

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

NATHALIE TRISTÃO BANHOS DELGADO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E ANTIOXIDANTES
DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE ROMÃ (*Punica granatum*) EM
RATAS HIPERTENSAS**

**VITÓRIA
2014**

NATHALIE TRISTÃO BANHOS DELGADO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E ANTIOXIDANTES
DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE ROMÃ (*Punica granatum*) EM
RATAS HIPERTENSAS**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Margareth Ribeiro Moysés

**VITÓRIA
2014**

EFEITOS CARDIOVASCULARES E ANTIOXIDANTES DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE ROMÃ (*Punica granatum*) EM RATAS HIPERTENSAS

NATHALIE TRISTÃO BANHOS DELGADO

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

Aprovada em 15 de dezembro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo – UFRS

Prof. Dr. Leonardo dos Santos - UFES

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

DEDICO ESTE TRABALHO

Em especial a minha filha Sara, ao meu esposo Robson, a minha mãe Betânia, meu pai Omar e a todos os parentes e amigos que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, pela força, cuidado e proteção, pois sem ele não teria completado mais um etapa em minha vida. A minha linda filha Sara, pois ela foi à pessoa que mais me incentivou a seguir os meus sonhos e sem ela eu não estaria a onde estou, por cada beijo, cada abraço e por todas as manifestações de carinho.

Ao meu esposo Robson, pelo carinho, paciência, compreensão e apoio em todas as minhas decisões, estando sempre ao meu lado.

Aos meus pais Betania e Omar, que foram à base da minha educação e sempre me ensinaram a nunca desistir e acreditar sempre no meu potencial.

Aos meus mestres Prof^a Dr^a Margareth e Prof. Dr. Roger Lyrio que abriram a minha porta do conhecimento. Obrigada pelo apoio, oportunidade, confiança e compreensão. Sou o que sou graças aos seus ensinamentos.

A todos os meus familiares pelas orações, estando sempre na torcida pela minha vitória.

Aos colegas de laboratório, Wender, Angelina, Fabrício, Erick e Simoni que na verdade foram verdadeiros irmãos e me apoiaram durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Alexandre, Carol e aos meus amigos Vinicius Mengal e Leandro Ceotto que tiveram importante participação para a finalização desse projeto. Meu muito obrigado.

Aos alunos de iniciação científica, Juliana Trindade, Isabela Bonfim, Rafaela, Cassiano e Pâmella, muito obrigado pela ajuda. Aos colegas de outros laboratórios que me auxiliaram em vários momentos que precisei.

Enfim, a todos os colegas que estiveram na torcida de mais uma conquista em minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Marthin Luther King)

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIACÕES	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais Experimentais	31
3.2 Grupos Experimentais	31
3.3 Protocolo Experimental	31
3.4 Avaliação não Invasiva da Pressão Arterial	32
3.5 Ovariectomia	32
3.6 Obtenção do Extrato Bruto da Punica granatum (Romã)	33
3.6.1 Planta	33
3.6.2 Coleta	33
3.6.3 Obtenção do extrato de romã	33
3.6.4 Obtenção do Peso seco	34
3.6.5 Fracionamento	35
3.6.6 Análise Fitoquímica	35
3.6.7 Tratamento com Extrato Hidroalcoólico de romã	35
3.7 Estudos em Coração Isolado (Método de Langendorff)	35
3.8 Dissecção das artérias coronárias	36
3.9 Western Blot	37
3.9.1 Extração das proteínas	37
3.9.2 Dosagem das proteínas	37
3.9.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	38
3.9.4 Transferência das proteínas	38
3.9.5 Incubação dos anticorpos	38
3.10 Determinação de Peroxidação Lipídica (TBARS)	39
3.11 Dosagens sorológicas	40
3.11.1 Perfil Lipídico	40

3.11.2 Perfil Hormonal	41
3.12 Remoção e pesagem dos Coxins de Gordura	41
3.13 Análise dos Dados	41
4. RESULTADOS	43
4.1 Pressão arterial sistólica	43
4.2 Pressão de perfusão coronariana basal	44
4.3 Resposta vasodilatadora dependente do endotélio	45
4.4 Análise de Malondialdeído	48
4.5 Expressão de enzimas antioxidantes	49
4.6 Perfil lipídico	50
4.7 Perfil hormonal	51
4.8 Peso corporal dos órgãos	52
4.9 Caracterização Fitoquímica	55
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS	78

RESUMO

O aumento da incidência de doenças cardiovasculares em mulheres coincide com a perda da função ovariana, o que sugere efeitos benéficos dos hormônios sexuais femininos e justificaria o uso de terapia hormonal após a menopausa. É crescente o número de estudos utilizando terapias alternativas naturais, com os efeitos benéficos similares aos estrogênios. Uma dessas substâncias é a *Punica granatum*, popularmente conhecida como romã. Contudo, os efeitos desse tratamento sobre o sistema cardiovascular na hipertensão ainda não foram elucidados. Para tanto, nosso objetivo foi avaliar os efeitos cardiovasculares e antioxidantes do tratamento com romã em ratas hipertensas (SHR) e ovariectomizadas. Utilizamos fêmeas SHR, com 4 semanas de idade, que foram divididas em Sham e Ovariectomizada (Ovx) e subdivididas e tratadas com extrato da romã (250 mg/Kg) ou água filtrada (veículo), por 30 dias, por gavagem. Ao final do tratamento, quando os animais apresentavam 8 semanas de idade a pressão arterial sistólica foi avaliada por pletismografia de cauda. Em seguida, os animais foram pesados e eutanasiados, o sangue coletado para análise bioquímica. O coração era removido e perfundido de acordo com método de Langendorff. Após a estabilização da pressão de perfusão coronariana (PPC), foi realizada curva dose resposta de bradicinina (BK) seguida pela inibição com L-NAME. Os coxins de gordura e útero foram removidos e pesados. Para o protocolo de western blot e malondialdeído (MDA), os animais foram eutanasiados, plasma coletado e coração imediatamente removido para dissecação de coronárias. Dados foram expressos como média \pm EPM. Para as comparações entre grupos utilizamos ANOVA 1 via, seguido de *post hoc* de Tukey ou Fisher. Para curva de bradicinina ANOVA 2 vias, seguido de *post hoc* Bonferroni ($p < 0,05$). Observamos que houve redução significativa da PAS em ambos os grupos tratados (Sham Água, $170 \pm 3,6$ mmHg, Sham Romã, $151 \pm 2,5$ mmHg, OVX Água, $165 \pm 3,4$ mmHg e OVX Romã, $151 \pm 2,5$ mmHg). A PPC basal foi reduzida somente no grupo Sham Romã (Sham Água $137 \pm 5,8$ mmHg e Sham Romã $110 \pm 4,7$ mmHg). Observamos que a vasodilatação no leito coronariano em resposta à bradicinina foi significativamente maior nos grupos tratados, tanto Sham como OVX. A inibição com L-NAME aboliu o relaxamento induzido pela BK em todos os grupos, mostrando que este é um efeito dependente de NO. Na expressão das enzimas, observamos aumento da SOD no grupo OVX (OVX Água, $0,8199 \pm 0,091$ e OVX Romã, $1,307 \pm 0,124$) e não houve alterações na catalase e eNOS. Contudo, após a

ovariectomia houve redução da eNOS (OVX Água, $0,682 \pm 0,078$ e OVX Romã, $0,980 \pm 0,107$) e gp91phox (OVX Água, $0,593 \pm 0,083$ e OVX Romã, $0,733 \pm 0,071$). Houve redução nos níveis de MDA no grupo Sham (Sham Água $16,3 \pm 2,1$ nmol/mL e Sham Romã $8,1 \pm 0,9$ nmol/mL), indicando diminuição do estresse oxidativo. Observamos redução nos níveis de colesterol total e de LDL no grupo Sham após tratamento (CT: $38,9 \pm 2,9$ mg/dL e LDL: $14,0 \pm 0,6$ mg/dL) comparado ao veículo (CT: $54,3 \pm 5,4$ mg/dL e LDL: $20,9 \pm 1,5$ mg/dL). No grupo OVX, houve redução nos níveis de triglicerídeos e LDL após tratamento (TG: $37 \pm 3,1$ mg/dL e LDL: $18,2 \pm 1,5$ mg/dL) comparado ao veículo (CT: $64,8 \pm 4,5$ mg/dL e LDL: $24,3 \pm 1,7$ mg/dL). Não houve redução nos níveis de HDL. Além destes efeitos, verificamos aumento nos níveis de estrogênio somente no grupo OVX tratado (OVX Água, $7,2 \pm 2,0$ pg/mL e OVX Romã, $61,8 \pm 8,1$ pg/mL) e de progesterona em ambos os grupos tratados com o extrato de romã. Observamos ainda que o tratamento promoveu aumento no peso do grupo OVX e não alterou o peso relativo do útero em ambos os grupos. Além disso, o tratamento aumentou o peso de todos os coxins de gordura em ambos os grupos, exceto a mesentérica que ficou aumentada somente no grupo OVX. Desse modo, nós sugerimos o papel terapêutico do extrato da romã sobre o sistema cardiovascular, uma vez que foi demonstrado que a redução da pressão arterial, a melhora no relaxamento e no perfil lipídico podem estar associados a uma redução no estresse oxidativo.

Palavras chave: Extrato de romã, enzimas antioxidantes, fitoestrógenos, vaso relaxamento, espécies reativas de oxigênio e hipertensão.

ABSTRACT

Punica granatum or pomegranate (PG), a phytoestrogen, possesses several biological actions and may be beneficial for the prevention of disease, including cardiovascular disease. We hypothesised that treatment with pomegranate would improve cardiovascular parameters. The purpose of this study was to examine the cardiovascular and antioxidant effects of treatment with pomegranate in hypertensive and ovariectomized rats. Four weeks after their births, SHR females were divided into two groups, Sham and OVX, and were then subdivided into groups treated with pomegranate extract (250 mg/ kg) or filtered water (Vehicle) for 30 days by gavage. The systolic blood pressure (SBP) was measured by tail plethysmography at the beginning and end of treatment, when the animals were 8 weeks of age. The animals were killed by decapitation; the heart was removed and perfused according to the Langendorff method. The blood and tissues were collected for biochemical analysis. The protein expression of SOD-2, catalase, and eNOS were analysed in coronary arteries by western blot. The baseline coronary perfusion pressure (CPP) was determined. A dose-response curve to bradykinin (BK) was performed followed by inhibition with L-NAME. After 30 days, we observed a significant increase in systolic blood pressure only in the OVX group, and treatment promoted a significant reduction in SBP in both groups. The baseline CPP was reduced in the Sham group. The bradykinin-induced relaxation was significantly higher in the treated group. Ovariectomy significantly reduced the relaxation, which was restored by treatment with pomegranate, and L-NAME abolished the BK-induced relaxation in all groups, showing this result is a NO-dependent effect. There was an increase in SOD expression in the OVX-PG group and no change in the catalase level. However, the ovariectomy significantly reduced eNOS and gp91phox levels when compared to the Sham group. The MDA levels were significantly reduced in the Sham-PG group, indicating decreased oxidative stress. We observed a reduction in total cholesterol and LDL in the Sham-PG group compared to the Vehicle group. There was a reduction in triglyceride levels in the OVX-PG group. In addition to these effects, we observed an increase in oestrogen levels only in the OVX group and progesterone in Sham and OVX groups. Therefore, we suggest a therapeutic role of pomegranate extract on the cardiovascular system because it was shown to lower blood pressure, improve relaxation and a lipid profile that may be linked to a reduction in oxidative

stress. We also observed that treatment promoted an increase in body weight of the OVX group and did not change the relative weight of the uterus in both groups. Furthermore, the treatment increased the weight of all fat cushions in both groups, except mesenteric which was increased only in the OVX group. Therefore, we suggest a therapeutic role of pomegranate extract on the cardiovascular system, since it has been shown that lowering blood pressure, improvement in relaxation and lipid profile may be associated to a reduction in oxidative stress.

Keywords: Pomegranate extract, antioxidant enzymes, phytoestrogen, vasorelaxation, reactive oxygen species and Hypertension,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do estrogênio.....	18
Figura 2: Estrutura química do ácido elágico	23
Figura 3: Formação do ânion superóxido e sua degradação a outros compostos reativos e inócuos pela ação das enzimas antioxidantes	25
Figura 4: Efeitos antiateroscleróticos dos fitoestrógenos	28
Figura 5: Representação da reação da molécula de ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdéido (MDA)	40
Figura 6: Valores de pressão arterial sistólica no dia 30 após tratamento obtidos em fêmeas (SHR) Sham e OVX com 8 semanas de idade aferidas no dia 30	43
Figura 7: Efeito do tratamento sobre a pressão arterial sistólica em fêmeas (SHR) com 8 semanas de idade, (A) Sham antes do tratamento, final do tratamento grupo Água e final do tratamento grupo Romã. (B) OVX antes do tratamento, final do tratamento grupo Água e final do tratamento grupo Romã	44
Figura 8: Valores da pressão de perfusão coronariana (PPC) basal de fêmeas (SHR) Sham e OVX com 8 semanas de idade	44
Figura 9: Resposta vasodilatadora dependente do endotélio a doses crescentes de bradicinina (0,1 – 1000 ng) em fêmeas SHR (A) Sham e (B) OVX tratadas durante período de 30 dias	46
Figura 10: Resposta vasodilatadora dependente do endotélio a doses crescentes de bradicinina (0,1 – 1000 ng) mais L-NAME em fêmeas SHR (A) Sham e (B) OVX tratadas durante período de 30 dias	47

Figura 11: Efeito do tratamento sobre níveis de malondialdeído (MDA) em fêmeas (SHR) Sham e OVX após 30 dias de tratamento	48
Figura 12: Análise de expressão proteica das enzimas SOD-2, catalase, eNOS e gp91phox de ratas Sham e OVX tratadas	49
Figura 13: Perfil lipídico após tratamento em fêmeas (SHR) Sham e OVX com 8 semanas de idade, (A) colesterol total, (B) triglicerídeos, (C) lipoproteína de alta densidade, (D) lipoproteína de baixa densidade	50
Figura 14: Perfil hormonal após tratamento em fêmeas (SHR) Sham e OVX com 8 semanas de idade, (A) estrogênio e (B) progesterona	51
Figura 15: Efeitos do tratamento sobre peso corporal e hipertrofia uterina de fêmeas (SHR) Sham e OVX com 8 semanas de idade	53
Figura 16: Efeito do tratamento sobre os coxins de gordura, (A) Mesentérica, (B) Perirenal, (C) Retroperitoneal, (D) Parametrial de fêmeas (SHR) Sham e OVX com 8 semanas de idade	54
Tabela 1: Peso corporal e peso relativo dos coxins de gordura (mesentérica, perirenal, retroperitoneal e parametrial) e útero	52
Tabela 2: Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico da romã mais sua fração de 50% do extrato bruto	55

LISTA DE ABREVIÇÕES

Akt - Proteína cinase B

AT-1 Receptor de angiotensina do tipo 1

Bcl família de genes/fatores antiapoptóticos

BH4 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina

BK Bradicina

BKCa²⁺ Canais de potássio ativados por cálcio de larga condutância

CAT Catalase

CT Colesterol total

DCV Doenças cardiovasculares

DHE Dihidroetidina

E2 17 β -Estradiol

ECA Enzima conversora de angiotensina

EDHF Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRFs Fatores de relaxamento derivado do endotélio

EHR Extrato hidroalcoólico de romã

eNOS Óxido nítrico sintase endotelial

EROs Espécies reativas de oxigênio

cGMP 3',5'-Guanosina monofosfato cíclico

GPGR Receptor de estrogênio acoplado à proteína G

GPx Glutaciona peroxidase

GSH Glutaciona reduzida

GSR Glutaciona redutase

GTP Guanosina trifosfato

H⁺ Próton de hidrogênio

H₂O Água

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

HAS Hipertensão arterial sistêmica

HDL Lipoproteína de alta densidade

HERS Heart and Estrogen/progestin Re-placement Study

LDL Lipoproteína de baixa densidade

LDL-ox Lipoproteína de baixa densidade oxidada

L-NAME N ω -nitro-L-Arginina Metil Éster – Inibidor não seletivo da eNOS

MDA Malondialdeído

MLV Músculo liso vascular

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO Óxido Nítrico

NOX Subtipo da NAPHoxidase

O₂ Oxigênio

O₂⁻ Ânion Superóxido

OH⁻ Radical hidroxila

ONOO⁻ Peroxinitrito

OVX Ovariectomia

PA Pressão arterial

PAS Pressão arterial sistólica

PI3K Fosfatidilinositol-3-cinase

PKC Proteína cinase do tipo C

PPC Pressão de perfusão coronariana

RE α Receptor de estrogênio do tipo α

RE β Receptor de estrogênio do tipo β
SERMs Moduladores seletivos de receptor de estrogênio
SHR *Spontaneously Hypertensive Rat*
SOD Superóxido Dismutase
SRAA Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBA Ácido Tiobarbitúrico
TBARS Thiobarbituric acid reactive substances

TG Triglicerídeos
TRH Terapia de reposição hormonal
VCAM-1 Molécula de adesão vascular (*vascular cell adhesion molecule*)
VEGF Fator de crescimento endotelial vascular
WHI *Women's Health Initiative*

1- INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem um grupo de doenças que afetam o coração e vasos sanguíneos, como, doença arterial coronariana, hipertensão (HAS), insuficiência cardíaca congestiva e acidente vascular cerebral, são a principal causa de morte e incapacidade no mundo ocidental (Thom, 1989). Contudo, pesquisas apontam a HAS como um dos principais fatores de risco para as DCV gerando consequências irreversíveis sobre a saúde e devido a sua alta prevalência se torna uma questão de saúde pública. No entanto, para oferecer um prognóstico precoce e melhores terapias para a prevenção e cura destas doenças, uma compreensão dos mecanismos patofisiológicos básicos da hipertensão é essencial (Madamanchi, Vendrov, Runge, 2004)

A HAS é classificada em hipertensão arterial primária ou essencial e representa aproximadamente 95 % dos casos de hipertensão a qual é caracterizada por não possuir etiologia definida, tendo um importante componente genético e ambiental. Os 5 % restantes dos casos possuem hipertensão arterial secundária, com etiologia bem definida apresentando possibilidade de cura, com tratamento da doença primária (Zahar *et al.*, 2001; Zahar, *et al.*, 2005). A prevalência de hipertensão no Brasil variou entre 20 e 44 % e somente 30 % dos hipertensos possuem níveis pressóricos sob controle. Entre homens e mulheres a prevalência global de HAS não é semelhante, níveis mais elevados são encontrados em homens até 50 anos de idade quando comparado às mulheres, quadro este que é revertido a partir da 5ª década de vida (Reckelhoff & Fortepiani, 2004). Perante a este fato, vários mecanismos etiopatogênicos têm sido estudados com objetivo de correlacionar a falta do estrogênio e surgimento das DCV em mulheres no climatério.

O estrogênio, e em particular o 17 β -estradiol (E2) é sintetizado principalmente nos ovários e possui um importante papel na maturação sexual na fêmea por meio da maturação de folículos ovarianos, proliferação e diferenciação celular em tecidos reprodutivos (Escosteguy, 2002). O estrogênio possui importante papel em vários processos fisiológicos, incluindo o sistema

cardiovascular. A proteção vascular conferida pelo estrogênio pode ser mediada por uma ação direta sobre as células endoteliais (Haynes *et al.*, 2003).

Estudos indicam que o E2 pode promover relaxamento da musculatura lisa vascular (MLV) primeiramente atuando como um potente estimulador para ativação da enzima óxido nítrico endotelial (eNOS) ou aumentando a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) por meio de vários mecanismos como:

- i) redução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), sequestrando tais espécies (Yen *et al.*, 2001);
- ii) promove *up regulation* da expressão do RNAm da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células endoteliais da aorta (Stirone *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2011);
- iii) inibe a expressão da subunidade gp91phox do sistema NADPHoxidase e conseqüentemente reduzindo a formação de EROs em células endoteliais (Wagner *et al.*, 2001).

O E2 promove ainda efeitos antiproliferativos nas células do MLV (Yu *et al.*, 2011), estimula a liberação de fatores de relaxamento derivado do endotélio (EDRFs) (Santos *et al.*, 2010), induz *down regulation* dos fatores vasoconstritores derivados do endotélio (Dubey *et al.*, 2001), reduz a transcrição da enzima conversora de angiotensina (ECA) com redução de angiotensina II circulante e conseqüentemente inibindo o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Gallagher *et al.*, 1999), promove *down regulation* de receptores de angiotensina II (AT-1) na membrana endotelial (Dean *et al.*, 2005) e melhora a composição de lipoproteínas plasmáticas (Chambliss & Shaul, 2002).

As ações benéficas conferidas pelo E2 sobre o sistema cardiovascular são mediadas por alvos celulares com alta afinidade e especificidade por uma proteína ligante intracelular denominado receptor de estrogênio (RE) que foi primeiramente descrito na década de 60 (Soloff & Szego, 1969).

