 2010). Um estudo realizado por Hamilton et al. (2001) utilizando ratas SHR e Wistar, jovens, com 3-4 meses, e mais velhas, com 9-12 meses, mostrou que tanto a hipertensão quanto a idade estão relacionados com a diminuição da biodisponibilidade de NO e com o aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$. Outro estudo recente, utilizando ratos Wistar jovens, 1- 3 meses, e mais velhos, 20-24 meses, mostrou uma correlação entre animais mais velhos e um aumento da formação de eNOS desacoplada com consequente aumento no estresse oxidativo (Rajapakse et al., 2011).

Um aumento na produção de EROs pode levar a um aumento da pressão arterial sistólica por um efeito direto vasoconstritor das EROs, ou indiretamente reduzindo a biodisponibilidade de vasodilatadores como o NO (Reckelhoff & Romero, 2003). Como o estresse oxidativo parece estar aumentado não somente

com a hipertensão, mas também com a idade (Wind *et al.*, 2010), um maior estresse oxidativo pode ter ocorrido nos animais com 32 semanas comparados com os animais com 8 semanas. Deste modo, a administração de um antioxidante, em animais, cujos vasos possuem maior disfunção endotelial, ou seja, menor biodisponibilidade de NO, pode ter ocasionado maior variação na quantidade de NO, fato este que pode ter sido suficiente para diminuir os níveis pressóricos nestes animais. Além disso, como as EROs contribuem para a contração dependente de endotélio e aumentam a resistência vascular, os antioxidantes podem ter possivelmente restaurado a função endotelial e deste modo diminuído a pressão arterial sistólica (Kitiyakara & Wilcox, 1998).

Um maior estresse oxidativo implica em menor biodisponibilidade de NO, o que contribui com a disfunção endotelial (Wind *et al.*, 2010). Além disso, as EROs podem estimular inúmeros mecanismos intracelulares que podem acarretar modificações na estrutura das células, além de reagirem com outras moléculas modificando-as, causando assim efeitos extremamente deletérios. Inúmeras doenças, como a hipertensão e aterosclerose, estão associadas a estas desordens, que estão relacionadas a um comprometimento do relaxamento dependente de endotélio, um aumento da atividade plaquetária, adesão leucocitária e proliferação do músculo liso vascular (Ross, 1999). Interferências que possam ser capazes de diminuir o estresse oxidativo estabelecido nestas doenças podem ser uma alternativa para uma melhora da função vascular.

Informações podem ser encontradas em literatura a respeito das propriedades antioxidantes de frutas, chás, vinhos, grãos e vitaminas (Ghosh & Scheepens, 2009). A romã, em particular, parece exercer seus efeitos antioxidantes devido ao seu alto conteúdo polifenólico que inclui os taninos, antocianinas e flavonóides (Gil *et al.*, 2000). A presença de grupos fenólicos nestas moléculas conferem a elas características antioxidantes. Além disso, a ressonância dos anéis tornam essas moléculas bastante estáveis (Fraga, 2007). Vários estudos à respeito das propriedades antioxidantes da romã podem ser encontrados em literatura (Aviram *et al.*, 2000; Aviram *et al.*, 2004; Althunibat *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2000) mas poucos podem ser encontrados sendo realizados em animais SHR e com administração do extrato hidroalcoólico da casca da fruta. Nossos dados em coronária de ratos são inéditos, e mostram que o tratamento crônico com extrato de romã foi capaz de

diminuir o estresse oxidativo nas mesmas dos animais com 8 semanas neste modelo experimental. Esta avaliação realizada por meio da marcação dos cortes das coronárias com dihidroetidina (DHE), mostrou que a expressão de $O_2^{\cdot -}$ foi menor nas artérias dos animais tratados quando comparados com os animais controle, como pode ser observado pela fluorescência emitida em vermelho na fotomicrografia (Figura 12). Estes dados corroboram os encontrados por Aviram *et al.* (2000), mostrando que o consumo do suco de romã por 2 semanas em humanos diminui o índice de peroxidação lipídica plasmático bem como aumento do status antioxidante do mesmo. Neste mesmo estudo, a suplementação com suco de romã em camundongos apo E -/- resultou em uma diminuição da peroxidação lipídica quando comparados com o grupo controle. Um estudo recente realizado por Mohan *et al.* (2010) demonstrou que o tratamento com suco de romã por 4 semanas em ratos diabéticos e hipertensos/diabéticos aumentou os níveis de SOD, CAT e glutathiona reduzida (GSH) e diminuiu o índice de peroxidação lipídica no rim e no pâncreas desses animais.