Posteriormente, em 1996, outro RE proveniente da próstata de rato, foi clonado sendo designado como RE β (NR3A2) (Kuiper *et al.*, 1996) e o primeiro como RE α (NR3A1). Estes receptores ativam vias intracelulares para formação de proteínas e conseqüentemente gerando seus efeitos biológicos em inúmeros leitos vasculares (Brosnihan *et al.*, 2008). Devido a sua característica lipofílica, o E2 se liga em receptores intracelulares para em seguida ocorrer à dimerização desses receptores que são posteriormente translocados para regiões responsivas do DNA (Nilsson *et al.*, 2001). Estes receptores, também denominados de RE clássicos normalmente localizam-se no citoplasma e na membrana do núcleo celular e atuam em grande parte como reguladores transcricionais, entretanto, uma pequena fração pode estar localizada próxima à membrana plasmática ativando vias de sinalização que medeiam efeitos não transcricionais do E2 (Meyer *et al.*, 2009). Takada *et al.* (1997) descreveram um terceiro grupo RE, com 7 domínios transmembrana acoplado à proteína G denominado GPER localizado na membrana do retículo endoplasmático. Tem sido sugerido recentemente à atuação destes receptores em vias de sinalização rápida, ou seja, não genômicas disparando uma cascata de cinases, como a cinase regulada por sinais extracelulares (ERK-1 e ERK-2) (Barth *et al.*, 2012; Masood *et al.*, 2011; Filardo *et al.*, 2000) e fosfatidilinositol-3-cinase e roteína cinase B (PI3K/Akt) (Deschamps & Murphy, 2009; Revankar *et al.*, 2005)

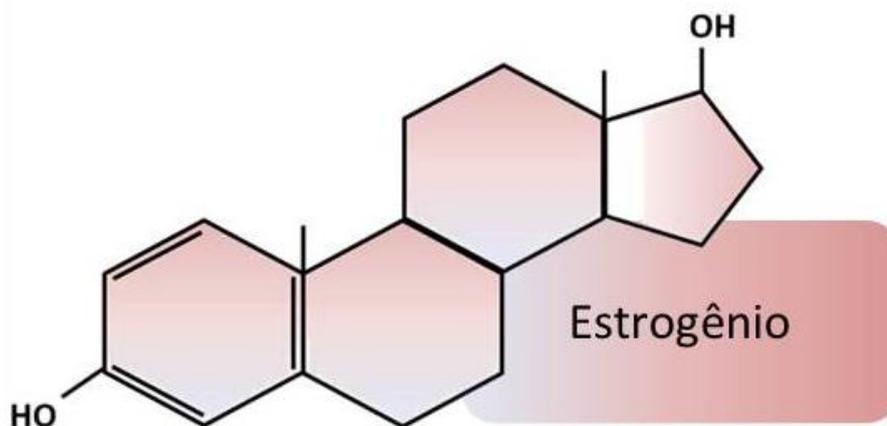


Figura 1: Estrutura química do estrogênio.

Diferentes genes codificam os subtipos de RE e sua expressão varia de acordo com o leito ou tecido estudado (Mori *et al.*, 2006). Os REs estão

localizados tanto no endotélio vascular como em células do MLV (White, 2002a). A atuação do E2 sobre o endotélio possui uma participação especial devido à importância dessas células no controle do tônus vascular, por meio da produção e liberação de EDRFs que são: NO, prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Arnal *et al.*, 2010; Félétou & Vanhoutte, 2006; Michel & Vanhoutte, 2010; Yang *et al.*, 2009). Na década de 80, Furchgott & Zawadzki (1980) descreveram pela primeira vez que o endotélio possui papel funcional sobre a reatividade vascular. Vários estímulos fisiológicos como o *shear stress* ou estresse de cisalhamento, hormônios circulantes (catecolaminas, aldosterona, estrogênio), constituintes plasmáticos (trombina), produtos plaquetários (serotonina, adenosina difosfato) e autacóides (histamina, bradicinina, prostaglandina) podem estimular a liberação dos EDRFs. Estes estímulos em receptores específicos ativam os canais de cálcio do tipo L aumentando a concentração de cálcio intracelular ativando a enzima conversora da L-arginina em NO e L-citrulina, a eNOS. Esta reação requer a participação de cofatores como a tetrahydrobiopterina (BH₄), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e oxigênio (O₂) (Karpuzoglu & Ahmed, 2006; Meyrelles *et al.*, 2011). Uma vez formado, o NO se difunde para as células do músculo liso vascular onde irá ativar a guanilato ciclase solúvel (sGC) para produzir monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O cGMP atua como segundo mensageiro ativando a proteína cinase do tipo G (PKG) que irá abrir os canais de potássio promovendo efluxo deste íon, hiperpolarizando a célula e consequentemente fechando os canais de cálcio voltagem dependentes levando a uma redução da concentração de cálcio intracelular e promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular (Arnold *et al.*, 1977; Castillo *et al.*, 2006; Revankar *et al.*, 2005)

Diante da proteção que o E2 exerce sobre o sistema cardiovascular, várias pesquisas apontam que o hipoestrogenismo ou deficiência hormonal estão associados à redução da vasodilatação, devido a uma disfunção endotelial que culmina em um aumento na incidência de DCV em mulheres na pós-menopausa (Hammes & Levin, 2007). A menopausa é um período caracterizado pela perda gradual da função ovariana e da capacidade

reprodutiva, instalando-se um hipoestrogenismo (Bechlioulis *et al.*, 2012). Entretanto, algumas mulheres podem apresentar esta etapa de transição de forma precoce, promovendo disfunção ovariana em um período em que deveria estar em sua fase reprodutiva. A menopausa precoce pode ser espontânea, caracterizada pela redução do número de folículos ovulatórios (Cramer *et al.*, 1995; Harlow & Signorello, 2000), ou pode ser de forma induzida devido a intervenções médicas, tais como, quimioterapia ou intervenções cirúrgicas como ooforectomia bilateral, geralmente, realizada em mulheres com diagnóstico de câncer (Shuster *et al.*, 2010). Todas estas mulheres apresentam perda definitiva da função gonadal, e conseqüentemente hipoestrogenismo progressivo que pode ocasionar modificações neuropsíquicas, orgânicas e metabólicas. Estas alterações podem ser classificadas em alterações ginecológicas e extra-ginecológicas. Os principais sintomas ginecológicos são as disfunções menstruais, urogenitais e alterações da genitália externa e interna. As alterações extra-ginecológicas estão representadas pelos sintomas neuropsíquicos, alterações atróficas da pele, atrofia das mucosas nasais e oculares, descalcificação dos dentes, comprometimento do sistema nervoso central, alterações do metabolismo ósseo e cardiovascular (Obermeyer, 2000)

O comprometimento sobre o sistema cardiovascular proveniente do hipoestrogenismo ocorre primeiramente por um aumento na pressão arterial sanguínea e um aumento na prevalência da HAS que culmina no aparecimento de várias outras DCV [118]. Para melhor entendimento sobre a fisiopatologia e, conseqüentemente, prevenção e tratamento da HAS, vários modelos de hipertensão experimental foram desenvolvidos em animais experimentais. O modelo mais estudado que desenvolve hipertensão espontânea é o SHR (*Spontaneous Hypertensive Rats*) desenvolvido por Okamoto & Aoki, (1963) sendo um excelente modelo da hipertensão essencial do homem.

Apesar dos inúmeros benefícios induzidos pelo E2 sobre os mais diferentes sistemas, ensaios clínicos trouxeram evidências de que a terapia de reposição hormonal (TRH) na pós-menopausa pode aumentar o risco de tromboembolismo e DCV. Em 1998 – 2002 um grupo de pesquisadores realizou o primeiro estudo prospectivo do tipo ensaio clínico e randomizado, o

HERS (*Heart and Estrogen/progestin Re-placement Study*). Com 2763 participantes no climatério, média de idade de 66 anos e apresentando doenças coronarianas receberam uma associação de 0,625 mg de estrogênio conjugado equino + 2,5 mg acetato de medroxi-progesterona diariamente com principal objetivo de prevenir novos eventos cardiovasculares, ou seja, tratamento atuando na prevenção secundária. Os resultados foram surpreendentes, principalmente no primeiro ano de tratamento, pois houve aumento de tromboembolismo venoso, doença na vesícula biliar e principalmente no aumento na incidência de novos eventos cardiovasculares no grupo que recebeu o hormônio. Diante destes resultados, muitas críticas foram feitas ao HERS principalmente em relação à faixa etária das participantes. A falta de conclusões fez com que este estudo prosseguisse no então chamado HERS II. As participantes e seus médicos decidiram continuar com a TRH e 93 % delas foram acompanhadas por mais 2,7 anos. Com 1165 participantes no grupo placebo e 1156 no grupo teste novamente os resultados não mostraram diferenças em relação ao estudo anterior (Hulley *et al.*, 1998; Hulley *et al.*, 2002).

Não obstante, um novo estudo denominado de *Women's Health Initiative* (WHI) deu prosseguimento ao estudo HERS, entretanto os pesquisadores objetivavam estudar a terapia hormonal como forma de prevenção primária contra a ocorrência de DCV. Portanto, a seleção das pacientes foi sem antecedentes de DCV, no qual receberam 0,625 mg de estrogênio conjugado equino + 2,5 mg acetato de medroxi-progesterona diariamente. De acordo com os resultados, houve aumento no risco relativo de 29 % para DCV, 41 % para acidente vascular cerebral (AVC) e 100 % para trombose. Como HERS I e HERS II, também houve críticas em relação ao estudo, embora o WHI estivesse focado em pacientes previamente saudáveis, 7,7 % da amostra apresentava doença coronariana prévia. A média de idade foi de 63,2 anos, sabendo que idade é fator de grande importância para DCV, além de outros parâmetros que foram incluídos, mas de maneira incorreta como: participação de mulheres obesas, diabéticas, hipertensas, entre outras. Além disso, este estudo apresentou aumento de risco relativo para hiperplasia endometrial (Rossouw *et al.*, 2002)

Em vista dessas inquietantes conclusões referentes aos testes clínicos populacionais como HERS, WHI e a alta incidência de DCV em mulheres após a menopausa, a utilização dessas TRH no climatério se tornou duvidosa. Contudo, há necessidade de estudos prospectivos que demonstrem que a TRH quando administrada em tempo e de maneira correta, exerce efeitos protetores sobre os sistemas, incluindo o cardiovascular (Santos *et al.*, 2014). Entretanto, para manter o bem-estar após a queda hormonal com a menopausa, tem sido estudadas terapias alternativas que pudessem oferecer os benefícios semelhantes aos efeitos estrogênicos principalmente sobre o sistema cardiovascular. Dentre eles: tibolona (Castelo-Branco *et al.*, 2005; Pantaleão *et al.*, 2009), moduladores seletivos de RE (SERMs) tais como o tamoxifeno, raloxifeno e clomifeno (Jordan, 2001), compostos farmacológicos que atuam como agonista do receptor GPER (Prossnitz & Barton, 2011) e em especial os metabólitos secundários produzidos por plantas, os fitoestrógenos, como: isoflavona, ácido elágico e resveratrol (Kuiper *et al.*, 1998)

Os fitoestrógenos pertencem a uma classe dos polifenóis e foram descritos em 1940, possuem funções e estrutura fenólica semelhante ao estrogênio. Há vários tipos de fitoestrógenos, entretanto a maior categoria estudada são as isoflavonas (Lissin & Cooke, 2000). A atividade estrogênica depende da capacidade destes compostos em se ligar aos RE, que por sua vez, é determinada pela presença de anéis aromáticos assim como os grupos hidroxil em sítios específicos (Martucci & Fishman, 1993). Além disso, os fitoestrógenos podem possuir efeitos antiestrogênicos podendo ocorrer por competitividade ou inibição na síntese do estrogênio. Contudo, o que irá determinar os efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos destas substâncias é em grande parte o tecido alvo, bem como o tempo e o nível de exposição (Awoniyi *et al.*, 1998; Mueller *et al.*, 2004).

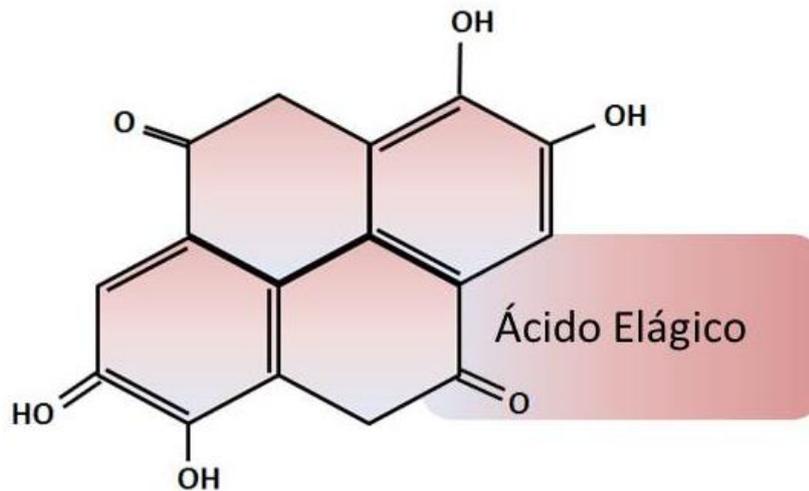


Figura 2: Estrutura química do ácido elágico, um tipo de fitoestrógeno pertencente à classe dos taninos.

Estas substâncias, como os polifenóis e fitoestrógenos são metabólitos secundários produzidos por plantas que possuem como função protegê-las contra infecções. Caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um ou mais anéis fenólicos, podem estar associados a moléculas de carboidratos e ácidos orgânicos. São classificados de acordo com função e número de anéis fenólicos e elementos estruturais ligados a eles, estas famílias são divididas em 4 partes: flavonóides (flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas), ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (resveratrol). A quantidade de polifenóis depende do tipo de fruto, cultivo, processamento e condições de estocagem (Manach *et al.*, 2004). Sua absorção intestinal varia muito entre indivíduos, pois podem estar relacionados com o conteúdo dietético consumido e o estado da microbiota intestinal (Adlercreutz *et al.*, 1987), portanto seu metabolismo ocorre em grande parte dentro do organismo e depende quase inteiramente de microorganismos da microbiota intestinal, pois são responsáveis pela produção de enzimas que hidrolisam a ligações glicosídicas antes de serem absorvidas pelo intestino, as glicosidases (Bowey *et al.*, 2003). Os polifenóis têm recebido muita atenção da comunidade científica por seus numerosos efeitos biológicos dentre eles, efeitos antioxidantes, antiaterogênicos, anti-inflamatório, antibiótico, antialergênico, anticarcinogênico, além de modular inúmeros sistemas enzimáticos.

Dentre estes efeitos, o efeito antioxidante atualmente tem sido bem estudado devido a sua capacidade de retardar, prevenir ou remover os danos oxidativos da molécula afetada de qualquer substrato oxidável. São capazes de eliminar ou neutralizar os radicais livres presentes no organismo. Conhecidos como “varredores de radicais livres”, podem ser classificadas como endógenas ou enzimáticas e exógenas ou não enzimáticas. O sistema antioxidante enzimático está presente naturalmente no organismo, são compostos pelas seguintes enzimas: glutatona-peroxidase, catalase, metionina redutase e superóxido-dismutase (SOD). As células possuem dois tipos de glutatona-peroxidase, selênio-dependente e outro não, a proporção entre as duas formas varia muito entre os diferentes tipos de tecidos e espécies (Halliwell & Gutteridge, 1985). A catalase possui como elemento importante para sua atividade o ferro e os tocoferóis (vitamina E) e estão normalmente distribuídos na membrana celular. A SOD possui a capacidade de fazer a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) oferecendo a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio (Peskin & Winterbourn, 2000). Possui cobre, zinco e manganês em seu centro catalítico e são divididas em três isoformas: SOD1 ou superóxido dismutase cobre-zinco dependente (CuZnSOD) é expressa no citoplasma, SOD-2 ou dependente do manganês (MnSOD) está expressa no espaço mitocôndrial e SOD-3, foi a mais recente caracterizada ou EC-SOD está expressa no espaço extracelular e contém zinco em seu centro catalítico.

O sistema antioxidante não enzimático ou exógeno é formado em sua maioria por nutrientes essenciais provenientes de uma alimentação de qualidade. São eles, vitamina E, família dos tocoferóis, ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno e os polifenóis (Halliwell, 1987). A propriedade antioxidante funciona graças à ressonância presente nos anéis aromáticos de sua estrutura gerando o compartilhamento de elétrons entre os átomos de carbono, tornando os radicais livres em substâncias mais estáveis. (Dos Santos & Filho, 2006). Segundo Halliwell and Gutteridge, (2007) a definição de radicais livres é qualquer espécie que apresenta elétrons desemparelhados em sua última orbital, capaz de existência independente. Estes radicais atualmente estão sendo bem estudados, pois muitas doenças crônico-degenerativas estão

relacionadas com a presença de altas concentrações destes radicais produzidos pelos diversos sistemas intracelulares, fazendo com que o sistema antioxidante enzimático seja incapaz de neutralizar o excesso de radicais livres formados, ocasionando um desequilíbrio e gerando assim, um quadro denominado de estresse oxidativo que desencadeia o surgimento de vários tipos de doenças crônico-degenerativas (Slater, 1994; Baynes, 1991)

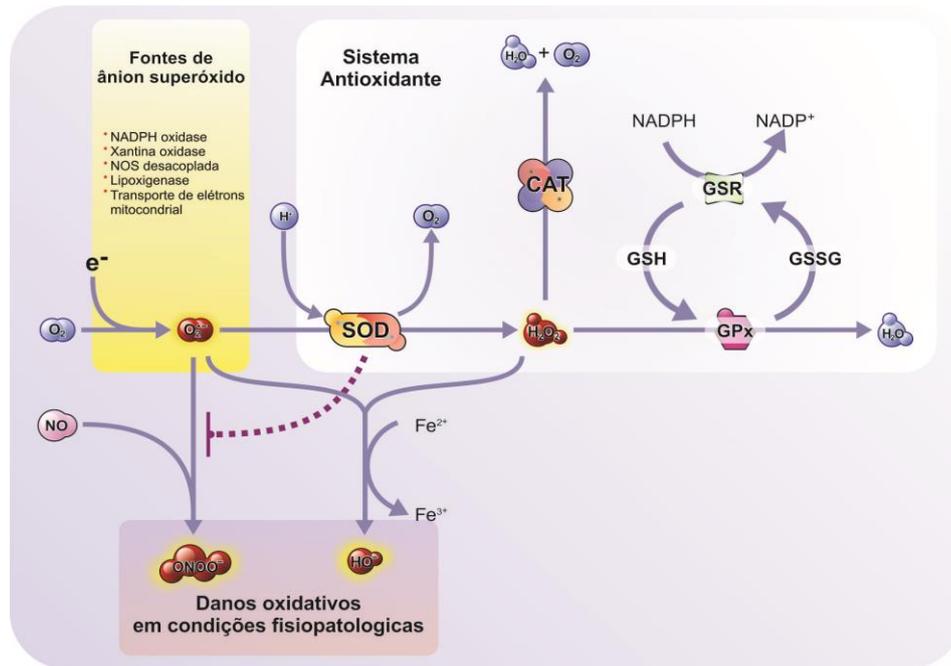


Figura 3: Formação do ânion superóxido e sua degradação a outros compostos reativos e inócuos pela ação das enzimas antioxidante. **Adaptado:** Gandra *et al.*, 2004 e Fukai & Ushio-Fukai, 2011.

O aumento do estresse oxidativo no sistema cardiovascular induz a ativação de uma série de mediadores inflamatórios como moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias na parede arterial gerando uma disfunção endotelial, cuja definição é a redução da biodisponibilidade de NO por meio de reações do NO com o ânion superóxido $O_2^{\cdot -}$ promovendo a formação de espécies mais tóxicas, como o peróxido nitrito (ONOO⁻) e radical hidroxila (OH[·]) no endotélio (Basu & Penugonda, 2008; Meyrelles *et al.*, 2011). Devido as característica antioxidante dos polifenóis, a sua utilização promove efeitos benéficos sobre o endotélio por meio da redução do estresse oxidativo.

O principal mecanismo dos polifenóis, favoráveis na melhora da função endotelial é por meio da proteção do NO contra as EROs, aumentando a sua biodisponibilidade e conseqüentemente a vasodilação (De Nigris *et al.*, 2007a; Ignarro *et al.*, 2006), inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (De Nigris *et al.*, 2006), inibindo a elastase que é um componente modulador da trombina (Thring *et al.*, 2009), reduzindo a expressão de biomarcadores pró-inflamatórios do sistema vascular tais como trombospondina (TSP) e fator transformador de crescimento – $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (De Nigris *et al.*, 2007b). Além disso, Possuem atividade anti-hipertensiva, reduzindo a atividade da ECA (Mohan *et al.*, 2010) e reduz a espessura da região entre as camadas íntima-média (Davidson *et al.*, 2009). Não obstante, também apresentam atividade anti-hiperglicêmica melhorando a hiperglicemia pós-prandial na diabetes tipo II, por meio da inibição da atividade da enzima α -glicosidase intestinal (Li *et al.*, 2005). Todas estas características fazem com que os polifenóis apresentem propriedades antiaterogênicas e anti-inflamatórias (Corrêa *et al.*, 2006), gerando assim, proteção cardiovascular por meio da melhora da função endotelial. Dessa forma, o consumo frequente de frutas com altas concentrações de polifenóis possui importante papel na saúde, além de ser um grande aliado na prevenção das DCV.

Dentre os alimentos ricos em polifenóis, podemos destacar a *Punica granatum* (romã). A romã é uma infrutescência da romãzeira e não uma fruta, apresenta concentração de 273 mg/100 g de peso seco ao compará-la com outras frutas que variam de 30 a 230 mg/100 g de peso seco (Jayakumar & Kanthimathi, 2011). A romã é uma árvore pequena que pertence à família Punicaceae e nativa da região do Himalaia, entretanto tem sido cultivada desde os tempos antigos na região do Mediterrâneo. A romã é citada em textos bíblicos, segundo a Bíblia, quando os judeus chegaram à terra prometida os 12 espias que foram enviados para aquele lugar voltaram carregando romãs e outros frutos como amostras da fertilidade da terra que Deus prometera. Ligada à fertilidade feminina, abundância e boa sorte, o seu consumo está relacionado a inúmeras atividades protetoras e vem ganhando uma grande importância em pesquisas no mundo inteiro por ser amplamente utilizada na medicina popular. Seus potenciais terapêuticos incluem tratamento e prevenção do câncer, DCV,

diabetes *mellitus*, condições dental, disfunção erétil, proteção contra radiação ultravioleta (UV), além de isquemia cerebral, doença de Alzheimer's, e obesidade. Portanto, ensaios clínicos são necessários para explorar todos os potenciais terapêuticos da romã (Jurenka, 2008).

Os principais polifenóis presentes no suco da romã incluem os elagitaninos e antocianinas. A punicalagina, pertencente ao grupo dos elagitaninos, é hidrolisado a ácido elágico no organismo (Gil *et al.*, 2000; Seeram *et al.*, 2004). Existe indicação que o grande benefício terapêutico do extrato de romã é devido à alta qualidade de seus constituintes, como: ácido elágico, flavonóides e isoflavonas (Jurenka, 2008). Os flavonóides compreendem um grande grupo polifenólico naturalmente distribuídos na natureza (Ajay *et al.*, 2006), como: o resveratrol do vinho tinto (Zou *et al.*, 2003) e os carotenóides do suco de laranja (Riso *et al.*, 2005). O efeito antioxidante do extrato da romã é bem mais potente em relação ao vinho tinto, suco de uva, suco de laranja e vinho branco, tal característica foi relacionada à alta quantidade (cerca de 1,5 %) e qualidade de polifenóis comparado aos outros frutos (Ignarro *et al.*, 2006).

Considerando as características dos constituintes presentes na romã, principalmente devido ao seu alto teor em polifenóis que contribui para um potente efeito antioxidante, o consumo regular deste alimento age como uma ferramenta benéfica contra os danos causados pela deficiência hormonal associada a HAS, torna-se válido pesquisar os efeitos crônicos do tratamento com EHR de romã, principalmente sobre a reatividade vascular, por meio da indução de uma substância vasodilatadora dependente do endotélio, a bradicinina (BK).

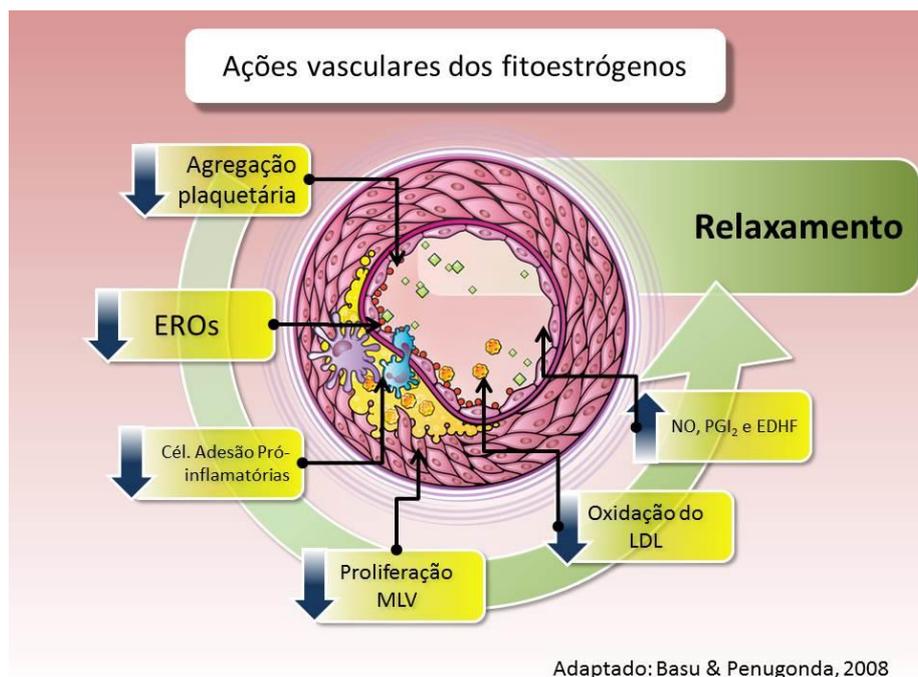


Figura 4: Efeitos antiateroscleróticos dos fitoestrógenos

A BK é de extrema importância na reatividade vascular, foi descoberta em 1948 por três fisiologistas brasileiros liderados por Mauricio Rocha e Silva que pesquisavam sobre a histamina, comum em veneno de cobras da espécie *jararaca* (*Bothrops jararaca*). Este veneno foi testado em intestino isolado de cobaias, entretanto o efeito não foi o esperado o que levou Rocha e Silva atribuir estes efeitos a uma nova substância denominada bradicinina (bradys = lento, kinesis = movimento) (Rocha e Silva *et al.*, 1949). Vários processos biológicos são mediados pela BK tais como, regulação da pressão arterial, neurotransmissão e broncoconstrição (Hall, 1992). Proveniente do sistema caliceína-cinina, a bradicinina atua de maneira parácrina, considerada um potente vasodilatador dependente do endotélio liberada pela célula endotelial vascular sendo capaz de promover a liberação de EDRF (Nakashima *et al.*, 1993).

O sistema caliceína-cinina é formado quando a pré-caliceína, sintetizada no fígado, é ativada no plasma pelo fator de Hageman que irá converter o cininogênio em cininas, dentre eles a calidina, bradicinina e Met-Lys-bradicinina. Estas cininas podem interagir com receptores específicos

denominados B1 e B2, sendo que a maior parte dos efeitos cardiovasculares são mediados pelo receptor B2 (Regoli *et al.*, 1977). A BK possui meia vida muito curta, pois a sua inativação ocorre principalmente pela ação da ECA ou também chamada de cinase II que a degrada em fragmentos inativos (Proudler *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1970).

Embora tenha muitos estudos que demonstram os efeitos da romã, poucas informações são descritas em relação aos seus efeitos sobre o leito coronariano em animais hipertensos e com deficiência hormonal. Diante de todas estas informações, testamos a hipótese de que o tratamento com EHR possa reduzir a progressão da HAS por meio de seus efeitos antioxidantes otimizando a função vascular ao reduzir o estresse oxidativo promovendo melhor resposta vasodilatadora e conseqüentemente melhorar parâmetros aterogênicos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos do tratamento com a romã durante 30 dias sobre parâmetros cardiovasculares, principalmente, sobre a reatividade vascular coronariana de ratas espontaneamente hipertensas e ovariectomizadas.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral:

Avaliar a reatividade vascular coronariana bem como o estresse oxidativo de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e ovariectomizadas tratadas com *Punica granatum L.*

2.2- Específicos:

- Avaliar os efeitos terapêuticos e preventivos da romã sobre a pressão arterial sistólica.
- Avaliar os efeitos do tratamento sobre o peso corporal e diferentes depósitos de gordura.
- Avaliar o efeito do tratamento com a romã sobre a pressão de perfusão coronariana basal.
- Determinar a participação do endotélio e do NO na vasodilatação induzida pela bradicinina no leito coronariano.
- Avaliar os efeitos do tratamento sobre o perfil lipídico e hormonal.
- Avaliar os níveis de estresse oxidativo plasmático por meio da dosagem de malondilaldeído (MDA).
- Quantificar a expressão das proteínas da SOD-2, catalase, eNOS e NADPH oxidase.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais experimentais

Utilizou-se para esse trabalho ratas SHR (*Spontaneous Hipertensive Rats*) com 4 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo biotério central do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES sob parecer número 054/2012. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com livre acesso a água e ração (Purina Labina), sob condições de temperatura (22-24 °C), e umidade (40-60 %) controladas. O ciclo de luz foi regulado para períodos de 12/12 horas alternando entre claro e escuro.

3.2 – Grupos Experimentais

Os animais SHR foram divididos em 2 grupos: Sham e Ovariectomizado, e subdivididos segundo o tratamento com água (veículo) ou romã.

1- Sham Água (n = 8 - 10)

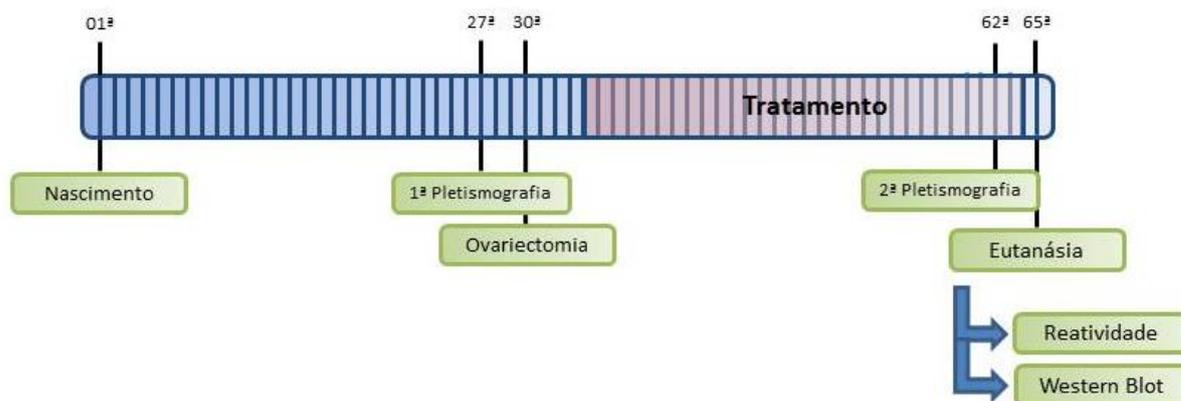
2- Sham Romã (n = 8 - 10)

3- OVX Água (n = 8 - 10)

4- OVX Romã (n = 8 - 10)

3.3 – Protocolo Experimental

- Aferição da pressão arterial sistólica
- Separados: Sham e Ovariectomia
- Início do tratamento com EHR ou veículo durante 30 dias.
- Aferição a pressão arterial sistólica por pletismografia.
- Eutanásia dos animais para coleta de sangue, retirada dos coxins de gordura e estudo funcional (coração isolado), vinte e quatro horas após a última dose de tratamento ou para dissecação das artérias coronárias, para análise da expressão das enzimas antioxidantes.
- final do protocolo de tratamento com a romã os animais tinham 8 semanas.



3.4- Avaliação não invasiva da Pressão Arterial

Antes da realização dos registros foi necessário aclimatar os animais no equipamento utilizado (IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA). O processo de aclimação foi de 3 dias antes à coleta do registro. A aclimação consiste 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. A temperatura foi controlada entre 29 e 32 °C durante o tempo necessário 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.

3.5 - Ovariectomia

Após anestesia com hidrato de cloral a 10 % (0,4 mg/Kg, i.p.), o animal foi posicionado em decúbito lateral e imobilizado com fita adesiva sobre a prancha cirúrgica. Antes da incisão, foi realizada tricotomia e esterilização com álcool iodado na região abdominal cujo ponto central, encontrando-se aproximadamente a 1,5 cm logo abaixo da última costela, no eixo craniocaudal e com distância da coluna vertebral de aproximadamente 1,5 cm. Após esse

procedimento, foi feito um pequeno corte (cerca de 1 cm) subcutâneo, expondo a musculatura abdominal do animal. A seguir, um pequeno corte foi feito na musculatura abdominal expondo a cavidade abdominal. O ovário foi localizado e amarrado com linha absorvível próximo à junção da trompa uterina com o ovário, seguindo com sua remoção. Para finalizar, foi realizado o procedimento de sutura, primeiro para fechar a musculatura abdominal e posteriormente para fechar a pele do animal, o mesmo procedimento foi realizado para o lado oposto. O grupo Sham foi submetido aos mesmos procedimentos cirúrgicos exceto a remoção dos ovários. Ao final do procedimento, os animais receberam uma injeção de antibiótico (Enrofloxacina - 2,5 % - 0,1 mL – i.m.). A castração foi confirmada pela atrofia uterina. Para isso, ao final da coleta dos dados o útero foi cuidadosamente removido e tanto o peso úmido quanto o peso seco (após 24 horas em estufa à 100 °C) foram determinados em balança de precisão (SHIMADZU AUY 220).

3.6- Obtenção do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* (Romã)

3.6.1- Planta

O material vegetal de escolha (*Punica granatum*) conhecida popularmente como romã, pertence à família das Mirtáceas, exsicata n° 1097-9. Depositada no herbário VIES/UFES no setor de botânica do Departamento de Ciências Biológicas.

3.6.2- Coleta

O material vegetal de estudo utilizado foi à casca do fruto *Punica granatum*, coletado no bairro Bento Ferreira (quintal residencial), Vitória em junho de 2013 durante o período matutino e as condições climáticas eram favoráveis à coleta.

3.6.3- Obtenção do extrato de Romã

Utilizou-se as cascas da romã, nas quais foram submetidas à secagem em estufa à 40 °C em um período de 5 dias. Após este processo as mesmas foram trituradas, utilizando-se um moedor elétrico (DPM – Júnior).

O EHR foi obtido ao misturar o pó das cascas de romã em álcool 95 °GL até a completa extração dos componentes da casca (3 dias). Em seguida o extrato é filtrado a vácuo e a fase líquida submetida à rota-evaporação a pressão reduzida e temperatura de 60 °C, em um evaporador rotativo (TECNAL, modelo TE-210) com objetivo de remover o solvente (álcool 95 °GL), sem que os componentes químicos do extrato sejam alterados. Ao final, o extrato foi colocado em vidro âmbar e mantido em temperatura de 4 °C até o momento da realização do protocolo experimental. Para iniciar o tratamento o extrato foi diluído em água filtrada e administrado por gavagem na concentração de 250 mg/kg.

3.6.4- Obtenção do Peso Seco:

Devido ao fato do extrato bruto apresentar certo grau de hidratação, mesmo após ter passado pelo processo de rota-evaporação, a determinação do peso seco foi realizada para determinarmos a quantidade efetiva de extrato (não hidratado) que foi utilizado nos protocolos experimentais. Inicialmente um cadinho de porcelana vazio foi aquecido em estufa a 60 °C para em seguida serem pesadas várias vezes em balança digital (AND) determinando seu peso, ou seja, até no momento em que ocorresse o mesmo peso em três pesagens consecutivas. Em outro recipiente, foi pesado 500 mg do extrato bruto para serem posteriormente diluídos em 5 mL de água destilada, misturando-se até obter uma solução homogênea. Foi transferido 1 mL dessa solução para o cadinho de porcelana previamente pesado e seco. O cadinho em seguida foi 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. Novamente, o cadinho foi pesado por repetidas vezes e mantido em aquecimento constante, até que o peso seco observado não tenha se alterado 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.

3.6.5 Fracionamento

O extrato bruto foi fracionado por meio de uma bancada cromatográfica utilizando diferentes concentrações: 30, 50, 70 e 95 % de etanol, sequencialmente. A coluna cromatográfica utilizada possui 33,5 cm de altura e 0,7 cm de diâmetro, preenchida com sílica 70-230 mesh. Os volumes foram eluídos em um total de 2 colunas a 0,5 mL/min. As frações de cada concentração de etanol foram coletadas e o seus volumes reduzidos a 10 tempos, utilizando *speedvac*.

3.6.6 Análise Fitoquímica

Os extratos foram testados para a presença de princípios ativos tais como, triterpenóides, fitoesteróis, glicosídeos, saponinas, alcaloides, flavonoides, taninos, proteínas, aminoácidos livres, carboidratos e ácidos orgânicos. Os procedimentos utilizados seguem de acordo com o descrito no estudo de Bhandary *et al.* (2012) e os resultados se encontram na tabela 2.

3.6.7- Tratamento com extrato hidroalcolico de romã

O tratamento foi realizado durante período de 30 dias via oral, por gavagem, com volume máximo de 0,2 mL/100 g de animal contendo 25 mg de extrato seco diluído em água filtrada. Para correção do volume máximo os animais foram pesados semanalmente. Os animais que não fizeram o tratamento com extrato hidroalcolico de romã tiveram o mesmo volume administrado contendo veículo (água filtrada).

3.7- Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff)

O primeiro protocolo teve como objetivo fazer análise da reatividade vascular coronariana. Portanto, após o final do tratamento, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (0,4 mg/Kg, i.p.) e eutanasiados por decapitação para coleta do soro e/ou plasma. Em seguida os corações foram dissecados de suas conexões e imediatamente transferidos para o aparelho de perfusão isolada por meio da canulação da aorta, no nível de sua curvatura. A perfusão retrógrada foi realizada pelo método de Langerdorff modificado (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Alemanha) sendo utilizada uma solução

nutridora composta de NaCl, 120 mM; CaCl₂ · 2H₂O, 1,25 mM; KCl, 5,4 mM; MgSO₄ · 7H₂O, 2,5 mM; NaH₂PO₄ · H₂O, 2,0 mM; NaHCO₃, 27,0 mM; Na₂SO₄, 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose 11,0 mM, mantida a 37 °C por um banho-maria, e continuamente pressurizada por mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂) na câmara de saturação. O fluxo coronariano foi mantido constante em 10 mL/min por meio de uma bomba de rolete (Hugo Sachs, Germany). A pressão de perfusão coronariana (PPC) basal foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (AD Instrument MLT0380/A Reusable BP Transducer), conectado imediatamente próximo da cânula de perfusão aórtica, através do qual foi perfundido o leito coronariano e ligado ao sistema digital de aquisição de dados (PowerLab System). Como o fluxo foi mantido constante em 10 mL/min, por meio da bomba rolete, as alterações da PPC foram diretamente relacionadas às mudanças de resistência vascular. Um balão de látex foi inserido no ventrículo esquerdo por meio de uma cânula de aço conectada a um transdutor (AD Instrument MLT0380/A Reusable BP Transducer) para mensurar a força isovolumétrica cardíaca. O balão foi pressurizado por meio de uma seringa de vidro de forma a manter uma pressão diastólica intraventricular de 20 mmHg. Após 40 minutos de estabilização da preparação de coração isolado, a PPC basal foi determinada e iniciado o estudo da reatividade coronariana por meio da construção de uma curva dose-resposta. A resposta vasodilatadora do leito coronariano foi avaliada por meio da administração *in bolus* (0,1 mL) em doses crescentes (0,1; 1; 10; 100; e 1000 ng) de bradicinina (Sigma, St. Louis, MO) antes e após a perfusão com inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase (L-NAME, 100 µM) por 20 minutos (Claudio *et al.*, 2013). Este protocolo teve como objetivo a avaliação da participação do óxido nítrico na dilatação coronariana induzida pela bradicinina.

3.8- Dissecção das artérias coronárias

O segundo protocolo foi realizado com objetivo de fazer análise das enzimas antioxidantes por meio da técnica de western blot. Para isso, 24 horas após o término da última dose do tratamento, as ratas foram anestesiadas com hidrato de cloral a 10 % (0,4 mg/Kg, i.p.) e posteriormente sacrificadas por decapitação. O tórax foi aberto e o coração retirado e mantido em solução de Krebs Henseleit (em mmol/L: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄·7H₂O,

2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 5,5 glicose e 0,01 Na₂EDTA) a pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e o ramo septal foram isolados com o auxílio de um microscópio de dissecação e congelados rapidamente em nitrogênio líquido e, posteriormente, estocado a -80 °C até a análise.

3.9- Western Blotting

A técnica utilizada para detecção da expressão da eNOS, NADPH oxidase (gp91phox, subunidade catalítica do complexo), catalase e superóxido dismutase-2 (SOD-2) foi a de western blot (n = 5 por grupo).

3.9.1- Extração das proteínas

Após a dissecação das coronárias, estas foram mantidas a -80 °C até o momento da extração proteica, que foi realizada em 130 µL de tampão de lise (10 mM Tris – HCl pH 7,4, 1 mM NaVO₃, 1 % SDS, 0,5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou 10 µg/mL coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4 °C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliqüotados e armazenados a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para avaliação da expressão de eNOS, NADPH oxidase (gp91phox), catalase e SOD-2.

3.9.2- Dosagem das proteínas

A determinação do conteúdo de proteína total foi feita utilizando-se o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Preparou-se o reagente A (48:1:1 – carbonato de sódio 3 % com 0,1 M de NaOH, tartarato de sódio/potássio 4 % e sulfato de cobre 2 %, respectivamente) e o reagente B (reagente de Folin-fenol Ciocalteu – 1:3 em água). A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1 mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham de 5 a 80 µg de proteína. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (5 µL) foram utilizadas para as dosagens. Todos os tubos de ensaio foram completados para um volume final de 250 µL, sendo posteriormente adicionados 2,5 mL da solução A. Após 10 minutos, se

adicionou 0,25 mL da solução B. A absorbância foi medida a 660 nm depois de 10 minutos. Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

3.9.3- *Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)*

De forma a se alcançar a otimização das condições para o ensaio do western blot, experimentos preliminares foram realizados a fim de se definir as melhores condições de separação, qualidade da banda e diluições do anticorpo. Dessa forma, diferentes quantidades de extratos proteicos foram utilizadas dependendo da proteína a ser detectada.

As amostras foram submetidas à SDS-PAGE, 10% preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS, e o gel de empacotamento 4% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,1 % de SDS. As amostras foram aplicadas nos géis na presença de tampão de amostra (Tris-HCl, SDS, glicerol, DTT e azul de bromofenol). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1 % de SDS), a 80 volts. Os procedimentos relativos à eletroforese foram realizados segundo o sistema descrito por Laemmli (1970).

3.9.4- *Transferência das proteínas*

Depois de separadas, as proteínas das amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando um sistema de transferência realizada em cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4 °C com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20 % (v/v) de metanol, por 55 minutos a 10 volts.

3.9.5- *Incubação dos anticorpos*

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5 %) em tampão TBS- tween 0,1 % (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos para eNOS (1:2500, BD Bioscience), gp91phox (1:2000, BD Biosciences), SOD-2 (1:500, BD Biosciences), catalase (1:2500, Sigma Aldrich) e para β -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology,

Inc.) por 4 horas a temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1 %, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1 %, e posteriormente com tampão TBS.

A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada utilizando-se o Kit comercial NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ (*domínio público*). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos como porcentagem de expressão em relação ao grupo Sham Água.

3.10- Determinação de peroxidação lipídica (TBARS)

O ensaio para quantificação do TBARS baseia-se na reação do MDA com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 5), em meio ácido, e em alta temperatura, formando um produto colorido que pode ser medido fluorometricamente ou espectrofotometricamente a 532 nm (Vasconcelos *et al.*, 2007).

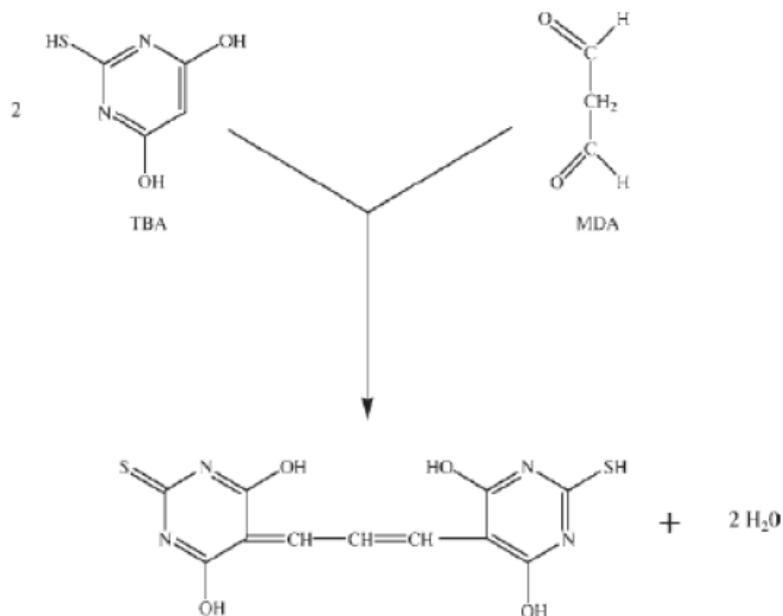


Figura 5: Representação da reação da molécula de ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdéido (MDA). (Willianson *et al.*, 2003).