Verificamos ainda neste trabalho que além de reduzir o estresse oxidativo, o tratamento com romã diminuiu a atividade da ECA coronariana tanto nos grupos com 8 semanas quanto no grupo com 32 semanas. A ECA é uma zinco metalopeptidase que contém dois sítios ativos conhecidos como domínio N e C, que se referem, respectivamente, as porções N- e C- terminais da molécula da enzima. Cada sítio ativo contém um átomo de zinco que é indispensável à sua função catalítica. O domínio C da enzima hidrolisa a angiotensina I com eficiências catalíticas maiores do que o domínio N, quanto a bradicinina, ambos os sítios catalíticos possuem eficiências semelhantes (Wei *et al.*, 1991; Georgiadis *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2002).

Os componentes do SRAA podem ser encontrados tanto na circulação quanto em tecidos, como coração, vasos sanguíneos, rim, glândulas e cérebro. A existência desse sistema em tecidos é responsável pelos seus efeitos tanto parácrinos quanto autócrinos (Weber *et al.*, 1992). Os inibidores da ECA são classificados de acordo com o grupo químico que possui afinidade pelo zinco nos sítios ativos da ECA, podendo ser sulfidril, carboxila e fosforila. A potência de um inibidor da ECA é determinada pela força de sua ligação com o átomo de zinco (Comini *et al.*, 2007).

A inibição da ECA observada no presente trabalho pode ter ocorrido devido ao fato dos polifenóis possuírem uma estrutura química que além de favorecer propriedades *scavengers*, é também responsável pela ação de quelar metais redox ativos (Fraga, 2007). Desta forma, como os inibidores da ECA, os polifenóis podem ter exercido os seus efeitos quelando o metal zinco presente na molécula da ECA, inibindo sua ação catalítica, o que favoreceu a diminuição da atividade da enzima.

Condizente com nossos achados, em estudo recente mostrou que a administração por quatro semanas do suco de romã em ratos diabéticos e hipertensos levou a uma diminuição na atividade da ECA plasmática destes animais quando comparados com seu controle, de forma dose dependente. Além disso, uma diminuição da pressão arterial sistólica foi acompanhada de menor vasoconstrição em resposta a drogas vasoconstritoras (Mohan *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Aviram & Dornfeld (2001) em humanos, foi observado que o consumo de suco de romã por pacientes hipertensos, por 2 semanas, foi capaz de reduzir os níveis da atividade da ECA no soro destes pacientes. Esta redução foi atribuída pelos autores à capacidade antioxidante da romã e/ou uma interação direta de seus constituintes com a enzima. Além disso, é descrito neste trabalho uma diminuição da pressão sistólica destes pacientes, mas os autores não atribuíram esta diminuição à redução na atividade da ECA circulante, e sim a uma melhora na função endotelial.

Apesar da diminuição da atividade da ECA não ter exercido efeitos hipotensores, uma vez que uma diminuição da pressão arterial foi observada apenas nos animais com 32 semanas, esta inibição pode ter exercido efeitos benéficos sobre a proliferação das células musculares lisas. Os dados deste trabalho mostram a presença de um aumento da área vascular total dos animais do grupo SHR-Control, acompanhada de um aumento da espessura da parede sem diferença na luz vascular. Além disso, tratamento com romã retomou os níveis normais tanto a área vascular total coronariana quanto a espessura de parede, uma vez que ao compararmos os valores dos animais SHR-Romã com os valores dos animais normotensos Wistar-Control, não observamos diferença estatística. Observamos também a presença de remodelamento vascular positivo apenas nos animais do grupo SHR-Control, que foi calculado por meio da razão de remodelamento, que é realizada pela diferença entre a área vascular total dos animais SHR-Control e

SHR-Romã, pela área vascular total dos animais Wistar-Controle. Sendo essa comparação feita com animais Wistar-Controle, ou seja, animais normotensos, essa razão nos fornece um parâmetro de normalidade. Valores acima de 1.05 denotam um remodelamento positivo, como o encontrado nos animais SHR-Controle, valores entre 0.95 e 1.05 denotam ausência de remodelamento, que condiz com o valor encontrado no grupo SHR-Romã. Nossos dados corroboram os observados por Schiffrin (2001), que indicam uma relação entre hipertensão e remodelamento.

A hipertensão essencial é associada ao aumento da resistência vascular periférica ao fluxo sanguíneo (Lund-Johanson, 1983). Artérias de resistência são vasos, quando relaxados, com diâmetro menor do que 400 μm , e constituem o local de maior geração de resistência vascular (Schiffrin, 1992). Estes vasos incluem pequenas artérias, com lúmen maior do que aproximadamente 100 μm e as arteríolas, com lúmen menor do que 100 μm . Estes possuem um papel importante na patogênese da hipertensão e suas consequências (Bohlen, 1986; Schiffrin, 1992). Durante a hipertensão, as artérias de resistência exibem um lúmen e diâmetro externo menores e uma camada média que pode apresentar-se normal ou mais espessa, com um aumento na relação parede/luz, que é a razão entre a área de parede vascular pela área da luz vascular. Uma hipertrofia ou hiperplasia das células musculares lisas do vaso pode ser encontrada dependendo da espécie, do leito vascular ou da severidade da doença. Este remodelamento vascular está envolvido nas complicações clínicas da hipertensão, como derrame, nefroangiosclerose e infarto do miocárdio (Schiffrin, 2001). A parede vascular está continuamente exposta a forças hemodinâmicas como pressão luminal e *shear stress*. Alterações nessas forças, tanto fisiológicas quanto patológicas, levam a alterações funcionais e/ou estruturais da parede dos vasos. Modificações agudas nas forças hemodinâmicas podem modificar o diâmetro do vaso enquanto modificações crônicas resultam em alterações na parede dos vasos, que podem ser identificadas por meio do diâmetro da parede e seu espessamento. Além disso, essas modificações não são advindas somente de alterações hemodinâmicas, mas também de respostas inflamatórias e modificações nos componentes da matriz extracelular (Hacking *et al.*, 1996; Pasterkamp *et al.*, 2004).

Na hipertensão, modificações na estrutura de artérias de resistência envolvem dois processos, um denominado remodelamento eutrófico e outro remodelamento

hipertrófico (Mulvany *et al.*, 1996). O processo de remodelamento envolve um sinergismo entre apoptose, com perda celular, e inflamação, responsável pela proliferação celular (Intengan & Schiffrin, 2001). Estudos sugerem que em pequenas artérias de ratos jovens SHR há uma reduzida apoptose das células da musculatura vascular lisa, o que pode contribuir para o crescimento destas neste modelo experimental (Dickhout & Lee, 1999). A angiotensina II parece ter um papel fundamental na contribuição da inflamação encontrada na hipertensão. As ações da angiotensina II são mediadas, em grande parte, pelo aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$, principalmente via sistema NADPH oxidase (Grienling & Ushio-Fukai, 2000). Um trabalho recente de Murdoch *et al.* (2011) mostrou, em camundongos transgênicos com superexpressão de uma das subunidades do sistema NADPH oxidase (NOX 2) e hipertensão induzida por infusão de Angiotensina II, um remodelamento vascular causado pela angiotensina II. Outro estudo envolvendo camundongos que sofreram infusão de angiotensina II mostrou que a inibição do sistema NADPH oxidase com apocinina, reduziu a elevação pressão arterial sistólica e preveniu alterações estruturais dos vasos, disfunção endotelial e deposição de colágeno na camada média das artérias mesentéricas destes animais, indicando que as alterações fisiopatológicas encontradas neste modelo experimental ocasionadas pela infusão de angiotensina II poderiam estar sendo mediadas pelo sistema NADPH oxidase (Heeneman *et al.*, 2007).

Desta forma, não surpreendentemente, a inibição da angiotensina II tem sido relacionada com a diminuição do remodelamento vascular em modelos experimentais animais, como observado em um estudo de Giummelly *et al.* (1999). Na prática clínica, pacientes com hipertensão essencial são rotineiramente tratados com bloqueadores de canal de cálcio, diuréticos e inibidores da ECA. Muitos destes agentes terapêuticos são capazes, pelo menos em parte, de corrigir o remodelamento encontrado nas artérias de resistência destes pacientes, principalmente os inibidores da ECA (Schiffrin, 2004). A literatura relaciona remodelamento vascular com angiotensina II, bem como inibição da ECA com a diminuição da disfunção vascular e remodelamento. Estes efeitos da angiotensina II parecem ser, pelo menos em parte, advindos de um estímulo do sistema NADPH oxidase, que aumentando a produção de EROs contribui significativamente para os processos envolvidos no remodelamento.