100 µL de plasma foram adicionadas à 100 µL de uma solução gelada de TBA (TBA 1 %, NaOH 0,05 M e BHT 0,1 mM) e 100 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) concentrado. As amostras foram incubadas no banho-seco por 25 minutos a 98 °C e, em seguida, acondicionados no freezer por 10 minutos. Posteriormente, 375 µL de butanol foram adicionados aos tubos que foram agitados no vórtex, por 10 segundos e em seguida, centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm (00719 g). A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm e 600 nm. A concentração do TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156/ (mM x cm) (Hermes-Lima; Willmore; Storey ,1995).

3.11- Dosagens Sorológicas

3.11.1- Perfil Lipídico

Para realização das dosagens sorológicas foram coletados 5 mL de amostras de sangue pelo método de decapitação após 24 horas do término do tratamento. Em seguida, o sangue foi centrifugado (Excelsa® IV Modelo 280r) à 3500 rpm (02204 g) durante 15 minutos à 4 °C, o soro foi retirado e estocado à -20 °C. As concentrações de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG),

colesterol de alta densidade (HDL) e colesterol de baixa densidade (HDL) foram determinados pelo método enzimático de Kits Colestat Enzimático AA, TG Color GPO/PAP AA e HDL Colesterol Monofase AA Plus respectivamente em espectrofotômetro Konelab, modelo 600i. As concentrações de LDL e VLDL foram determinadas utilizando a equação de Friedewald (Friedewald; Levy; Fredrickson, 1972): Colesterol VLDL = Triglicérides/5 e Colesterol LDL = Colesterol total - (HDL + VLDL).

3.11.2- Perfil Hormonal

Para realização das dosagens sorológicas foram coletados 5 mL de amostras de sangue pelo método de decapitação após 24 horas do término do tratamento. Em seguida, o sangue foi centrifugado (Excelsa® IV Modelo 280r) à 3500 rpm (02204 g) durante 15 minutos à 4 °C, o soro foi retirado e estocado à -20 °C. As concentrações de estrogênio e progesterona foram determinadas por imunoenensaio de eletroquimioluminescência utilizando kit enzimático Cobas® e quantificado em analisador Roche Elecsys® 2010.

3.12- Remoção e pesagem dos coxins de gordura

Após remoção do coração e coleta de sangue dos animais, abertura de toda a cavidade abdominal foi feita expondo os órgãos internos dando acesso aos coxins gordurosos. Primeiramente, para retirar a gordura mesentérica, o intestino foi separado do estômago e cuidadosamente toda a gordura que envolve o intestino foi removida. Em seguida, a gordura parametrial foi isolada dos tecidos adjacentes e cuidadosamente removida. Para retirar a gordura perirenal, os rins foram isolados e a gordura removida do órgão para em seguida fazer a remoção da gordura retroperitoneal. Após a retirada, rapidamente os coxins gordurosos foram pesados em balança de precisão (SHIMADZU AUY 220).

3.13- Análise dos Dados

A análise dos dados foi realizada pelo programa estatístico Graph-Pad Prism 6. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A pressão arterial sistólica, PPC basal, níveis de MDA, análise da expressão das enzimas antioxidantes, perfil hormonal, perfil lipídico assim como, os pesos das gorduras e peso uterino foram realizadas por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Para a análise da resposta vasodilatadora a bradicinina foi utilizada a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). Para verificar entre quais grupos houveram diferenças foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey para ANOVA de uma via e Bonferroni para ANOVA de duas vias, e considerado como significativo o valor de $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A eficácia do tratamento é demonstrada na figura 6, onde foi observada uma redução da PAS ao final do tratamento em ambos os grupos (Sham Romã, $151 \pm 2,5$ mmHg e OVX Romã, $151 \pm 2,5$ mmHg) comparado aos seus respectivos controles (Sham Água, $170 \pm 3,6$ mmHg e OVX Água, $165 \pm 3,4$ mmHg).

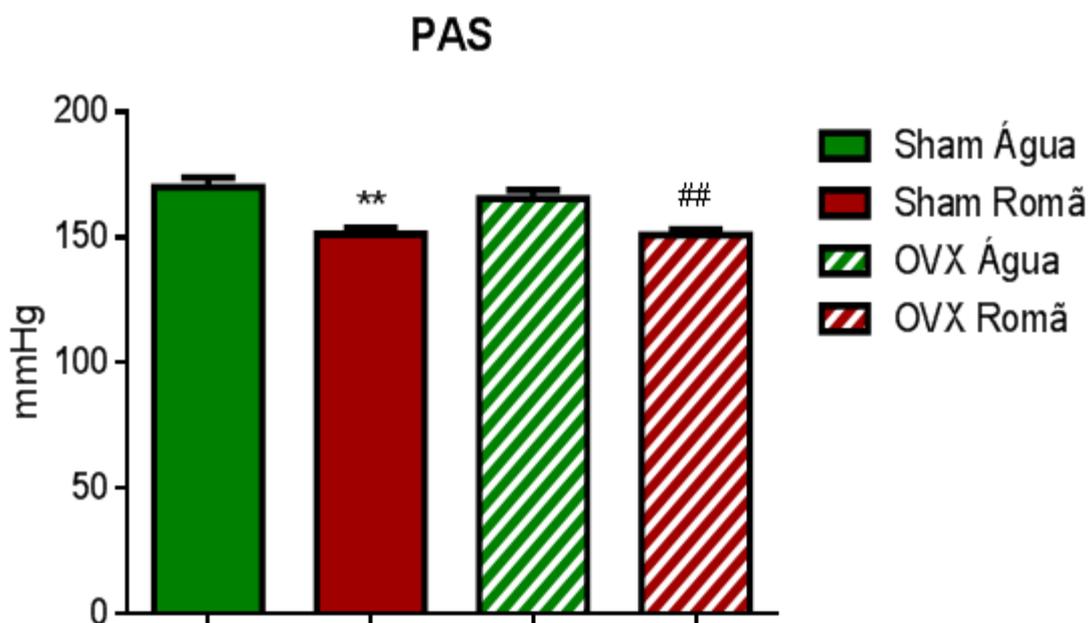


Figura 6: Efeito do tratamento sobre a pressão arterial sistólica, em ratos SHR Sham Água ($n = 10$) e Sham Romã ($n = 11$) e SHR OVX Água ($n = 11$) e OVX Romã ($n = 11$). A pletismografia de calda foi realizada no 30º dia de tratamento. Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo Sham Água e ## $p < 0,01$ comparado com o grupo OVX Água.

A figura 7 indica a evolução da hipertensão nos grupos Sham e OVX. Podemos observar que os animais já eram hipertensos com 4 semanas tanto no grupo Sham ($164,9 \pm 3,7$ mmHg) como no grupo OVX ($154,8 \pm 3,6$ mmHg). Podemos notar ainda que o aumento da PAS foi significativo no grupo OVX quando comparado o início do protocolo experimental ($154,8 \pm 3,6$ para $173,3 \pm 4,0$ mmHg). O tratamento com a romã reverteu significativamente o aumento

da PAS, tanto no grupo Sham, Romã Final ($150,3 \pm 2,5$ mmHg), como no OVX, Romã Final ($149,7 \pm 1,5$ mmHg).

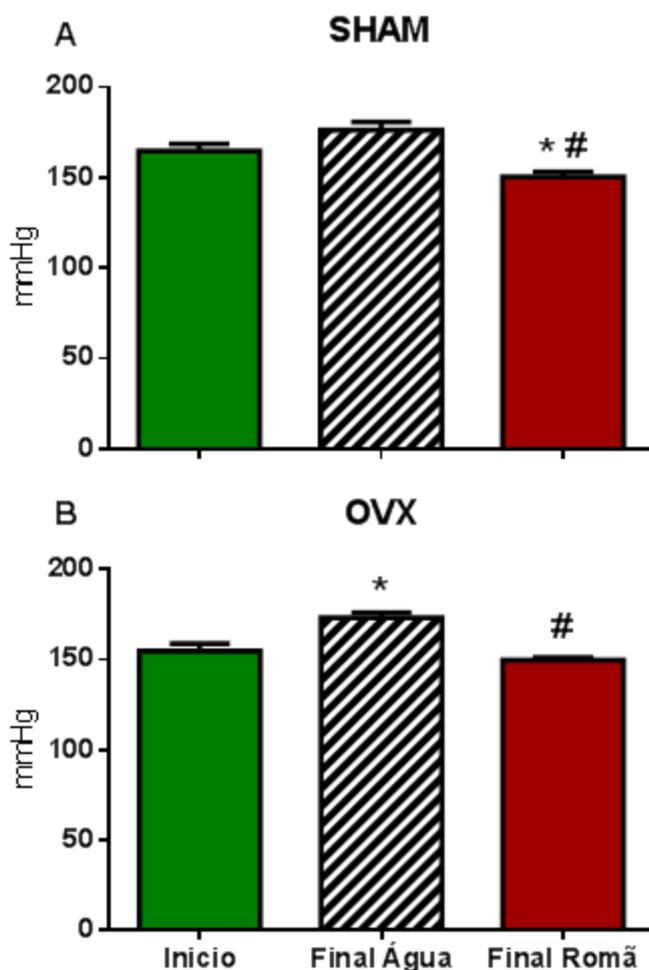


Figura 7: Efeito do tratamento sobre a pressão arterial sistólica em ratas Sham (A) antes do tratamento (Início, $n = 10$), final do tratamento grupo Água ($n = 10$) e final do tratamento grupo Romã ($n = 11$). (B) OVX antes do tratamento (Início, $n = 16$), final do tratamento grupo Água ($n = 10$) e final do tratamento grupo Romã ($n = 14$). Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Início e # $p < 0,05$ comparado com o grupo Final Água Final.

4.2- Pressão de Perfusão Coronariana Basal.

Conforme mostrado na figura 8, não observamos diferenças na PPC basal, entre o SHAM e OVX. No entanto, o tratamento reduziu significativamente a PPC basal no grupo Sham (Água $137 \pm 5,8$ mmHg para Romã $110 \pm 4,7$ mmHg). não sendo capaz de promover o mesmo efeito sobre o grupo OVX (Água $129 \pm 5,5$ mmHg e Romã $124 \pm 3,2$ mmHg).

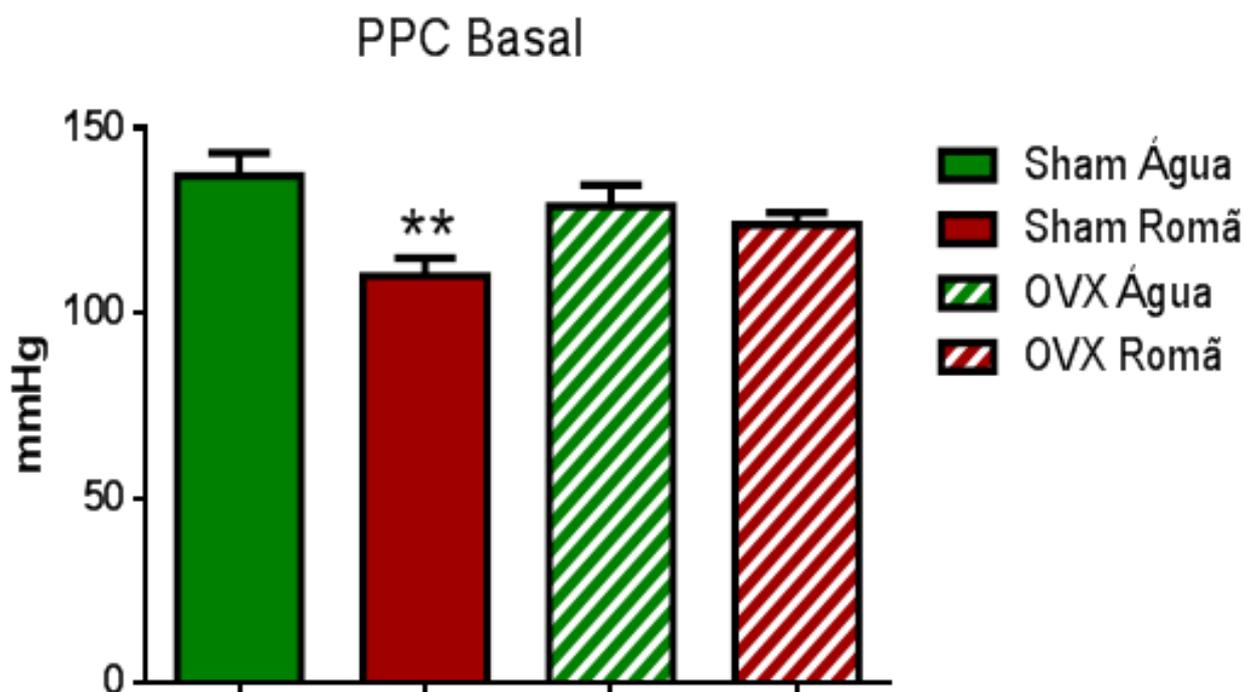


Figura 8: Efeito do tratamento sobre a pressão de perfusão coronariana basal de ratas SHR Sham Água (n = 9), Sham Romã (n = 11), OVX Água (n = 12) e OVX Romã (n = 10). Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo Sham Água.

4.3- Resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Na figura 9 analisamos a funcionalidade do endotélio por meio da resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina, foi verificado que as ratas tratadas com romã, tanto do grupo Sham quanto do grupo OVX tiveram melhora significativa na vasodilatação dependente do endotélio somente nas últimas doses (10, 100 e 1000 ng). Analisando de maneira global, é possível dizer que esta resposta pode estar relacionada à recuperação da funcionalidade endotelial melhorando a resposta frente uma disfunção endotelial, característica de animais SHR.

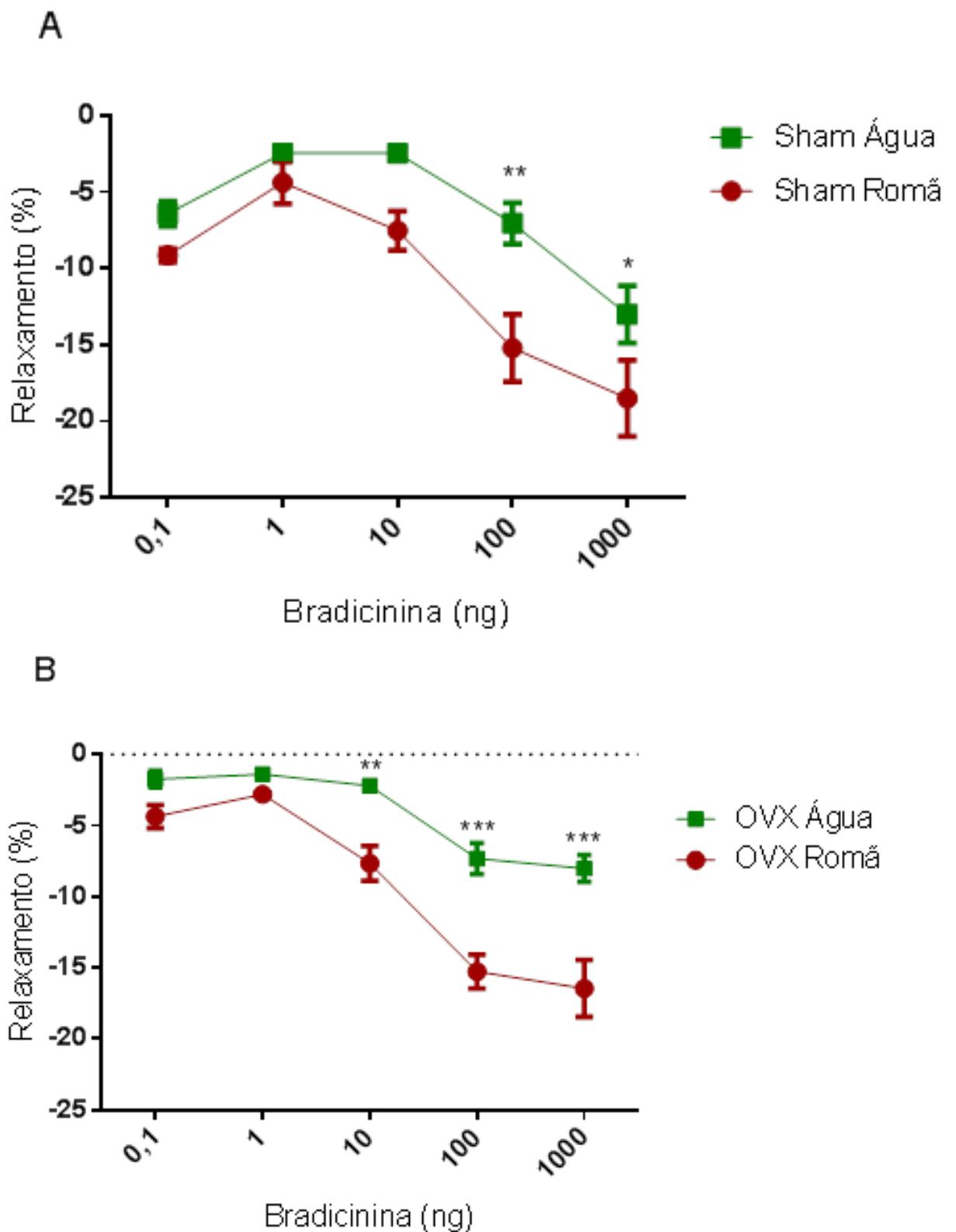


Figura 9: Curva dose resposta de bradicinina (0,1 – 1000 ng) em ratas SHR (A) Sham e (B) Ovariectomizadas tratadas durante período de 30 dias com extrato bruto de *Punica granatum*. Os dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

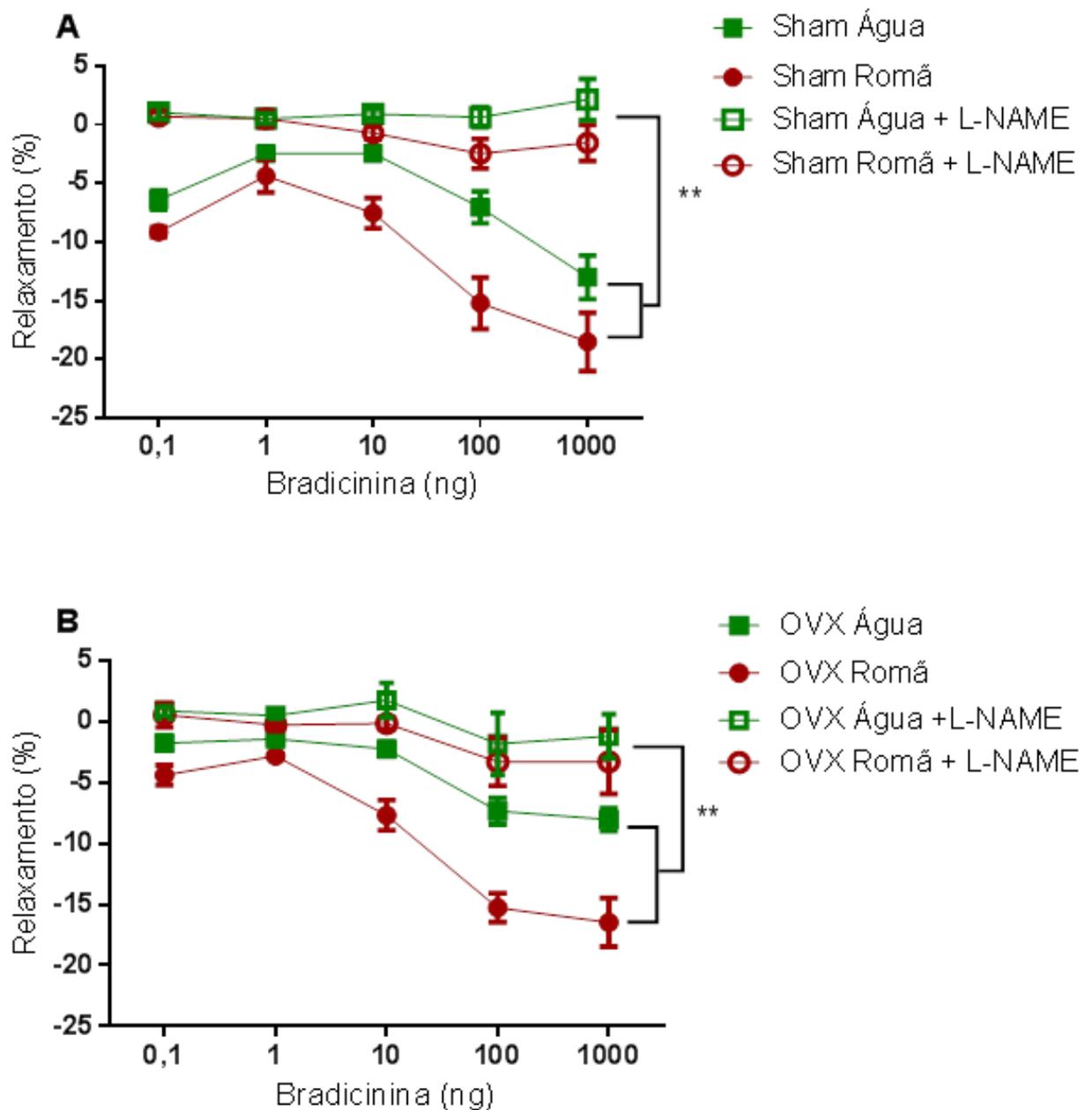


Figura 10: Curva dose resposta de bradicinina (0,1 – 1000 ng) na presença de L-NAME em ratas SHR (A) Sham e (B) Ovariectomizadas. Os dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Na figura 10 apresentamos a curva dose resposta da Bradicinina após inibição da eNOS com 10 μ M de L-NAME. Podemos verificar que a resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina foi significativamente inibida, tanto nos grupos Sham como no OVX.

4.4- Análise Malondialdeído

Os marcadores usados para monitorar a peroxidação lipídica pertencem à classe das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A peroxidação lipídica origina produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos que podem ser utilizados para avaliar o *status* oxidativo de materiais biológicos. Entre os biomarcadores mais avaliados para a peroxidação lipídica estão o malondialdeído (MDA) e o F2-isoprostano (Dotan, Lichtenberg, Pinchuk, 2004). A figura 10 indica a análise do estresse oxidativo e foi observado que o tratamento reduziu significativamente os níveis de MDA no grupo Sham Romã ($8 \pm 0,9$ nmol/mL) comparado ao grupo Sham Água (16 ± 2 nmol/mL). Entretanto, não foi verificado o mesmo efeito no grupo OVX (OVX Água: $16 \pm 0,9$ nmol/mL e OVX Romã: $13 \pm 0,8$ nmol/mL).