Como descrito anteriormente, as artérias de resistência podem sofrer modificações morfológicas em resposta aos danos ocasionados pela hipertensão, como o aumento do estresse oxidativo. No presente estudo, utilizamos as coronárias como exemplar deste modelo de artéria de resistência, na qual observamos um aumento no estresse oxidativo no grupo SHR-Controlado que foi atenuado como observado no grupo SHR-Romã.

Possivelmente dados do presente estudo corroboram com Touyz *et al.* (2003), que mostram que as EROs agem como segundos mensageiros em resposta à angiotensina II, levando ao remodelamento vascular. O excesso de EROs dentro das células modificam a atividade de tirosinas quinases e metaloproteínas, além de inibirem a atividade de tirosinas fosfatases, contribuindo para a ativação das tirosinas quinases. As EROs podem também afetar a expressão de genes e proteínas, ativando fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que pode então induzir a expressão de proteínas que participam da resposta inflamatória (Abe & Berk, 1998; Ushio-Fukai *et al.*, 1996). Este processo inflamatório ocorre com aumento da codificação de citocinas e de moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, da contração da musculatura lisa vascular, crescimento das células musculares lisas da parede vascular através do estímulo de fatores de crescimento, migração de leucócitos e aumento da deposição de matriz extracelular (Touyz & Schiffrin, 1999; Ushio-Fukai *et al.*, 1996).

A ativação dessas vias redox sensíveis resulta em inúmeras respostas celulares, que, se não controladas podem contribuir para os danos causados pela hipertensão (Abe & Berk, 1998; Touyz & Schiffrin, 1999; Ushio-Fukai *et al.*, 1996). No presente trabalho, o consumo de romã foi capaz de diminuir o remodelamento vascular, possivelmente pela diminuição do estresse oxidativo, que pode ter ocorrido por uma ação direta dos polifenóis devido às propriedades de *scavengers*, ou por um efeito indireto devido à inibição da ECA, que pode ter reduzido também a produção de EROs contribuindo para uma diminuição no remodelamento vascular.

A hipertensão é uma condição crônica relacionada a várias complicações cardiovasculares, uma vez que níveis pressóricos sustentados podem ser lesivos aos tecidos. O tratamento crônico com extrato bruto da casca da romã se mostrou capaz de corrigir alguns destes parâmetros, em modelo experimental, como o remodelamento vascular e o estresse oxidativo, bem como a atividade aumentada

da ECA coronariana. Mais estudos são necessários para confirmar os efeitos benéficos dos antioxidantes no sistema cardiovascular, mas o presente estudo sugere que o consumo do extrato bruto da casca da romã pode oferecer proteção contra os danos causados pela hipertensão em modelo SHR.

CONCLUSÃO

6 Conclusão

O presente trabalho nos permite concluir que o tratamento crônico com extrato de romã foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica dos animais com 32 semanas, apesar de não ter exercido os mesmos efeitos nos animais mais jovens. O tratamento também foi eficaz na redução na atividade da ECA coronariana tanto nos animais jovens quanto nos mais velhos. Um remodelamento hipertrófico foi observado nos animais tratados com veículo, e o tratamento com romã foi capaz de evitar o remodelamento com diminuição de área de parede vascular. O extrato de romã também apresentou propriedades antioxidantes, uma vez que os animais tratados com romã apresentaram um menor estresse oxidativo quando comparados com os animais tratados com veículo. Desde modo, o tratamento com romã pode ser uma alternativa para diminuir os efeitos deletérios causados por níveis pressóricos elevados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abe J and Berk BC (1998). Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 8:59-64.

Althunibat OY, Al-Mustafa AH, Tarawneh K, Khleifat KM, Ridzwan BH & Qaralleh HN (2010). Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats. 45(4): 581–585.

Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N , Presse D, Attias J, Liker J & Hayek T (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*. 23:423-33.

Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, Coleman R, Gaitini D, Nitecki S, Hofman A, Rosenblat M , Volkova N, Presser D ,Attias J, Hayek T & Fuhrman B (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit LDL oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*. 28:49-62.

Aviram M & Dornfeld L (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 158:195-8.

Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D & Fuhrman B (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative

stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition*.71:1062-76.

Bader M & Ganten D (2008). Update on tissue renin-angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine*. 86:615-621.

Baldo MP, Forechi L, Morra EAS, Zaniqueli D, Machado RC, Lunz W, Rodrigues SL & Mill JG (2011). Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: Effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. *Pharmacological Reports*. 63: 975-82.

Banerjee SK & Maulik SK (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders: A review. *Nutrition Journal*. 1:1–14.

Becari C, Oliveira EB & Salgado MCO (2011). Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44:914-19.

Bedard K & Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 87:245-313.

Berk BC (2001). Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiological Reviews*.81(3):999-1030.

Bohlen HG (1986). Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension*. 8(3):181-3.

Brash AR (1999).Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 274(34):23679-82.

Brasileiro BG, Pizziolo VR, Matos DS, Germano AM & Jamal CM (2008). Plantas Medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 44(4).

Bredt DS & Snyder SH (1990).Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:682-5.

Carmona AK, Schwager SL, Juliano MA, Juliano L & Sturrock ED (2006).A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay.*Nature*. 1(4):1971-6.

Carretero AO & Oparil S (2000). Essential hypertension. Part 1: definition and etiology. *Circulation Research*.101:329-35.

Carvalho ACB, Diniz MFFM & Mukherjee R (2005). Estudos da atividade antibiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes. *Revista Brasileira de Farmacologia*. 86:11-16.

Cheng A & Frishman WH (1998).Use of angiotensin-converting enzyme inhibitors as monotherapy and in combination with diuretics and calcium channel blockers.*Journal of clinical pharmacology*. 38:477-91.

Chidambara Murty KN, Jayaprakasha GK & Singh RP (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 14;50(17):4791-5.

Comini L, Bachetti T, Cargnoni A, Bastianon D, Gitti GL, Ceconi C & Ferrari R (2007). Therapeutic modulation of the nitric oxide: all ace inhibitors are not equivalent. *Pharmacological Research*. 56:42-8.

Curnutte JT & Babior B M (1987). Chronic granulomatous disease. *Advances in Human Genetics*. 16:229-97.

Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger MS, Bell M, McGuire DK, Provost JC, Liker H & Aviram M (2009). Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *American Journal of Cardiology*. 104(7):936-42.

Dickhout JG & Lee RMKW (1999). Apoptosis in the muscular arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 17:1413-19.

Dilip G & Arjan S (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53: 322 -31

Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/saude>. Acessado em: 03 de Janeiro de 2012 às 16:06.

Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A & Tamargo J (2001). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*. 133:117-24.

Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B & Vita JA (2001). Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation Research*. 104:151-6.

Dzau VJ (1988). Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation Research*. 77(2):114-13.

Dzau VJ (1998). Mechanism of protective effects of ACE inhibition on coronary artery disease. *European Heart Journal*. 19:2-6.

Eichemberg MT, Amorozo MCM & Moura LC (2009). Species composition and plant use in old urban homegardens in Rio Claro, Southeast of Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 23(4).

Feigl EO (1983). Coronary physiology. *Physiological Reviews*. 63:1-205.

Félétou M & Vanhoutte PM (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 291:985-1002.

Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M & Murad F (1991). Calmodulin dependent endothelium-derived releasing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particular and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:1788-92.

Fraga CG (2007). Plant Polyphenols: How to Translate their in vitro Antioxidant Actions to in vivo Conditions. *IUBMB Life*. 59(4-5):308-15.

Funck RC, Wilke A, Rupp H & Brilla CG (1997). Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 432:35-44.

Furchgott RF & Zawadzki JV (1980).The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288:373-6.

Georgiadis D, Beau F, Czarny B, Cotton J, Yiotakis A & Dive V (2003). Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin.*Circulation Research*. 93:148-54.

Ghosh D & Scheepens A (2009).Vascular action of polyphenols.*Molecular Nutrition & Food Research*.53:322 -31.

Gil MI, Tomas-Barberan F, Hess-Pierce B, Holcroft DM & Kader AA (2000).Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*.48:4581-9.

Giummelly P, Lartaud-Idjouadiene I, Marque V, Niederhoffer N, Chillon JM, Capdeville-Atkinson C & Atkinson J (1999). Effects of Aging and Antihypertensive Treatment on Aortic Internal Diameter in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 34: 207-11.

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R & Kolettis GJ (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *New England Journal of Medicine*. 316:1371-5.

Griendling KK, Minieri C A , Ollerenshaw J D & Alexander R W (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*.74:1141-8.

Griendling KK & Ushio-Fukai M (2000).Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling.*Regulatory Peptides*. 91(1-3):21-7.

Griendling KK, Lassègue B & Alexander RW (1996). Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 36:281-306.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD & Alexander RW (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured smooth muscle cells. *Circulation Research*. 74:1141-8.

Griendling KK, Sorescu D & Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*. 86:494–501.

Hacking WJ, VanBavel E & Spaan JA (1996). Shear stress is not sufficient to control growth of vascular networks: a model study. *American Journal of Physiology*. 270:364-75.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D & Dominiczak AF (2001). Superoxide Excess in Hypertension and Aging: A Common Cause of Endothelial Dysfunction. *Hypertension*. 37:529-34.

Harrison DG (1997). Endothelial function and oxidant stress. *Clinical Cardiology*. 20(2):11–17.

Heeneman S, Sluimer JC & Daemen MJAP (2007). Angiotensin-Converting Enzyme and Vascular Remodeling. *Circulation Research*. 101:441-54.

Heintz A, Damm M, Brand M, Koch T & Deussen A (2008). Coronary flow regulation in mouse heart during hypercapnic acidosis: role of NO and its compensation during eNOS impairment. *Cardiovascular Research*. 77:188-96.

Henning EC, Warach C & Spatz M (2011). Hypertension-induced vascular remodeling contributes to reduced cerebral perfusion and the development of spontaneous stroke in aged SHRSP rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 30, 827–836

Hertog MG, van Poppel G & Verhoeven D (1997). Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables. *Phytochemistry of fruit and vegetables*. 313-29.

Intengan HD & Schiffrin EL (2001). Vascular Remodeling in Hypertension: Roles of Apoptosis, Inflammation, and Fibrosis. *Hypertension*. 38:581-7.

Issa AT, Miyata K, Heng V, Mitchell KD & Derbenev AV (2012). Increased neuronal activity in the OVLT of Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with inducible Ang II-dependent malignant hypertension. *Neuroscience Letters*. 519:26-30.

Jadeja RN, Thounaojam MC, Patel DK, Devkar RV & Ramachandran AV (2010). Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice Supplementation Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Necrosis in Rats. *Cardiovascular Toxicology*. 10:174-80.

Janiszewski M, Pasqualucci CA, Souza LC, Pileggi F, da Luz PL & Laurindo FR (1998). Oxidized thiols markedly amplify the vascular response to balloon injury in rabbits through a redox active metal-dependent pathway. *Cardiovascular Research*. 39:327-38.

Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner GF & Rodrigues-Itube B (2002). Subtle acquired renal injury as mechanism of salt-sensitive hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 346:913-23.

Johnston CI (1992). Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *Journal of Hypertension*. 10(7):13-26.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.

Jurenka J (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review*. 13(2):128-44.

Kelm M & Schrader J (1990). Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circulation Research*. 66:1561-75.

Kitiyakara C & Wilcox CS (1998). Antioxidants for hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 7: 531-8.

KK Griendling, TJ Murphy & RW Alexander (1993). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*. 87:1816-28.

Kostis JB (1998). Angiotensin converting enzyme inhibitors. *American Heart Journal*. 6:1580-8.

Lawes CMM, Hoorn SV & Rodger A (2008). Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *The Lancet*. 371:1513-18.

Li H & Förstermann U (2009). Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Current. Pharmaceutical Design*. 15:3133-45.

Li H, Wallerath T & Fostermann U (2002). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 7:132-47.

Liu Y & Gutterman DD (2009). Vascular control in humans: focus on the coronary microcirculation. *Basic Research in Cardiology*. 104:211-27.

Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D & Haller H (1999). Hypertension-induced end-organ damage: a new transgenic approach to an old problem. *Hypertension*. 33:212-18.