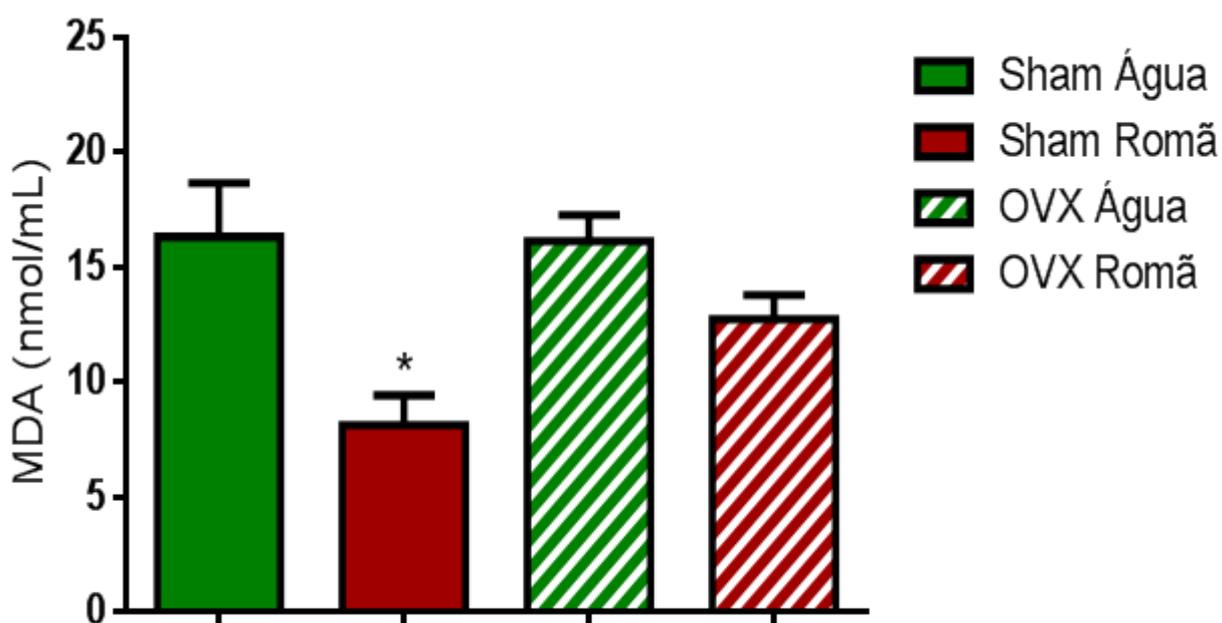


Figura 11: Análise dos níveis de malondialdeído (Sham Água = 5, Sham Romã= 4, OVX Água n = 5 e OVX Romã n = 6). Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham Água.

4.5- Expressão das enzimas antioxidantes

Ao analisar a expressão protéica de enzimas antioxidantes (Catalase, SOD, eNOS e subunidade da NADPHoxidase (gp91phox), observamos que o tratamento influenciou somente o aumento da SOD no grupo OVX (OVX Água, $0,8199 \pm 0,091$ vs OVX Romã, $1,307 \pm 0,124$), não apresentando diferenças no grupo Sham. Em relação à enzima eNOS e a subunidade da NADPHoxidase observamos que ovariectomia promoveu a redução significativa na expressão dessas proteínas e o tratamento com romã não modificou o padrão de resposta. A análise da expressão da enzima catalase mostra que não houve alteração entre os grupos.

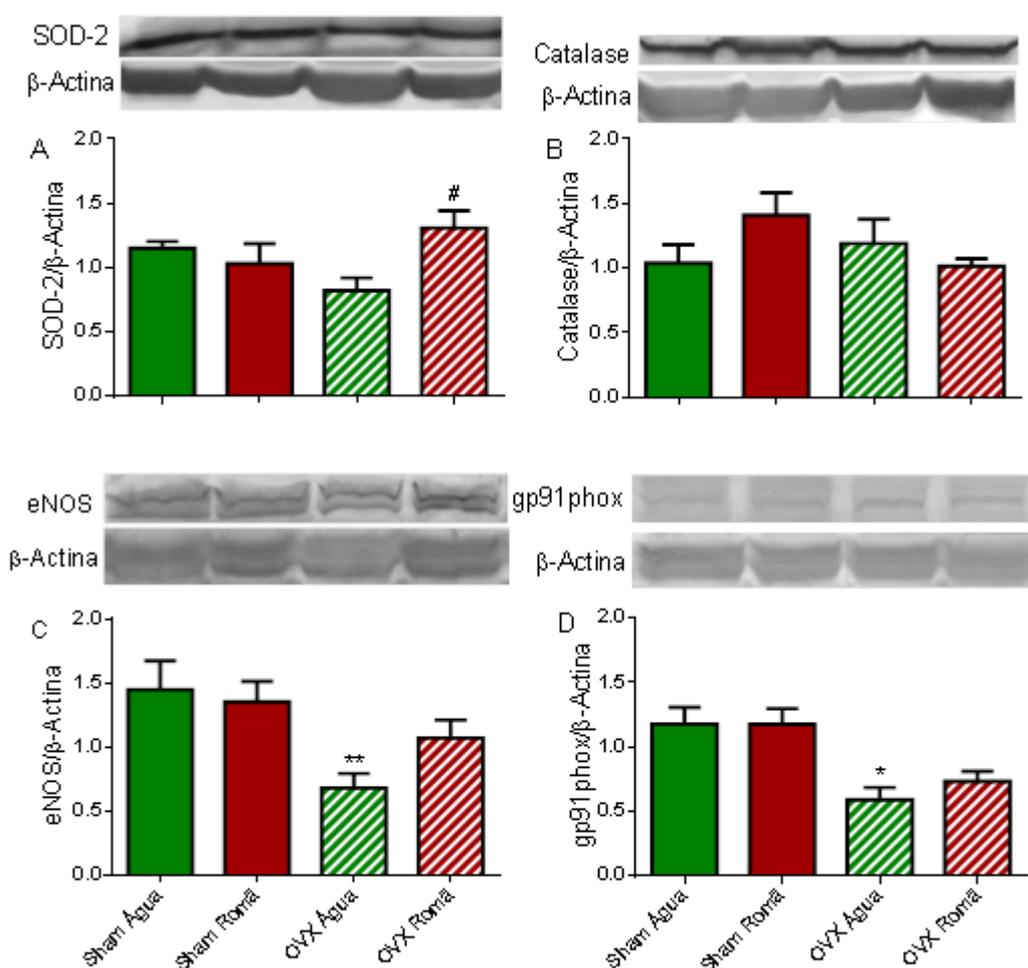


Figura 12: Análise de expressão proteica de ratas Sham e OVX tratadas. (A) Catalase, n = 5, (B) Superóxido dismutase, n = 6, (C) eNOS, n = 5) e (D), n = 5). Os dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Sham Água. # $p < 0,05$ comparado com o grupo OVX Água.

4.6- Perfil Lipídico

Na figura 13 apresentamos a análise do perfil lipídico dos grupos SHR Sham e Romã. Observamos que o tratamento com romã reduziu significativamente os níveis de colesterol total e de LDL no grupo Sham Romã (CT: $38,9 \pm 2,9$ mg/dL e LDL: $14,0 \pm 0,6$ mg/dL) comparado ao veículo (CT: $54,3 \pm 5,4$ mg/dL e LDL: $20,9 \pm 1,5$ mg/dL). No grupo OVX, o tratamento com Romã reduziu significativamente os níveis de triglicérides e LDL (TG: $37 \pm 3,1$ mg/dL e LDL: $18,2 \pm 1,5$ mg/dL) comparado ao veículo (CT: $64,8 \pm 4,5$ mg/dL e LDL: $24,3 \pm 1,7$ mg/dL). Os níveis de HDL não foram alterados em nenhum dos grupos estudados.

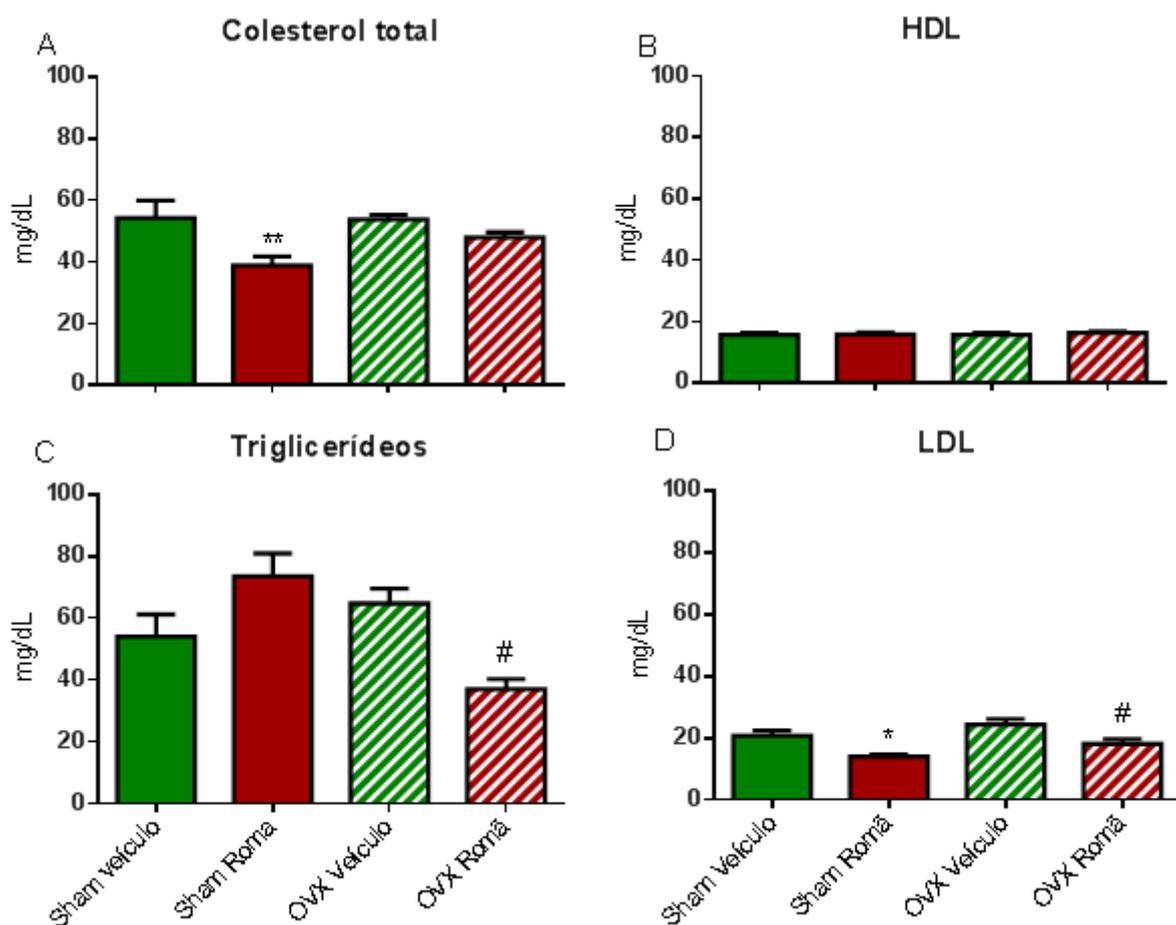


Figura 13: Perfil lipídico de ratas Sham e OVX tratadas. (A) Colesterol total, n = 11, (B) Triglicérides, TG, n = 10, (C) Lipoproteína de alta densidade, HDL, n = 10 e (D) Lipoproteína de baixa densidade, LDL, n = 10. Os dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Sham Água. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo Sham Água. # $p < 0,05$ comparado com o grupo OVX Água.

4.7- Perfil Hormonal

Nos últimos anos, tem-se estudado bastante a concentração de fitoestrógenos que o extrato da *Punica granatum* apresenta. A relação entre o consumo de romã e fertilidade é bem reconhecida entre os povos antigos, portanto, diante disso resolvemos verificar as dosagens de estrogênio e progesterona após o tratamento. De acordo com figura 14/A o tratamento não aumentou a concentração de estrogênio no grupo Sham Romã ($62,3 \pm 14,5$ pg/mL) comparado ao seu grupo controle, Sham Água ($32,3 \pm 5$ pg/mL). Entretanto, no grupo OVX observa-se um surpreendente aumento no grupo Romã ($56,6 \pm 8,5$ pg/mL) comparado com o grupo Água ($7,3 \pm 2$ pg/mL). Além disso, observa-se também que a ovariectomia foi eficaz em reduzir os níveis de estrogênio no grupo OVX Água comparado com o grupo Sham Água.

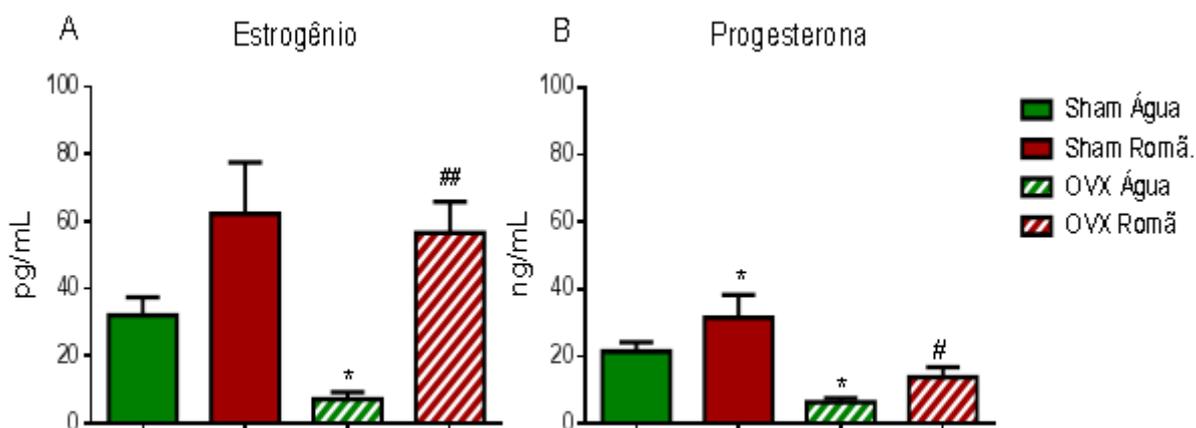


Figura 14: Avaliação dos níveis hormonais de (A) estrogênio, n = 9 e (B) progesterona, n = 7. Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. * p < 0,05 comparado ao grupo Sham Água, ## p < 0,01 comparado ao grupo OVX água.

Ao analisar a figura 14/B é possível observar que o tratamento aumentou os níveis de progesterona no grupo Sham Romã ($39,2 \pm 5,5$ pg/mL) comparado com o grupo Sham Água ($21,4 \pm 2,6$ pg/mL). O grupo OVX Romã ($16 \pm 3,1$ pg/mL) também apresentou este aumento comparado com o grupo OVX Água ($5,5 \pm 0,8$ pg/mL). Novamente, a castração foi eficaz em reduzir os níveis de progesterona ao analisarmos os grupos OVX Água vs. Sham Água.

4.8- Peso corporal e dos órgãos

Na tabela 1 e figura 15 podemos observar que o tratamento com a romã não alterou o peso corporal dos animais Sham Romã ($152 \pm 1,9$ g) comparado ao seu grupo controle (Sham Água, $141 \pm 4,0$ g). Apesar de estar claro na literatura o ganho de peso nos animais após a castração, verificou-se que não houve aumento significativo do peso no grupo OVX Água ($152 \pm 3,7$ g) comparado com o Sham Água. Entretanto, o tratamento aumentou o peso dos animais OVX Romã ($173 \pm 3,3$ g) comparado com o grupo OVX Água. Observando o gráfico B e C, está claro que houve redução no peso relativo do útero após a castração (Sham Água, $1,51 \pm 0,12$ mg/g; Sham Romã, $1,50 \pm 0,06$ mg/g; OVX Água, $0,15 \pm 0,02$ mg/g e OVX Romã, $0,11 \pm 0,01$ mg/g), todavia o tratamento com a romã não alterou significativamente o peso dos mesmos, resultado parcialmente benéfico quando analisado dentro do conjunto das terapias alternativas na TRH.

Tabela 1: Peso corpora e útero e peso relativo do útero e dos coxins de gordura.

Parâmetros	Sham Água n = 10	Sham Romã n = 10	OVX Água n = 10	OVX Romã n = 10
Peso final (g)	$141 \pm 4,0$	$152 \pm 1,9$	$152 \pm 3,7$	$173 \pm 3,3^{##}$
Peso útero (mg)	210 ± 19	231 ± 11	$28 \pm 4,6^{**}$	$19 \pm 1^{§§}$
Peso relativo do útero (mg/g)	$1,51 \pm 0,13$	$1,50 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,02^{**}$	$0,12 \pm 0,01^{§§}$
Peso da gordura Mesentérica (mg/g)	$4,64 \pm 0,22$	$8,67 \pm 0,34$	$6,51 \pm 0,52$	$8,92 \pm 0,29^{\#}$
Peso da gordura Perirenal (mg/g)	$1,87 \pm 0,12$	$2,47 \pm 0,11^{**}$	$1,17 \pm 0,07^{**}$	$1,84 \pm 0,16^{\#}$
Peso da gordura Retroabdominal (mg/g)	$0,96 \pm 0,11$	$2,23 \pm 0,14^{**}$	$1,51 \pm 0,06$	$2,41 \pm 0,24^{##}$
Peso da gordura Parametrial (mg/g)	$1,88 \pm 0,12$	$4,64 \pm 0,22^{**}$	$1,66 \pm 0,18$	$2,83 \pm 0,27^{##}$

Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o grupo Sham Água e # $p < 0,05$, ##. $p < 0,01$ comparado com o grupo OVX Água e §§ $p < 0,01$ comparado com o grupo Sham Romã.

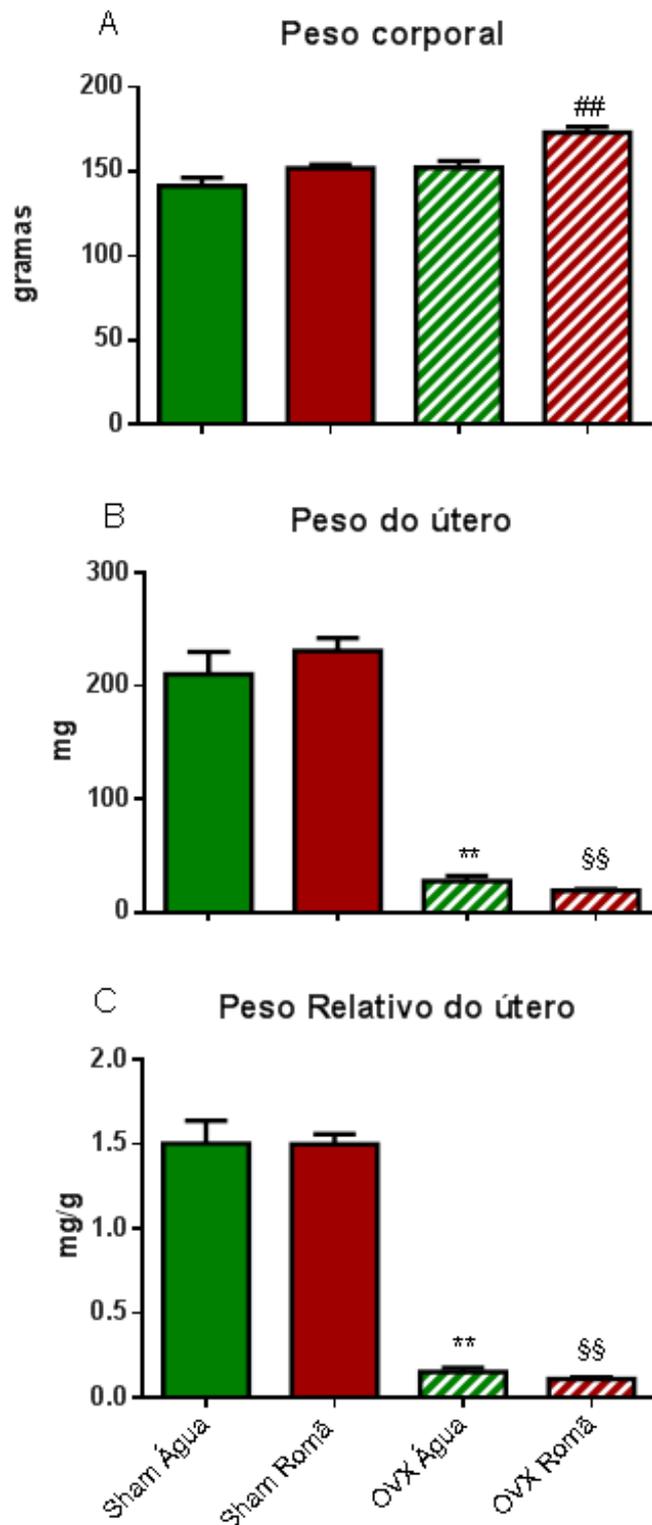


Figura 15: Efeitos do tratamento sobre (A) peso corporal de ratas SHR Sham Água (n=10), Sham Romã (n=15), OVX Água (n=10) e OVX Romã (n=10). (B) peso do útero das ratas SHR Sham Água (n=8), Sham Romã (n=12), OVX Água (n=11) e OVX Romã (n=12). Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo Sham Água ## $p < 0,01$ comparado com o grupo OVX Água e §§ $p < 0,01$ comparado com o grupo Sham Romã.

Em relação aos coxins de gordura, apresentados na tabela 1 e figura 16 é possível verificar que os animais do grupo Sham Romã obtiveram um aumento significativo das gorduras perirenal, retroperitoneal e parametrial quando comparados ao Sham Água, contudo o tratamento não foi eficaz em aumentar o peso da gordura mesentérica nos animais Romã. Já os animais OVX romã obtiveram peso relativo dos coxins de gordura da região mesentérica, perirenal, retroperitoneal e parametrial significativamente maior em relação aos seus respectivos controles.