Lund-Johanson P (1983). Haemodynamics in early essential hypertension: still an area of controversy. *Journal of Hypertension*. 1:209-13.

Mochha A & Mustafa MR (2005). Chronic Treatment with Flavonoids Prevents Endothelial Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rat Aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 46:36-40.

Malta DC, Moura L, Souza FM, Rocha FM & Fernandes FM (2009). Doenças crônicas não transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006. *In: Saude Brasil 2008 Ministério as Saúde, Brasília*. 337-62.

Maraschin M & Verpoorte R (1999). Engenharia do Metabolismo Secundário. *Biotecnologia e Ciência Aplicada*. 10:24-8.

Martinez R & Torres_R (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 66(2):213-22.

Matsubara T & Ziff M (1986). Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *Journal of Immunology*.137:3295-8.

Matsusaka T, Niimura F, Shimizu A, Pastan I, Saito A, Kobori H, Nishiyama A & Ichikawa I (2012). Liver Angiotensinogen Is the Primary Source of Renal Angiotensin II. *Journal of the American Society of Nephrology*. 23(7):1181-9.

Meier B, Radeke H H, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K & Habermehl GG (1989). Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochemical Journal*.263: 539-45.

Mohan M, Waghulde H & Kasture S (2009). Effect of pomegranate juice on Angiotensin II-induced hypertension in diabetic Wistar rats. *Phytotherapy Research*. 24:196-203.

Moncada S, Palmer RMJ & Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological.Reviews*. 43:109-42.

Muller JM, Davis MJ & Chilian WM (1996). Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microCirculation Research. *Cardiovascular Research*. 32:668-78.

Mulvany MJ (2002). Small Artery Remodeling and Significance in the Development of Hypertension. *News in Physiological Sciences*. 17:105-9.

Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL & Heistad DD (1996). Vascular remodeling. *Hypertension*. 28:505-6.

Murdoch CE, Alom-Ruiz SP, Wang M, Zhang M, Walker S, Yu B, Brewer A & Shah AM (2011). Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction. *Basic Research in Cardiology*.106: 527-38.

Napoli C & Ignarro LJ (2001).Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 5:88-97.

Nigris F de, Williams-Ignarro S, Botti C, Sica, V, Ignarro LJ & Napoli C (2006). Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. *Nitric Oxide*. 15:259-63.

Oparil S, Zaman A & Calhoun DA (2003). Pathogenesis of Hypertension.*Annals of Internal Medicine*.139:761-76.

Passos VMA, Assis TD & Barreto SM (2006). Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 15(1):35-45.

Pasterkamp G, Borst C, Gussenhoven EJ, Mali W, Post MJ, The S, Reekers JA & van den Berg FG (1995). Remodeling of the novo atherosclerotic lesions in femoral arteries: impact on mechanism of balloon angioplasty.*Journal of the American College of Cardiology*. 26:422-8.

Pasterkamp G, Galis ZS & de Kleijn DP (2004). Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 24:650-7.

Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF & Michel JB (2000). Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear

factor-kB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.20:645-51.

Radeke HH, Cross AR, Hancock JT, Jones OTG, Nakamura M, Kaever V & Resch K (1991). Functional expression of NADPH oxidase components (alpha- and beta-subunits of cytochrome b558 and 45-kDa flavoprotein) by intrinsic human glomerular mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry*.266:21025-9.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK & Harrison DG (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor function. *Journal of Clinical Investigation*.97:1916 -23.

Rajapakse AG , Yepuri G, Carvas JM, Stein S, Matter CM, Scerri I, Ruffieux J, Montani JP, Ming XF & Yang Z (2011). Hyperactive S6K1 Mediates Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Aging: Inhibition by Resveratrol. *PLoS One*.6(4):e19237.

Rao GN & Berk BC (1992). Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation Research*. 18:775-94.

Rates SMK (2001). Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 11(2):57-69.

Reaven PD, Napoli C, Merat S & Witztum JL (1999), Lipoprotein modification and atherosclerosis in aging. *Experimental Gerontology*. 34:527-37.

Reckelhoff JF & Romero JC (2003). Role of oxidative stress in angiotensin induced hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 284: 893-912.

Romero JC & Reckelhoff JF (1999). State-of-the-art lecture: role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*.34:943-9.

Ross R (1993). A pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 362:801-9.

Ross R (1999). Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 340:115-26.