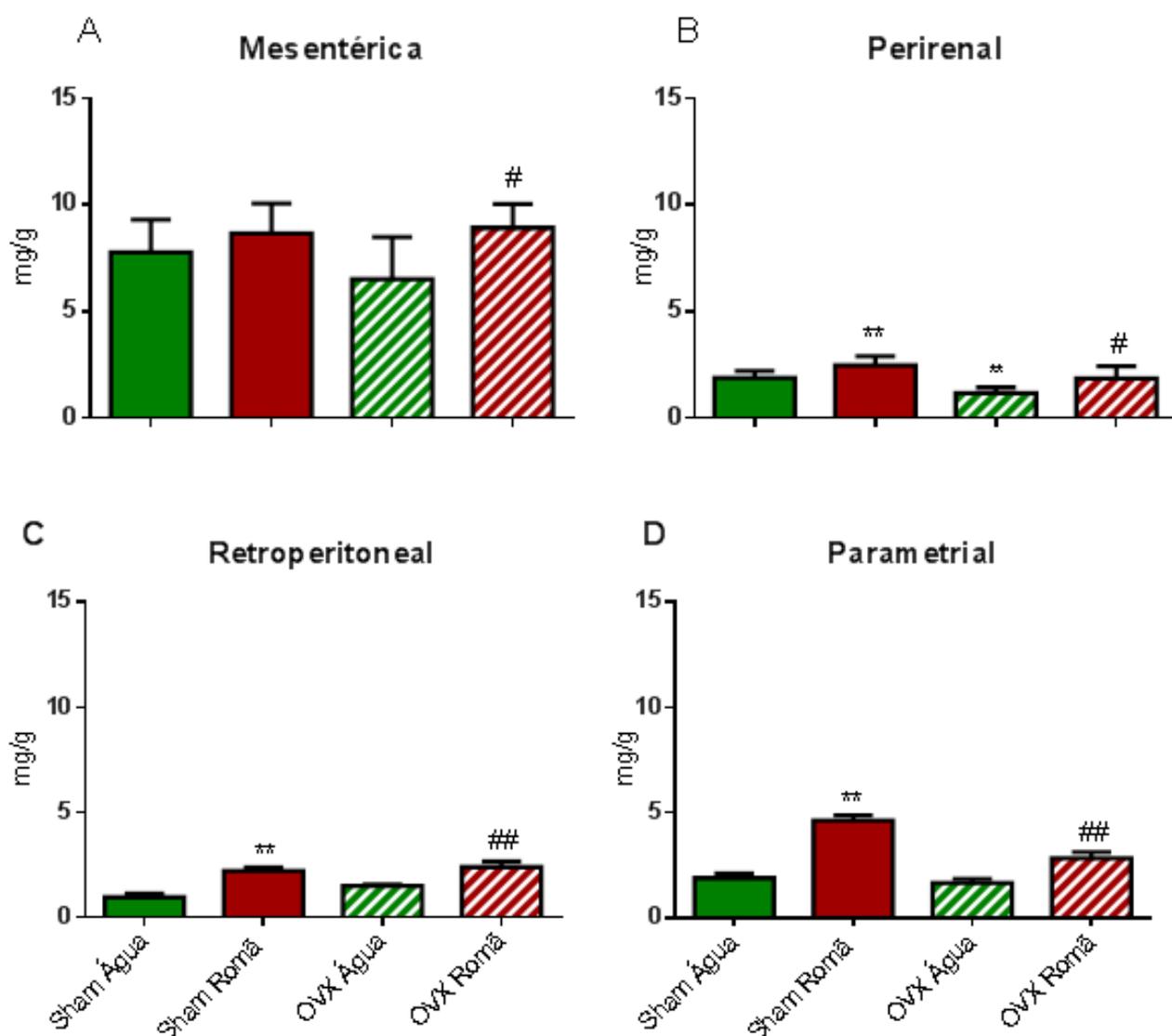


Figura 16: Efeito do tratamento sobre os coxins de gordura, (A) Mesentérica, n = 10, (B) Perirenal, n = 10), (C) Retroperitoneal, n = 10), (D) Parametrial, n=10). Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o grupo Sham Água e # $p < 0,05$ e ##. $p < 0,01$ comparado com o grupo OVX Água.

4.9- Caracterização fitoquímica

TESTES	EXTRATO ALCÓOLICO DA CASCA		
	ARTIGO	LABORATÓRIO	Fração 50% etanol
I. Teste para Triterpenóides e esteroides			
Teste de Liebermann Burchard	-	NF	
Teste com clorofórmio, anidrido acético e H ₂ SO ₄	NF	+	-
II. Teste para Glicosídeos			
Teste Keller Killiani	-	NF	
Água de bromo	-	NF	
Teste com Nitroprussiato de sódio a 5%	NF	+	+
Reativo de Baljet	NF	+	+
III. Teste para Saponinas			
Teste da Espuma	-	+	
IV. Teste para Alcalóides			
Hager's Test	-	NF	
Reativo de Bouchardt	NF	-	
Reativo de Dragendorff	NF	-	
V. Teste para Flavonóides/Fenóis			
Teste com FeCl ₃	+	+	+
Teste com reagente alcalino	+	+ (Flavonóis)	
Teste com reagente ácido	NF	-	
Teste com solução de acetato	+	NF	
VI. Teste para Taninos			
Teste da gelatina	+	NF	
Teste com FeCl ₃	NF	+	+
VII. Teste para proteínas			
Teste de Biureto	-	-	
Espectroscopia	NF	-	
VIII. Teste para aminoácidos livres			
Teste com nihidrina	-	-	
IX. Teste para Carboidratos			
Teste de Benedict	+	NF	
Teste com Lugol	NF	-	

Açúcares Redutores (Reativo de Fehling)	NF	+	+
Açúc. Não Redutores/heterosídeos (R. de Fehling)	NF	+	+
X. Teste para Vitamina C			
Teste DNPH	-	NF	
XI. Teste para Ácidos Orgânicos			
Reativo de Pascová	NF	+	-

Tabela 2: Caracterização fitoquímica do extrato bruto da casca da romã, fração de 50 % comparado ao artigo de Bhandary *et al.* (2013). Legenda: NF = não fez, + = presente e - = não presente.

A caracterização fitoquímica do extrato bruto e da fração de 50 % está apresentada na tabela 2. Foram retiradas 4 frações etanólicas, 30, 50, 70 e 95 % do extrato bruto para posterior teste em reatividade vascular. Dentre elas, apenas a fração de 50 % foi que apresentou resposta de vasorelaxamento (dados não mostrados). Com isso, somente esta fração de 50% foi a que passou pela caracterização fitoquímica. Os resultados obtidos por meio da fitoquímica qualitativa no extrato bruto e fração etanólica de 50 % comparado com o artigo de Bhandary *et al.* (2013). No extrato bruto foram encontrados triterpenóides, glicosídeos, saponinas, flavonóides, taninos, carboidratos e ácidos orgânicos, enquanto que a fração etanólica de 50 %, os mesmos metabólitos foram encontrados exceto os ácidos orgânicos e triterpenóides.

5- DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* ou romã (EHR) sobre a pressão arterial, pressão de perfusão coronariana basal e reatividade vascular no leito coronariano, além dos perfis lipídico e hormonal, gordura corporal e níveis de peroxidação lipídica.

A hipertensão é um fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares, que por sua vez, estão relacionadas ao aparecimento do estresse oxidativo, caracterizado pela excessiva formação de EROs e incapacitando o sistema de defesa antioxidante em neutralizar estes agentes promovendo então, o desenvolvimento da disfunção endotelial (Hamilton *et al.*, 2001; Förstermann, 2010) que é caracterizada por um desequilíbrio na liberação entre EDRF e fatores de contração derivado do endotélio (EDCF). A presença de altas concentrações de EROS no meio intracelular induz aumento na liberação de EDCF após ativação dos receptores muscarínicos pela acetilcolina. Tal resposta é acompanhada por aumento rápido na concentração de cálcio nas células endoteliais que precede a ativação da vida da ciclooxigenase, produção de EROS e ativação de receptores de tromboxano-prostanóides. Para que ocorram as contrações derivadas do endotélio, primeiramente requer um acúmulo de cálcio no meio intracelular (Tang *et al.*, 2007). Em ratos SHR, a enzima ciclooxigenase exerce um papel pivotal, transformando o ácido araquidônico em endoperóxidos e esses precursores de prostaglandinas são liberados durante as contrações dependentes do endotélio (Vanhoutte, 2009). Portanto, diante deste quadro a hipertensão é um fator que promove disfunção endotelial e as altas concentrações de EROS é requisito para ativação de vias vasoconstritoras, como por exemplo, a via da ciclooxigenase.

Contudo, o meio intracelular é uma verdadeira produtora de EROS devido a presença de vários sistemas enzimáticos que liberam EROs, cuja síntese ocorre naturalmente em organismo aeróbicos. Dentre eles podemos citar: o sistema NADPH oxidase, xantina oxidase, cadeia mitocondrial, produtos

provenientes do metabolismo do ácido araquidônico e a partir da eNOS desacoplada (Madamanchi *et al.*, 2005). Ressaltando, que a própria eNOS é uma produtora de EROs, mesmo quando níveis de cofatores estão normais (Matoba *et al.*, 2000) Evidências mostram que o estresse oxidativo exerce papel fundamental na progressão da hipertensão (Hirata & Satonaka, 2001). A alta concentração de EROs na hipertensão está relacionada, principalmente, com ativação do sistema NADPH oxidase (Stamler *et al.*, 1989; Alderman *et al.*, 1991; Rey *et al.*, 2001), onde o aumento da atividade do SRAA induz maior formação de angiotensina II que ao se ligar em receptores receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1) ocorre estimulação do complexo NADPH oxidase que promove a formação de EROs pelo endotélio, que por sua vez reduz a biodisponibilidade de NO promovendo danos na função vascular (Förstermann, 2010). Dessa forma, na disfunção endotelial há elevação da pressão arterial por efeito vasoconstritor direto das EROs ou indireto por redução da atividade de vasodilatadores como o NO (Reckelhoff & Romero, 2003).

Além da disfunção endotelial, a hipertensão induz efeitos aterogênicos provenientes da falta de NO prejudicando ainda mais a função endotelial, são eles: transcrição de moléculas pró-aterogênicas como moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1), aumento do recrutamento de leucócitos mononucleares iniciando formação de quadro inflamatório ou aterosclerótico no endotélio, aumento da oxidação do LDL, aumento da proliferação do MLV e promove agregação plaquetária (Alexander, 1995).

Portanto, está claro que a hipertensão induz 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). Atualmente, há várias terapias anti-hipertensivas utilizadas na área clínica como: bloqueadores de canais de cálcio (Taddei *et al.*, 1997), bloqueadores β -adrenérgicos (Frishman, 2003; Maggi *et al.*, 1996). Entretanto, nas últimas décadas estudos clínicos têm priorizado inibidores da ECA como forma de tratamento contra efeitos induzidos pela hipertensão sobre o sistema cardiovascular (Gavras *et al.*, 1978; Rubin *et al.*, 1978). ECA é uma metalopeptidase pertencente ao eixo SRAA responsável por manter a

estabilidade hemodinâmica evitando redução na perfusão tecidual sistêmica por meio de vasoconstrição arteriolar periférica aumentando a volemia. Em sua estrutura química há dois domínios homólogos denominados de domínio N e domínio C que são alvos de inibidores da ECA (Dzau *et al.*, 2001). Estes agentes inibidores podem possuir inúmeros efeitos sobre o sistema cardiovascular tais como, hipotensores, efeitos anti-proliferativos sobre a musculatura lisa vascular (Griendling *et al.*, 1989), efeitos inibitórios sobre a agregação plaquetária (Chobanian *et al.*, 1990) e inibição da peroxidação lipídica (Kowala *et al.*, 1994). O captopril é agente inibidor da ECA mais conhecido e muito utilizado no tratamento de HAS e em alguns casos de insuficiência cardíaca (Pfeffer *et al.*, 1992).

Ao observar que a HAS está relacionada com produção excessiva de EROs e estresse oxidativo, seria válido investigar como forma de tratamento anti-hipertensivo a utilização de substâncias naturais com altas concentrações de agentes antioxidantes. Portanto, um dos objetivos deste estudo foi verificar como o tratamento com EHR e o estrogênio modulam a PAS de ratas hipertensas jovens nos grupos Sham e OVX. A ovariectomia aumentou a pressão após 30 dias, comparado ao mesmo grupo, contudo este aumento não foi diferente dos ratos Sham. Ao analisar a influência do tratamento sobre este parâmetro, observamos que além de atenuar a PAS o tratamento foi capaz de prevenir a sua progressão da hipertensão tanto nos animais Sham quanto nos OVX.

O organismo por si só é um produtor natural de EROs e para neutralizar todas estas espécies reativas é necessário um sistema de proteção composto por enzimas antioxidantes que pode ser classificado em sistema antioxidante enzimático e sistema antioxidante não enzimático (Halliwell & Gutteridge, 1985; Halliwell, 1987). Este último é proveniente de uma alimentação equilibrada. Neste grupo se enquadram os carotenóides, tocoferóis, vitamina C e os polifenóis (Kizhakekuttu & Widlansky, 2010).

O sistema antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir a formação de EROs, neutralizar a EROs já formadas e reparar os danos causados pelos mesmos. Funciona como sistema de tríade, atuando na prevenção, varredura

(*scavenger*) e na reparação (Madamanchi *et al.*, 2005). Portanto, aqueles alimentos com maiores concentrações de substâncias antioxidantes possuem potencialmente melhores resultados contra efeitos deletérios provenientes da HAS, como a *Punica granatum*. Ressaltando que de vários frutos estudados a romã é aquela com maior concentração de polifenóis (Jayakumar & Kanthimathi, 2011) e possui potente atividade antioxidante em relação aos outros frutos devido à qualidade dos polifenóis presentes no fruto (Ignarro *et al.*, 2006). O ácido elágico é o polifenól encontrado em maiores concentrações no EHR e pertencente à classe dos taninos hidrolisáveis (Cerdá *et al.*, 2003a/b).

A presença de altas concentrações de polifenóis que possuem potente atividade antioxidante, fazem deste fruto importante agente terapêutico apresentando efeitos anti-hipertensivos e anti-ateroscleróticos. Além disso, esta substância é capaz de aumentar a atividade e expressão da eNOS e reduzir a proliferação de células do MLV (Ignarro *et al.*, 2006) e atuar como *scavenger* das EROs evitando com que o NO formado seja oxidado em substâncias altamente tóxicas como peróxido nitrito (ONOO^-) (Rodrigues *et al.*, 2012; Van Den Ende *et al.*, 2011), inibir a agregação plaquetária por meio da inibição da via fosfolipase do tipo $\text{C}\gamma_2$ e proteína cinase do tipo C ($\text{PLC}\gamma_2\text{-PKC}$) e Proteína cinase ativada por mitógenos e proteína cinase B (MAPK/Akt) tanto em humanos quanto em camundongos hipercolesterolêmicos (Chang *et al.*, 2013), inibir a oxidação do LDL (Aviram *et al.*, 2000).

Os polifenóis presentes na romã podem atuar também, diretamente inibindo a atividade da ECA pelo fato de sua estrutura química favorecer a quelação do metal zinco presente na estrutura da enzima (Aviram & Dornfeld, 2001; Mohan *et al.*, 2010), atenuando a formação da angiotensina II e consequentemente reduzindo a formação de EROs via sistema NADPH oxidase. Além disso, reduz progressão da aterosclerose e aumenta a vasodilatação dependente do endotélio como mostra o estudo de Machha & Mustafa (2005) ao utilizar animais SRH machos tratados com captopril e flavonóides (baicaleína, flavona e quercetina) houve redução da PAS e melhorou o relaxamento induzido pela ACh. Outro estudo demonstrou que

anéis de aorta abdominal de camundongo tipo C57BL/6 incubadas com quercetina e seus metabólitos foram capazes de promover a redução na contração induzida pela fenilefrina, efeito mediado em parte via AMPK levando a subsequente ativação da eNOS e aumento na produção do NO (Khoo *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2012). Outro estudo realizado em anéis de aorta de ratos *Wistar* machos, a presença do ácido elágico foi capaz de promover a vasodilatação parcialmente independente do endotélio de uma maneira rápida e dose-dependente por meio da inibição do influxo de cálcio do tipo L no MLV (Yilmaz & Usta, 2013).

Outra ação antioxidante proveniente do tratamento é a modulação que os polifenóis exercem sobre as fontes geradoras de EROs. Muitos estudos mostram que estes polifenóis podem inibir estes sistemas reduzindo a formação de EROs como mostra o estudo de Steffen *et al.* (2008) ao incubar metabólito de flavonóide, a epicatequina, em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana, houve redução da atividade do sistema NADPH oxidase e a formação do $O^{\cdot-}_2$. Tais resultados podem ser explicados ao analisar a estrutura química destas substâncias, pois é semelhante ao da apocinina, um inibidor do complexo NADPH oxidase.

Outro estudo aponta que o tratamento com quercetina é capaz de aumentar a atividade da eNOS por meio da redução da expressão do complexo NADPH oxidase via redução da expressão da subunidade p47phox (Sánchez *et al.*, 2006). Xia *et al.* (2010) aponta que o tratamento com resveratrol (30 ou 100 mg/Kg) em camundongos machos *Knockout* para apolipoproteína E promove *dowregulation* na atividade do complexo NADPH oxidase via redução na expressão de RNAm das subtipos NOX2 e NOX4. Além disso, o resveratrol é capaz de reduzir a oxidação do BH4 e aumentar a sua biossíntese fazendo a reversão da eNOS desacoplada. Estes polifenóis podem atuar sobre a formação de EROs provenientes da cadeia mitocondrial como, por exemplo, a epicatequina que promoveu a redução da síntese de $O^{\cdot-}_2$ pela cadeia mitocondrial (Li *et al.*, 2012). Lin *et al.* (2000) mostra que estes mesmos polifenóis foram capazes de reduzir a atividade do sistema xantina oxidase por meio de uma inibição competitiva ou “substrato suicida” em células mielocíticas

humanas leucêmicas. Estudos apontam também, que o tratamento com óleo de semente da romã reduz a formação de prostaglandinas e leucotrienos por meio da inibição da atividade das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase e consequentemente reduz citocinas pró-inflamatórias e EROs provenientes do metabolismo do ácido araquidônico (Loke *et al.*, 2010; Schubert *et al.*, 1999; Shingai *et al.*, 2011). Há interações entre a romã e sistema antioxidante enzimático que exercem efeitos importantes sobre a defesa do organismo frente as EROs, mostrando que os polifenóis promovem influências sobre as enzimas antioxidantes fazendo *upregulation* da SOD, catalase e glutathione reduzida (GSH) em ratos Wistar diabéticos e hipertensos (Mohan *et al.*, 2010) ou em somente ratos diabéticos (Althunibat *et al.*, 2010; Bagri *et al.*, 2009), em animais com altos níveis de estresse oxidativo provenientes do tratamento com tetracloreto de carbono (CCl₄), agente altamente tóxico para o fígado e rins (Murthy *et al.*, 2002) e em ratos expostos ao ácido tricloroacético (TCA) (Celik *et al.*, 2009).

A romã possui altas concentrações de fitoestrógeno, o ácido elágico que pode promover ações similares ao do estrogênio (Sreeja *et al.*, 2012). Está claro na literatura que o estrogênio possui diversos efeitos benéficos sobre o organismo e principalmente sobre o sistema vascular, entretanto há questionamentos em relação a sua utilização na TRH em mulheres na pós-menopausa perante ao aumento na incidência de eventos cardiovasculares e câncer de útero e mama. Portanto, aderir-se a uma dieta rica em fitoestrógenos se torna interessante como parte de uma terapia alternativa (Lissin & Cooke, 2000). O ácido elágico é metabolizado pela microbiota intestinal em urolitina A e B ou enterofitoestrógenos. A urolitina A apresenta probabilidade de ligação a RE de quase 100 % devido a presença de bióforo 1 em sua estrutura química, que lhe confere maior modulação destes receptores. A concentração necessária para atingir 50 % de inibição da ligação de [3H]-estradiol da urolitina A no RE α é de 0,44 μ M e RE β de 0,75 μ M (estradiol e RE α é de 0,0064 μ M e RE β de 0,0048 μ M – 100 %), demonstrando que a urolitina A possui maior afinidade aos RE comparado a urolitina B, genisteína, daidzeína, resveratrol e enterolactona (Larrosa *et al.*, 2006). Além dos receptores clássicos de estrogênio, outros trabalhos apontam que os efeitos rápidos ou não genômicos

dos fitoestrógenos requerem a ativação da PKC por meio do GPER, como no trabalho de Dong *et al.* (2013) ao utilizar antagonista farmacológico deste receptor, o G15, os efeitos neuroprotetores do resveratrol sobre as correntes do Kv 2.2 em cultura de células de neurônios de grânulos cerebelares de ratos foram abolidos. Portanto, a utilização de fitoestrógenos pode trazer benefícios idênticos ao do estrogênio sobre o organismo promovendo redução do estresse oxidativo, revertendo o quadro de disfunção endotelial, aumentando a biodisponibilidade do NO e gerando melhor efeito vasodilatador.

A reatividade vascular foi realizada em corações isolados com todas as coronárias íntegras na ausência de agentes farmacológicos que pudessem aumentar o tônus vascular. Nossa primeira observação foi que a ovariectomia não alterou a PPC basal, porém o tratamento com romã reduziu a PPC somente no grupo Sham. O estrogênio pode atuar sobre as coronárias por meio de ações indiretas (endotélio dependente) bem como por ações diretas sobre o MLV (Santos *et al.*, 2010). Os resultados obtidos nesse estudo são diferentes dos relatados anteriormente por nós em ratos normotensos (Moysés *et al.*, 2001) onde observamos redução da PPC após ovariectomia e diferente de Schenkel *et al.* (2014) que mostraram a ovariectomia promovendo aumento da PPC basal, por meio da maior produção de EROs e redução na síntese de NO. Por outro lado, Figueroa-Valverde *et al.*, (2011) relataram que o estrogênio pode ativar canais de cálcio do tipo L por mecanismo molecular não genômico em ratas Wistar intactas, mantendo assim a PPC aumentada. Entretanto, neste estudo utilizamos animais hipertensos e são necessários estudos adicionais que venham a esclarecer os mecanismos envolvidos na manutenção do tônus do leito coronariano nesse grupo de animais.