Rothe G & Valet G (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*.47:440-8.

Schiffrin EL (1992). Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. *Hypertension*. 19(2):1-9

Schiffrin EL (2001). Effects of antihypertensive drugs on vascular remodeling: do they predict outcome in response to antihypertensive therapy. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 10:617-24.

Schiffrin EL (2004). Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *American Journal of Hypertension*.17:1192-200.

Schoenhagen P, Ziada KM, Kapadia SR, Crowe TD, Nissen SE & Tuzcu EM (2000). Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes. An intravascular ultrasound study. *Circulation Research*. 101:598-603.

Siwik DA, Pagano PJ & Colucci WS (2001). Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*.280(1):53-60.

Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S & Folts JD (1999). Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation Research*. 100:1050-5.

Strawn WB, Dean RH & Ferrario CM (2000). Novel mechanisms linking angiotensin II and early atherogenesis. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*.1:11-17.

Sundaresan M, Yu XZ, Victor JF, Irani K & Finkel T (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 270:297-9.

Taddei S, ViridisA, Mattei P & Salvetti A (1993). Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*. 21:929-33.

Toda N & Okamura T (2003). The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacological Reviews*. 55:271-324.

Toda N & Toda H (2011). Coronary hemodynamic regulation by nitric oxide in experimental animals: recent advances. *European Journal of Pharmacology*. 667:41-9.

Touyz RM and Schiffrin EL (1999). Ang II-stimulated generation of reactive oxygen species in human vascular smooth muscle cells is mediated via PLD-dependent pathways. *Hypertension*. 34:976-82.

Touyz RM & Schiffrin EL (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*.122(4):339-52.

Touyz RM, Tabet F & Schiffrin EL (2003).Redox-dependent signaling by angiotensin II and vascular remodeling in hypertension.*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 30(11):860-6.

Tune JD, Gorman MW & Feigl EO (2004). Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *Journal of Applied Physiology*. 97:404-15.

Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N and Griending KK (1996). p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 271:23317-21.

Usui M, Egashira K, Tomita H, Koyanagi M, Katoh M, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Matsushima K & Takeshita A (2000). Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation Research*. 101:305-10.

Vaughan DE (2000). AT₁ receptor blockade, and atherosclerosis, hopeful insights into vascular protection.*Circulation Research*.101:1496-7.

Veeramani C, Al-Numair KS, Chandramohan G, Alsaif MA & Pugalendi KV (2012). Antihyperlipidemic effect of *Melothria maderaspatana* leaf extracts on DOCA-salt induced hypertensive rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5(6): 434-439.

Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC & Borst C (2000). Arterial Remodeling : Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation Research*. 102:1186-91.

Weber MA, Neutel JM & Smith DH (1992). Circulatory and extracirculatory effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *American Heart Journal*. 123(5):1414-20.

Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P & Clauser E (1991). The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *Journal of Biological Chemistry*. 266:9002-8.

Westerhof N, Boer C, Lamberts RR & Sipkema P (2006). Cross-talk between cardiac muscle and coronary vasculature. *Physiological Reviews*. 86:1263-1308.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney Jr JF & Vita JA (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 42:1149-60.

Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Kumar ATAHS, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler K & Harald Schmidt HHHW (2010). Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Aortas of Aged Spontaneously Hypertensive Rats by NOX1/2 Is Reversed by NADPH Oxidase Inhibition. *Hypertension*. 56:490-7.

Wong WT, Wong SL, Tian XY & Huang Y. (2010). Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 151(2):183-5.

Yang Z, Shen W & Zhang D (2003). Relationship between coronary arterial remodeling and clinical presentation. *Chinese Medicine*. 116(2):263-6.

Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC & Díez J (2000). Vascular NADH/NADPH Oxidase Is Involved in Enhanced Superoxide Production in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 35:1055-61.

Zhang X, Zhao SP, Li XP & Zhou QC (2000). Endothelium-dependent and-independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 149:19-24.

Anexo I - Premiação

Prêmio Jovem Investigador (Pós graduandos):Menção Honrosa

Apresentação Oral:

Dellacqua LO, Trindade J, Mauad H, Paula TD, Moyses MR

“Efeitos do Tratamento com Romã (*Punica granatum*) em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)” In: V Congresso de Ciências da Saúde da EMESCAM, 2011, Vitória – ES.