Alguns estudos têm mostrado que os hormônios sexuais modulam diversos componentes do SRAA, que possui importante papel no controle do tônus coronariano (De Beer *et al.*, 2008). Brosnihan *et al.* (1999) postula ações bidirecionais do estrogênio sobre este sistema indicando que este hormônio promove efeitos anti-hipertensivos por meio da redução da atividade da ECA, induzindo a redução da angiotensina-II circulante, potente vasoconstritor e aumentando angiotensina 1-7, potente vasodilatador. Outros estudos indicam

que a ovariectomia de fêmeas SHR não aumenta a atividade ECA plasmática (Dalpiaz *et al.*, 2013) nem a expressão e atividade da ECA coronariana em ratas Lewis mRen2 (Wang *et al.*, 2013). Todavia, a atividade e expressão da ECA 2 coronariana foram mantidas, o que promoveu aumento da concentração de angiotensina 1-7 plasmática e coronariana (Wang *et al.*, 2013). Por outro lado, há estudo que aponta que a castração aumenta a expressão da ECA bem como expressão do gene de AT1 (Fabris *et al.*, 2011).

Convém ressaltar que o envolvimento do SRAA local é apenas uma das possíveis explicações para a redução da PPC basal em fêmeas SHR castradas, sendo que outros mecanismos podem estar relacionados. Diante destes resultados conflitantes, mais experimentos são necessários para elucidar todo mecanismo envolvido no controle do tônus coronariano pelos hormônios sexuais e possível existência de mecanismos compensatórios neste controle gerando efeitos cardioprotetores, nesse modelo de hipertensão.

Ao analisar a influência do tratamento sobre a PPC basal, observamos que a presença dos fitoestrógenos foi capaz de reduzir a PPC basal somente no grupo Sham. Esses efeitos podem estar relacionados à atenuação do estresse oxidativo, por meio da neutralização das EROs (Ignarro *et al.*, 2006), promovendo a redução da atividade da ECA coronariana (Aviram & Dornfeld, 2001; Mohan *et al.*, 2010), que por sua vez, reduz a degradação da bradicinina. Entretanto, no grupo OVX não houve diferenças significativas após tratamento. Embora tenhamos observado diferenças na PPC basal de fêmeas SHR tratadas, nosso principal objetivo foi avaliar a reatividade do leito coronariano frente a uma substância que atua promovendo o relaxamento endotélio-dependente, a bradicinina. Analisamos ainda a influência que o tratamento com EHR exerce sobre a função endotelial.

O endotélio possui importante papel no controle do tônus vascular coronariano, entretanto, o modelo de animal utilizado já apresenta uma forte disfunção endotelial (Kauser & Rubanyi, 1995). Portanto, a utilização de substâncias que possam aumentar e melhorar a funcionalidade endotelial cada vez mais se torna alvo de pesquisas. A contribuição do tratamento sobre o endotélio pode ser destacada ao observar a redução da PPC e aumento no

relaxamento induzido pela bradicinina nos grupos tratados e ao fazer bloqueio com L-NAME o relaxamento endotélio-dependente foi praticamente abolido, mostrando que há forte participação do NO neste efeito. Tais resultados suportam a ideia de que o tratamento atua sobre o endotélio tornando-o mais funcional ao promover relaxamento mais evidenciado nos animais dos grupos Sham e OVX por meio da redução do estresse oxidativo em células endoteliais e aumento na biodisponibilidade do NO em fêmeas SHR. Estes efeitos sobre o relaxamento corroboram com diversos estudos (Ajay *et al.*, 2007; Ajay *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2006; Machha & Mustafa, 2005; Shen *et al.*, 2012; Yilmaz & Usta, 2013). Portanto, para nosso conhecimento somos os primeiros a demonstrar a ação do tratamento com EHR sobre a reatividade vascular do leito coronariano.

O mecanismo no qual os fitoestrógenos atuam na melhora do relaxamento no leito coronariano ainda é incerto, contudo, já está claro que estas substâncias podem gerar efeitos estrogênicos ao se ligar em receptores clássicos e não clássicos de estrogênio melhorando a função endotelial, como foi observado ao tratar ratas SHR ovariectomizadas por 12 semanas com extrato *C. comosa*, verificou-se que o tratamento preveniu o prejuízo no relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta torácica e aumentou a expressão de RE α (Intapad *et al.*, 2012). O estrogênio possui importante papel sobre o sistema cardiovascular e a utilização dos fitoestrógenos pode gerar efeitos similares ao do estrogênio. Dentre as ações do estrogênio sobre o sistema vascular podemos destacar:

- Estimulação da proliferação das células endoteliais via RhoA/ROCK que aumentam a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, tais como ciclina D1/CDK4, ciclina A2/CDK2 e ciclina B1/CDK1 (Oviedo *et al.*, 2011);

- O estrogênio pode atuar diretamente sobre o endotélio promovendo a liberação de substâncias vasodilatadoras como o NO ao aumentar a atividade da eNOS (Hernández *et al.*, 2000);

- Redução proliferação do MLV por mecanismo extranuclear ao ativar a proteína fosfatase 2A (PP2A) que inibe a fosforilação de cinases promotoras do

crescimento (Ueda *et al.*, 2013) ou por mecanismo genômicos regulando a expressão de determinados genes como, miR-203 (Zhao *et al.*, 2013)

- Promoção relaxamento agindo diretamente sobre o MLV aumentando a probabilidade de abertura dos canais de potássio ativados por cálcio de larga condutância (BKCa²⁺) (Maher *et al.*, 2013) via GMPc/PKG promovendo hiperpolarização e conseqüentemente o relaxamento (White *et al.*, 2002b) ou o próprio hormônio estimulando estes canais por meio de uma ligação direta a subunidade β destes canais (Valverde *et al.*, 1999). Ou atuando diretamente sobre os canais de cálcio do tipo L no MLV reduzindo a probabilidade de abertura dos mesmos (Nakajima *et al.*, 1995).

Os fitoestrógenos também podem gerar efeitos indiretos sobre as células endoteliais as tornando mais viáveis e funcionantes, como foi observado por Lee *et al.* (2010) onde a pré-incubação com ácido elágico provocou efeitos antiapoptóticos por meio da redução na formação de EROs e redução da atividade da NADPH oxidase aumentando a viabilidade celular em cultura de células endoteliais com disfunção endotelial e apoptose induzidos pela presença de LDL-ox, onde o ácido elágico modula a via da PI3K/Akt/eNOS aumentando a biodisponibilidade do NO e reduz conseqüentemente a formação de ONOO⁻ devido a neutralização do O⁻₂ por este polifenól (Ou *et al.*, 2010). Estudos experimentais têm mostrado efeitos benéficos dos fitoestrógenos não somente em células endoteliais, mas sobre o MLV ao impedir sua proliferação e atenuar a expressão da ciclina D1, impedindo a progressão da aterosclerose (Rani *et al.*, 2013). Portanto, a utilização dos fitoestrógenos possui importante potencial na restauração da função endotelial ao observar relaxamento das artérias coronarianas em animais SHR, mostrando-se uma terapia alternativa efetiva na prevenção das DCV. Entretanto, estudos clínicos são necessários para elucidar todos esses benefícios, pois os fitoestrógenos são diversificado grupo com diferente forma de metabolismo e biodisponibilidade promovendo diferente efeito em modelo de experimentação *in vivo* e em *ex vivo* (Gencel *et al.*, 2012).

O surgimento do estresse oxidativo se dá por meio da excessiva síntese de EROs incapacitando o sistema antioxidante enzimático em neutralizar todas

estas substâncias. O acúmulo de EROs promove a deterioração de proteínas, lipídios e ácido nucléicos. Estes efeitos levam à peroxidação lipídica, danos na membrana celular, prejuízos na função celular e fragmentação do DNA (Aruoma, 1994, Dröge, 2002; Halliwell & Gutteridge, 1985; Halliwell, 1987).

A peroxidação lipídica pode ser analisada por técnicas específicas, como a marcação por MDA. De fato, nosso estudo demonstrou que o tratamento com romã foi capaz de reduzir os níveis de MDA nos animais Sham e apesar de não haver diferença no grupo OVX encontramos uma tendência a redução nos níveis de MDA. Nossos resultados corroboram os estudos em adultos com diabetes mellitus tipo II (Basu *et al.*, 2013), em rato com lesão isquêmica cerebral (Ahmed; El Morsy; Ahmed, 2014), em tecido renal e hepático de ratos (Moneim; Dkhil; Al-Quraishy, 2011) e em cultura de células endoteliais de coronárias humanas expostas ao LDL-ox (De Nigris *et al.*, 2006). De fato, os polifenóis, em geral, possuem características antioxidantes devido a sua estrutura química, reduzindo tanto a síntese de EROs quanto neutralizando as que estão presentes no meio, justificando assim os nossos resultados.

A romã é conhecida por apresentar polifenóis com alta atividade antioxidante (Ignarro *et al.*, 2006), sendo capaz de influenciar tanto a atividade quanto a expressão de enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes, por outro lado, possuem importante papel no organismo. A enzima SOD, por exemplo, desempenha importante papel no metabolismo do oxigênio, interceptando e reduzindo o ânion superóxido à peróxido de hidrogênio (Blake *et al.*, 1987; Vincent *et al.*, 2004). A catalase está envolvida na eliminação do peróxido de hidrogênio e pode ser inativada pelo ânion superóxido e glicação da enzima. Além disso, a catalase está envolvida na desintoxicação de altas concentrações de H₂O₂ (Zhang & Tan, 2000). Nesse estudo, após 30 dias de tratamento com extrato bruto de romã, não observamos alterações significativas na expressão destas enzimas no grupo Sham. No grupo ovariectomizado as respostas na expressão de eNOS e gp91phox foram significativamente reduzidas em relação ao grupo Sham e o tratamento não modificou essa resposta.

Por outro lado, em relação à expressão da SOD, pudemos observar que embora não tenha havido aumento nos níveis do grupo Sham, houve aumento significativo no grupo OVX Romã em relação ao OVX Água, indicando que o extrato da romã é eficaz em promover aumento na expressão desta enzima em ambientes com altos níveis de estresse oxidativo, ao atuar como varredouro de radicais livres, o que reduziria os níveis de H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica e inativação da SOD, restaurando a sua atividade enzimática (Murthy *et al.*, 2002; Bagri *et al.*, 2009). Embora estudos indicam aumento tanto na expressão quanto na atividade de enzimas antioxidantes (Bagri *et al.*, 2009; Mohan *et al.*, 2010), em nosso estudo não observamos o mesmo efeito sobre a enzima catalase, onde o tratamento não foi eficaz em promover este aumento. Tal resultado possivelmente pode estar relacionado ao modelo de animal utilizado que já apresenta aumento no estresse oxidativo, no qual por si só promove aumento na expressão de enzimas antioxidantes. Entretanto, o estudo Krych & Gebicka, 2013 aponta que os flavonóides podem inibir a catalase.

Em animais hipertensos, o próprio fluxo turbulento sobre o endotélio pode promover aumento na expressão de genes responsivos sensíveis à oxidação, tais como: ELK-1 e p-CREB que aumenta a produção de EROs. Tais efeitos promovem redução na expressão da eNOS e conseqüentemente agravo da disfunção endotelial. Contudo, o estudo de De Nigris *et al.*, (2007), mostrou que o extrato da romã foi eficaz em aumentar a expressão da eNOS acompanhado com a redução na expressão dos genes sensíveis á oxidação em camundongos hipercolesterolêmicos. Em nosso estudo, entretanto, verificamos que o tratamento não foi eficaz em aumentar a expressão da eNOS. Nossos resultados corroboram estudo de Ignarro *et al.*, (2006), onde o suco concentrado da romã diluído em 300 e 600x não afetou a expressão transcricional ou atividade catalítica da eNOS. Tais resultados poderiam estar relacionados ao fato da concentração do extrato administrada aos animais não ter sido suficiente para alterar a expressão da eNOS.

Outra fonte produtora de EROS na hipertensão é a família NOX do complexo NADPH oxidase em células endoteliais (Rueckschloss *et al.*, 2001).

Este complexo enzimático é composto por dois componentes transmembrânicos, NOX2 (também chamado de gp91phox) e p22phox, e três componentes citoplasmático, p47phox, p67phox e GTPase rac-1. O processo na qual a NADPH oxidase é ativada é iniciado quando ocorre a fosforilação da p47phox, causando a translocação deste complexo (p47phox/p67phox) para a membrana plasmática ativando o complexo transmembrana (Bedard & Krause, 2007). Por esse motivo, nós mensuramos os efeitos do tratamento com EHR sobre ativação da NADPH oxidase, porém não foram encontradas alterações significativas em ambos grupos após o tratamento. Ao contrário do que encontramos, o estudo de Lee *et al.* (2010) demonstrou que a incubação com ácido elágico foi capaz de promover a redução na expressão da gp91phox e p22phox em cultura de células endoteliais. Apesar de não termos observado influência do tratamento sobre a expressão da gp91phox, houve redução na expressão da gp91phox após a ovariectomia. Entretanto, estudos indicam que o estrogênio é capaz de inibir a expressão da NADPH oxidase em cultura de células endoteliais (Wagner *et al.*, 2001; Gragasin *et al.*, 2002). Os resultados encontrados em nosso estudo podem estar relacionados ao tipo de experimento, pois os estudos citados acima utilizaram cultura de células, ao contrário do nosso que utilizou coronária de fêmeas hipertensas.

Sem dúvidas, o consumo de dietas com altas concentrações de fitoestrógenos têm atraído atenção devido aos inúmeros efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular (Basu & Penugonda, 2008). De fato, em nosso estudo podemos citar efeitos hipocolesterolêmicos, pois foram observados em nosso estudo redução nos níveis de CT nas ratas Sham, TG nas ratas OVX e LDL nos dois grupos tratados e não foram observados alterações nos níveis de HDL. Estes dados corroboram outros estudos, onde mudanças na microbiota foram acompanhadas por melhora nos marcadores aterogênicos, redução nos níveis plasmáticos de LDL em camundongos após tratamento com ração hipercolesterolêmica suplementada com extrato da casca da romã (Neyrinck *et al.*, 2013). Estes resultados também são observados em estudos clínicos, onde a redução nos níveis de LDL foi acompanhada por não alteração nos níveis de HDL e TG após ingestão de suco concentrado da romã por pacientes diabéticos apresentando hiperlipidemia (Esmailzadeh *et al.*, 2004). Outro

estudo indica que ratos tratados com ração hipercolesterolêmica suplementada com extrato da casca da romã tiveram redução nos níveis de LDL e VLDL (Hossin, 2009). Por outro lado, Bagri *et al.* (2009) demonstraram redução nos níveis de outros marcadores aterogênicos como TG e CT em ratos diabéticos tratados por 21 dias com extrato aquoso da romã comparado ao grupo somente diabético. Diante destes resultados, vale à pena ressaltar que um alto nível de colesterol plasmático é requisito para os efeitos hipocolesterolêmicos provenientes de dietas ricas em polifenóis. Os estudos citados foram realizados com animais que já apresentavam alterações sobre o perfil lipídico e talvez por isso as demais alterações não foram observadas em nosso estudo, pois trabalhamos com animais que não apresentavam desordens sobre o perfil lipídico.

O mecanismo de ação dos fitoestrógenos sobre os parâmetros aterogênicos pode se assemelhar ao do estrogênio. Contudo Fuhrman *et al.* (2010) demonstraram que o tratamento com suco da romã melhora os níveis lipídicos por meio do aumento nos níveis da enzima paraoxonase-1 (PON-1) acoplada ao HDL e reduz a paraoxonase-1 (PON-1) acoplada ao LDL, além disso os fitoestrógenos presentes na romã podem preservar e/ou aumentar a atividade enzima paraoxonase-1 (PON-1) acoplada ao HDL. A PON-1 também conhecida como esterase aromática 1 é o maior componente anti-aterosclerótico responsável pela proteção do HDL e LDL da oxidação lipídica (Aviram & Dornfeld, 2001). Muitos estudos indicam que outros polifenóis presentes na romã ou nos demais frutos possuem características hipocolesterolêmicas e seus efeitos vão depender da absorção, biodisponibilidade e metabolismo, bem como seu mecanismo de ação (Al-Muammar & Khan, 2012).

Como já vimos, em mulheres na pós-menopausa mudanças significantes acontecem promovendo a progressão das doenças cardiovasculares, dentre elas podemos citar o aumento dos níveis de marcadores aterogênicos (Lundeen *et al.*, 1997). De fato está claro que o estrogênio está envolvido na redução nos níveis de LDL atuando principalmente ao aumentar a expressão de receptores de LDL no fígado (Persson *et al.*, 2012; Semenkovich & Ostlund,

1987). Contudo, em nosso experimento a ovariectomia não aumentou os níveis de marcadores aterogênicos, estes resultados indicam que o tempo de castração e a linhagem de animais utilizados podem ser fatores determinantes no aumento dos níveis lipídicos plasmáticos.

Para verificar se o EHR foi realmente metabolizado e absorvido na parede intestinal, analisamos o perfil hormonal destes animais para verificar se o tratamento promoveu alterações sobre este parâmetro. Obtivemos aumento nos níveis de estrogênio nos animais OVX e progesterona nos animais Sham e OVX após o tratamento. Estes resultados diferem do estudo de Ruhlen *et al.* (2008), que verificou que o consumo de fitoestrógenos por roedores não foi capaz de aumentar as concentrações hormonais sorológicas em ratas grávidas, todavia ocorreu elevação nos níveis estrogênicos nos fetos. Almstrup *et al.* (2002) apontam a capacidade dos fitoestrógenos em afetar a biossíntese dos hormônios esteróides primeiramente regulando a atividade da aromatase ao atuar como inibidor competitivo se ligando em seu sítio ativo e reduzindo assim, as concentrações de estrogênio (Kao *et al.*, 1998). Além do mais, os fitoestrógenos podem regular reduzindo a síntese de globulina de ligação de hormônios de esteróides (SHBG) afastando os hormônios dos sítios de ligação e potencializando os efeitos destes hormônios em sua forma livre (Cederroth *et al.*, 2012). Diante destes resultados, sugerimos que há possibilidade do kit utilizado para detectar e quantificar a presença de estrogênio tenha sido sensível à presença dos fitoestrógenos, devido à semelhança na estrutura química. Além disso, a partir desses resultados, podemos demonstrar que a castração foi eficaz quando analisamos a redução nos níveis de estrogênio e progesterona, o que já era esperado, pois a principal fonte produtora de hormônios sexuais são a gônadas, e no caso os ovários que foram removidos.

Outros efeitos do tratamento também foram demonstrados neste estudo, como o peso uterino, corporal e dos coxins de gordura. Primeiramente observamos que o tratamento não foi capaz de aumentar o peso uterino, ou seja, o tratamento não induziu hiperplasia uterina. Estes dados corroboram com os achados de Sreeja *et al.* (2012), que demonstraram que o tratamento de camundongas ovariectomizadas com doses de 50 e 100 mg/Kg de extrato

metanólico do pericarpo da romã não promoveu aumento no peso uterino. Tais resultados podem estar associados à presença de fitoestrógenos que induzem efeitos antiestrogênicos sobre os RE α , possivelmente bloqueando cascatas de sinalização relacionadas à proliferação celular. Além disso, os fitoestrógenos fazem *downregulation* de fatores transcricionais após ativação do RE α como, elemento de resposta estrogênica (ERE), conferindo assim, características antiestrogênicas sobre as células uterinas. Outros efeitos provenientes dos fitoestrógenos que podemos citar estão relacionados com a habilidade que estas substâncias possuem em inibir seletivamente a proliferação de células malignas, mas não de células normais, sugerindo uma atividade anticancerígena (Kawaii & Lansky, 2004). Em contraste com os nossos dados, o tratamento com suco da romã e óleo da semente de romã gerou hiperplasia uterina em ratas ovariectomizadas (Maru *et al.*, 2001; Sharaf & Nigm, 1964). Os resultados apresentados podem ser considerados benéficos diante da possibilidade de aumento na incidência de certos tipos de câncer, principalmente de mama e endométrio proveniente do uso de uso de outras terapias, como a terapia com SERMs (Hulley *et al.*, 1998; Rossouw *et al.*, 2002). Pesquisas apontam que a cada 5 anos de uso da TRH sem o diagnóstico de câncer, o risco de câncer de mama aumenta em 10 % (Ross *et al.*, 2000; Schairer *et al.*, 2000).

Apesar do estrogênio, ao atuar sobre seus receptores, provocar o surgimento de certos tipos de câncer, atualmente existem SERMs que são utilizados tanto na TRH quanto no tratamento contra câncer. Estas substâncias podem induzir efeitos antiestrogênicos em determinados tecidos inibindo a proliferação celular e conseqüentemente, o câncer. O tamoxifeno, por exemplo, é frequentemente utilizado na terapia antiestrogênica em mulheres com tumores sensíveis ao estrogênio como o câncer de mama. No entanto, a utilização do tamoxifeno pode apresentar efeitos estrogênicos no útero em mulheres na pós-menopausa sendo associado ao aumento da incidência de câncer endometrial. (Shang & Brown, 2002). Considerando que a ativação do RE α promove proliferação celular e ativação dos RE β atuam inibindo, é hipotetizado que antagonistas do RE α podem ser efetivos no tratamento contra o câncer de mama sem promover a proliferação das células endometriais, no

qual são células que apresentam maior expressão de RE α (Margarida & Marques, 2011). Portanto, neste estudo não houve aumento do peso do útero após o tratamento e diante destas informações, sugerimos que o consumo adequado de alimentos ricos em fitoestrógenos podem atuar como antagonistas dos RE α promovendo efeitos benéficos sobre a saúde, atuando na prevenção e progressão de certos tipos de câncer.

De forma geral, o estrogênio é um termo utilizado para um grupo de hormônios esteroidais cuja estrutura química compreende 18 carbonos e engloba três tipos de hormônios estruturalmente semelhantes: 17 β – estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3), sendo o E2 o mais potente dos três. O estrogênio em geral possui efeitos benéficos sistêmicos importantes sobre diversos tipos de sistemas como, no sistema cardiovascular promove aumento na liberação de substâncias vasoativas (Santos *et al.*, 2014), no sistema ósseo previne a perda óssea atenuando a reabsorção óssea (Nakamura *et al.*, 2007) entre outros. Além destes efeitos, o estrogênio atua no desenvolvimento do fenótipo feminino: ombros estreitos, distribuição do pelo púbico, tom de voz mais aguda, concentração de tecido adiposo nas mamas, nádegas, quadris e coxas por meio da consolidação desse tecido que dificulta a sua metabolização (Ignacio *et al.*, 2009).

Desde a década de 80, sabe-se que o estrogênio exerce importante influência sobre a deposição de gordura corporal. Tal fato foi observado em experimentos que após a castração estes animais apresentaram ganho de peso corporal acelerado principalmente de tecido adiposo e também aumento na ingestão alimentar (Richard *et al.*, 1987). Estes efeitos estrogênicos sobre o peso corporal foram confirmados em estudos com camundongos deficientes ao RE α observando assim, hiperplasia e hipertrofia de adipócitos (Heine *et al.*, 2000). Sugere-se que estes efeitos provenientes do estrogênio estejam relacionados ao aumento da interação entre RE α e coativador de receptor de esteroide 1 (SRC1) no hipotálamo gerando efeitos anti obesidade (Zhu *et al.*, 2013). Além disso, Hong *et al.* (2007) apontaram uma possível correlação entre estrogênio e receptores de leptina no hipotálamo, onde níveis de leptina estão relacionados positivamente com níveis estrogênicos garantindo assim, melhor

saciedade, melhora da perda calórica, redução da ingestão calórica e aumento no gasto energético. Em contraste com estes achados nosso estudo demonstrou que a ovariectomia não provocou o aumento de peso em ratas hipertensas. Possivelmente devido ao modelo de animal utilizado, SHR, por apresentar naturalmente prejuízos no ganho de peso ou em seu crescimento como um todo (Picco *et al.*, 2014).

Ao analisar a influência do tratamento sobre o peso corporal e sobre os coxins de gordura, nossos resultados apontam que houve aumento no peso corporal e na gordura mesentérica no grupo OVX após tratamento ao compará-lo com seu grupo controle. Nas gorduras parametrial, perirenal e retroperitoneal o tratamento influenciou o ganho de peso corporal em ambos os grupos. Ao contrário do que encontramos, estudos apontam que o EHR pode ser empregado no tratamento e na prevenção da obesidade (Al-Muammar & Khan 2012). Contudo, estes resultados corroboram achados de Al-Nakkash *et al.* (2012) realizado em camundongas alimentadas com ração suplementada com um tipo de fitoestrógeno, a genisteína (isoflavona). Após 30 dias de tratamento não foi verificado redução da gordura abdominal, apesar destes componentes serem lipolíticos. Outro estudo aponta que animais alimentados com ração suplementada com 20 % de extrato da casca da romã mais 6 % de punicalagina durante 30 dias tiveram aumento do peso após 15 dias de tratamento (Cerdá *et al.*, 2003a/b).

Ao contrário do que foi observado, o estudo de Wu *et al.*, (2013) atribuiu estes efeitos à capacidade das substâncias presentes no extrato em inibir à enzima ácido graxo sintase (FAS), enzima responsável por catalisar a síntese de palmitato a partir de acetil-CoA e malonil-CoA na presença do complexo NADPH gerando longas cadeias de ácido graxos saturados, inibindo assim, o acúmulo de lipídeos nos adipócitos. Outro estudo aponta que os efeitos anti obesidade induzidos pelo tratamento com extrato da romã estão relacionados à supressão da secreção de resistina, um tipo de adipocitocina secretada pelo tecido adiposo, por meio de sua degradação intracelular (Makino-Wakagi *et al.*, 2012). Para explicar nossos resultados hipotetizamos que o tipo de fitoestrógeno presente na romã pode promover efeitos antiestrogênicos sobre o

tecido adiposo. Não obstante, o estudo de Zanella *et al.* (2014) indica que o tratamento com fitoestrógenos promove adipogênese em camundongos tratado via REμ. Diante disso, no que se refere à deposição de gordura, os achados acerca do tratamento com romã não dão suporte para o entendimento das ações do extrato nesse modelo de animal. Nesse caso, mais estudos são necessários para melhor entendimento tanto das ações das substâncias contidas no extrato quanto dos possíveis mecanismos que levam a essas alterações neste modelo de hipertensão sistêmica.

Os fitoestrógenos estão presentes em todas as partes do fruto e devido aos seus benefícios sobre a saúde, os extratos têm sido amplamente utilizados por inúmeros pesquisadores. Todavia é necessário que seja detectada no extrato, o principal componente que apresenta o efeito cardioprotetor e/ou antioxidante. Dessa forma a caracterização fitoquímica foi realizada no extrato bruto, numa fração etanólica de 50 % e seus resultados foram comparados com um artigo científico (Bhandary *et al.*, 2012). Os testes para caracterização fitoquímica são geralmente utilizados na detecção de substâncias bioativas facilitando o desenvolvimento de drogas. Além do mais, estes testes facilitam a estimativa quantitativa e qualitativa na separação de componentes químicos ativos (Varadarajan *et al.*, 2008). A caracterização fitoquímica do presente estudo revelou a presença de triterpenóides, glicosídeos, saponinas, flavonóides, taninos, carboidratos e ácidos orgânicos, enquanto que a fração etanólica de 50 %, os mesmos metabólitos foram encontrados, exceto os ácidos orgânicos e triterpenóides. Os flavonóides e taninos são componentes fenólicos que possuem alta capacidade antioxidante e foram os principais responsáveis pelos resultados encontrados, além do mais a presença dos glicosídeos faz do extrato um importante agente cardioprotetor, pois são substâncias naturalmente cardioativas utilizadas no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e arritmia (Bhandary *et al.*, 2012).

Atualmente houve aumento na utilização de substâncias naturais com propriedade medicinais na prevenção e tratamento das mais diversas doenças, sendo utilizados em diversas culturas e tempos. O EHR utilizado como forma de terapia, tem como objetivo, estimular as defesas naturais do organismo e

esta propriedade é devido à presença de substâncias fitoquímicas como foi demonstrado em nosso estudo, gerando efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular, tornando válidas mais pesquisas para elucidar o amplo efeito protetor deste fruto.

6- CONCLUSÃO

Concluimos que o extrato da *Punica granatum L.* contém substâncias antioxidantes que são capazes de: i) potencializar o relaxamento dependente do endotélio, contribuindo assim para um melhor efeito de relaxamento no leito coronariano em ratas SHR Sham e ovariectomizadas; ii) prevenir a progressão e atenuar a pressão arterial sistólica bem como, melhorar parâmetros anti-aterogênicos. Estes achados possuem importantes implicações para a prevenção de doenças cardiovasculares, que poderão contribuir para o desenvolvimento de melhores formas de terapia na pós-menopausa.

7- REFERÊNCIAS

Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hamalainen E, Fotsis T, Ollus A. Effect of dietary components , including lignans and phytoestrogens , on circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *Journal Steroid Biochemical* 1987;27(4-6):1135-1144.

Ahmed MAE, El Morsy EM, Ahmed AAE. Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats. *Life Sciences* 2014;110(2):61-69.

Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006;73:1-7.

Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid. *Pharmacological Research* 2007;55:385-91.

Ajay M, Gilani AH, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences* 2003;74:603-612.

Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995;25:155-161.

Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *New England Journal of Medicine* 1991;324(16):1098-1104.

Almstrup K, Fernández MF, Petersen JH, Olea N, Skakkebæk NE, Leffers H. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose – response curves. *Environmental Health Perspective* 2002; 110(8):743-748.

Al-Muammar MN & Khan F. Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition* 2012;28(6):595-604.

Al-Nakkash L, Martin JB, Petty D, Lynch SM, Hamrick C, Lucy D, Robinson J, Peterson A, Rubin LJ, Broderick TL. Dietary genistein induces sex-dependent effects on murine body weight, serum profiles, and vascular function of thoracic aorta. *Gender Medicine* 2012;9(5):295-308.

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

Arnal JF, Fontaine C, Billon-Galés A, Favre J, Laurell H, Lenfant F, Gourdy P. Estrogen receptors and endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30(8):1506-12.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanyl-ate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977;74:3203–3207.

Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 1994;32(7):971-983.

Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman. 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* 2000;71(5):1062–76.

Aviram M & Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 2001;158(1):195-8.

Awoniyi CA, Roberts D, Veeramachaneni R, Hurst BS, Tucker KE, Schlaff WD. Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertility and Sterility* 1998;70(3):440-7.

Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology* 2009;47(1):50-4.

Barth M, Bondoux M, Luccarini JM, Peyrou V, Dodey P, Pruneau D, Massardier C, Paquet JL. From bradykinin B2 receptor antagonists to orally active and selective bradykinin B1 receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012;55(6):2574-84.

Basu A, Newman ED, Bryant AL, Lyons TJ, Betts NM. Pomegranate polyphenols lower lipid peroxidation in adults with type 2 diabetes but have no effects in healthy volunteers: a pilot study. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2013.

Basu A & Penugonda K. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews* 2008;67(1):49-56.

Baynes JW. Perspectives in diabetes role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;44:05-412.

Bechlioulis A, Naka KK, Kalantaridou SN, Chatzikyriakidou A, Papanikolaou O, Kaponis A, K Vakalis, Vezyrakif P, Gartzonikag K, Mavridis A, Georgioud I, Michalis LK. Short-term hormone therapy improves sCD40L and endothelial function in early menopausal women: potential role of estrogen receptor polymorphisms. *Maturitas* 2012;71(4):389-95.

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

Bhandary SK, Kumari S, Bhat VS, Sharmila KP, Beka MP. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. *Nitte University Journal of Health Science* 2012;2(4):34-38.

Blake DR, Allen RE, Lunee J. Free radicals in biological systems: a review oriented to the inflammatory process. *British Medical Bulletin* 1987;43:371-385.

Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology* 2003;41(5):631-636.

Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P, Ferrario CM. Bi-directional actions oestrogen on the renin-angiotensin system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999;32(4):373-81.

Brosnihan KB, Li P, Figueroa JP, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen, nitric oxide, and hypertension differentially modulate agonist-induced contractile responses in female transgenic (mRen2)²⁷ hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2008;294(5): 1995-2001.

Castelo-Branco C, García-Fantini M, HAYA J. Vascular reactivity and atheromatous plaques in post-menopausal women on tibolone treatment. Open prospective study with doppler ultrasonography in internal carotid artery. *Maturitas* 2005;50(4): 259-65.

Castillo C, Ceballos G, Rodriguez D, Villanueva C, Medina R, Lopez J, Mendez, E Enrique F. Castillo. Effects of estradiol on phenylephrine contractility associated with intracellular calcium release in rat aorta. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 2006;11340:1388-1394.

Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012;355(2):192-200.

Celik I; Temur A, Isik I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2009;47(1):145-9.

Cerdá B, Llorach R, Cerón JJ, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *European Journal of Nutrition* 2003;42(1):18-28.(a)

Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán, Espín JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(11):3493-501.(b)

Chambliss KL & Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrine reviews* 2002;23(5): 665-86.

Chang Y, Chen WF, Lin KH, Hsieh CY, Chou DS, Lin LJ, Sheu JR, Chang CC. Novel bioactivity of ellagic acid in inhibiting human platelet activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;595128.

Cipullo JP, Martin JF, Ciorlia LA, Godoy MR, Cação JC, Loureiro AA, et al. Hypertension prevalence and risk factors in a brazilian urban population. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2010;94(4):519-26.

Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Drago R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 1990;15(3):327-331.

Claudio ER, Endlich PW, Santos RL, Moysés MR, Bissoli NS, Gouvêa SA, Abreu GR. Effects of Chronic Swimming Training and Oestrogen Therapy on Coronary Vascular Reactivity and Expression of Antioxidant Enzymes in Ovariectomized Rats. *PloS one* 2013;8(6):e64806.

Corrêa TD, Namura JJ, Silva CAP, Castro MG, Meneghini A, Ferreira C. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia , diagnóstico e tratamento. *Arquivos de Medicina* 2006;31(2):91-101.

Cramer DW, Xu H, Harlow BL. Does incessant ovulation increase risk for early menopause? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1995;172(2):568-573.

Cruz MN, Luksha L, Logman H, Poston L, Agewall S, Kublickiene K. Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Circulation* 2006;117(16):1969–1975.

Dalpiaz PLM, Lamas AZ, Caliman IF, Medeiros ARS, Abreu GR, Moysés MR, Andrade TU, Alves MF, Carmona AK, Bissoli NS. The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2013;46(2):171-7.

Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger M, Bell M, McGuire DK, Provost JC, Liker H, Aviram M. 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* 2009;104(7):936-42.

De Beer VJ, Sorop O, Pijnappels DA, Dekkers DH, Boomsma F, Lamers JM, Duncker DJ, Merkus D. Integrative control of coronary resistance vessel tone by endothelin and angiotensin II is altered in swine with a recent myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2008;294: H2069–H2077

De Nigris F, Ignarro SW, Botti C, Sica V, Ignarro LJ, Napoli C. Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. *Nitric Oxide* 2006;15(3):259-63.

De Nigris F, Ignarro SW, Sica V, Lerman LO, D'Armiento FP, Byrns RE, Casamassimi A, Carpentiero D, Schiano C, Sumi D, Fiorito C, Ignarro LJ, Napoli C. Effects of a pomegranate fruit extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. *Cardiovascular Research* 2007;73(2):414-23.(a)

De Nigris F, Balestrieri ML, Ignarro SW, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, Napoli C. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide* 2007;17(10):50-4.(b)

Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FHH. 17 β -Estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats.

American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 2005;288:R759-R766.

Deschamps AM; Murphy E. Activation of a novel estrogen receptor , GPER , is cardioprotective in male and female rats. American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology 2009; 297:R1806-R1813.

Dong WH, Chen JC, He YL, Xu JJ, Mei YA. Resveratrol inhibits KV2.2 currents through the estrogen receptor GPER30-mediated PKC pathway. American Journal of Physiology. Cell Physiology 2013;305:C547-C557.

Dos Santos AB & Filho OB. Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria do funcional da densidade (TFD). Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: estudo com ressonância. 2006.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. Progress in Lipid Research 2004;43:200-227.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews 2002;82(1):47-95.

Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. Hypertension 2001;37(2):640-4.

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Gilst WV, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Lüscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. American Journal of Cardiology 2001;88(9):1-20.

Escosteguy CC. Epidemiologia das doenças cardiovasculares nas mulheres. Revista da SOCERJ 2002;15(1):7-12.

Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *Journal of Medicinal Food* 2004;7(3):305-8.

Fabris B, Candido R, Bortoletto M, Toffoli B, Bernardi S, Stebel M, Bardelli M, Zentilin L, Giacca M, Carretta R. Stimulation of cardiac apoptosis in ovariectomized hypertensive rats: potential role of the renin–angiotensin system. *Journal of Hypertension* 2011;29(2):273-281.

Féletou M & Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2006;26(6):1215-25.

Figuroa-Valverde L, Diaz-Cedillo F, Lopez-Ramosa M, Garcia-Cervera E, Quijanoa K, Cordoba J. Changes induced by estradiol-ethylenediamine derivative on perfusion pressure and coronary resistance in isolated rat heart: L-type calcium channel. *Biomedical Papers* 2011;155(1):27-32.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology* 2000;14(10):1649-60.

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 2010;459(6):923-39.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972;18(6):499-502.

Frishman WH. Beta-adrenergic blockers. *Circulation* 2003;107(18):117-119.

Furchgott RF & Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–376

Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition* 2010;26(4):359-366.

Fukai T & Ushio-Fukai M. Superoxide dismutase role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011;15(6):1583-1606.

Gragasin FS, Xu Y, Arenas IA, Kainth N, Davidge ST. Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; 23(38):38-44.

Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 1999;33(1):323–328.

Gandra PG, Alves AA, Macedo DV, Kubota LT. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. *Química Nova* 2004;27(6):980-985.

Gavras H, Brunner HR, Turini GA, Kershaw GR, Tiff CP, Cuttelod S, Gavras I, Vukovich RA, McKinstry DN. Antihypertensive effect of the oral angiotensin converting-enzyme inhibitor SQ 14225 in man. *New England Journal of Medicine* 1978;298:991-995.

Gencel VB, Benjamin MM, Bahou SN, Khalil RA. Vascular Effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy and cardiovascular disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2012;12(2):149-174.

Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant Activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48(10):4581-1589.

Griendling KK, Tsuda T, Berk Alexander RW. Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1989;14(6):S27-S33.

Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacology & therapeutics* 1992;56(2):131-190.

Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts.v1987, 1987.

Halliwell B & Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 1985,8(2):89–193

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D & Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001;37:529-34.

Hammes SR & Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocrine Reviews* 2007;28(7):726–41.

Harlow BL & Signorello LB. Factors associated with early menopause. *Maturitas* 2000.

Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Aktdependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:2118–23.

Heine, PA, Taylor JA,Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(3):12729-34.

Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine* 1995;19(3):271-280.

Hernández I, Delgado JL, Díaz J, Quesada T, Teruel MJG, Llanos MC, Carbonell LF. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2000; 279:R1599-R1605.

Hirata Y & Satonaka H. Hypertension and oxidative stress. *Japan Medical Association Journal* 2001;44(12):540-545.

Hong SC, Yoo SW, Cho GJ, Kim T, Hur JY, Park YK, Lee KW, Kim SH. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. *Menopause* 2007;14(5):835-840.

Hossin FLA. Effect of Pomegranate Peels (*Punica granatum*) Peels and its extract on obese hypercholesterolemic rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 2009;8(8):1251-1257.

Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D. Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy - heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II). *Jama Express* 2002;0560.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *Jama Express* 1998;280(7).

Ignacio DL, Frankenfeld TGP, Fortunato RS, Vaisman M, Werneck-de-Castro JPS, Carvalho DP. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 2009;53(3).

Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, De Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide* 2006;15(2):93-102.

Intapad S, Saengsirisuwan V, Prasannarong M, Chuncharunee A, Suvitayawat W, Chokchaisiri R, Suksamrarn A, Piyachaturawat P. Long-term effect of phytoestrogens from *Curcuma comosa* Roxb. on vascular relaxation in ovariectomized rats. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 2012;60(3):758-764.

Intengan HD & Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001;38:581-587.

Jayakumar R & Kanthimathi MS. Inhibitory effects of fruit extracts on nitric oxide-induced proliferation in MCF-7 cells. *Food Chemistry* 2011;126(3):956-960.

VC. Selective estrogen receptor modulation: a personal perspective. *Cancer Research* 2001;61:5683-5687.

Jurenka, JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Alternative Medicine Review* 2008;13(2):128-144.

Kao YC, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. *Environmental Health Perspectives* 1998;106(2):85-92.

Kauser K & Rubanyi GM. Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995;25:517-523.

Karpuzoglu E & Ahmed SA. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide* 2006;15(3):177-186.

Kawaii S & Lansky EP. Differentiation-Promoting Activity of Pomegranate (*Punica granatum*). *Journal of Medicinal Food* 2004;7(1):13-18.

Khoo NKH, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, Patel RP, Parks DA. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radical Biology & Medicine* 2010;49(3):339-347.

Kizhakekuttu TJ & Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovascular Therapeutics* 2010;28(1):e20-e32.

Kowala MC, Grove RI, Aberg G. Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. *Atherosclerosis* 1994;108(1):61-72.

Krych J & Gebicka L. Catalase is inhibited by flavonoids. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013;58: 148-153.

Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Saag PTVD, Burg BVD, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998;139(10):4252–63.

Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikkola M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996;93:5925-5930.

Laemmli UK. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 1970;227:680-685.

Larrosa M, González-Sarrías AG, García-Conesa MT, Tomás-Barberán, Espín JC. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54(5):1611-20.

Lee WJ, Ou HC, Hsu WC, Chou MM, Tseng JJ, Hsu SL, Tsai KL, Sheu WHH. Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells. *Journal of Vascular Surgery* 2010;52(5):1290-300

Li B, Vik SB, Tu Y. Theaflavins inhibit the ATP synthase and the respiratory chain without increasing superoxide production. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2012;23(8):953–60.

Li Y, Wen S, Kota BP, Peng G, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD. *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;99(2):239–44.

Li, C., Xu, X., Tao, Z., Wang, X. J., & Pan, Y. Resveratrol dimers, nutritional components in grape wine, are selective ROS scavengers and weak Nrf2 activators. *Food chemistry* 2014;173:218-223.

Lin AHY, Leung GPH, Leung SWS, Vanhoutte PM, Man RYK. Genistein enhances relaxation of the spontaneously hypertensive rat aorta by transactivation of epidermal growth factor receptor following binding to membrane estrogen receptors- α and activation of a G protein-coupled, endothelial nitric oxide synthase-dependent pathway. *Pharmacological Research* 2011;63(3):181-189.

Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48(7):2736-43.

Lissin LW & Cooke JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology* 2000;35(6):1403-10.

Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft KD. Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30(4):749-57.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951;265-275.

Lundeen SG, Carver JM, Mckean ML, Winneker RC. Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology* 1997;138(4):1552-8.

Machha A & Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2005;46(1):36-40.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005;25(1):29-38.

Maggi E, Marchesi E, Covini D, Negro C, Perani G, Bellomo G. Protective effects of carvedilol, a vasodilating β -adrenoceptor blocker, against in vivo low density lipoprotein oxidation in essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1996;27(4):532-538.

Maher J, Hunter AC, Mabley JG, Lippiat J, Allen MC. Smooth muscle relaxation and activation of the large conductance Ca^{++} -activated K^+ (BKCa) channel by novel oestrogens. *British Journal of Pharmacology* 2013;169(5):1153-1165.

Makino-Wakagi Y, Yoshimura Y, Uzawa Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012;417(2):880-5.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004;79(5):727-47.

Margarida J & Marques S. Rastreio dos polimorfismos genéticos XbaI e PvuII dos receptores de estrogénios alfa na consulta de ginecologia oncológica do Centro Hospitalar Cova da Beira Dedicatória. 2011.

Martucci CP & Fishman J. P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* 1993;57(2-3):237-257.

Maru I, Jun O, Shinya Y, Yasuo O, Kazuaki K, Yasuhiro O. An estrogen-like activity in pomegranate juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 2001;48(2):146-149.

Masood DN, Roach EC, Beauregard KG, Khalil RA. Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Current Drug Metabolism* 2011;11(8):693-714.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *European Journal of Clinical Investigation* 2000;106(12):1521-1530.

Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009;308(1-2):9-16.

Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TMC, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein e-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease* 2011;10(1):211.

Michel T & Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *European Journal of Physiology* 2010;459(6):807-16.

Mohan M, Waghulde H, Kasture S. Effect of pomegranate juice on angiotensin II-induced hypertension in diabetic wistar rats. *Phytotherapy Research* 2010;24(2):S196-203.

Moneim AEA; Dkhil MA, Al-Quraishy S. Studies on the effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice and peel on liver and kidney in adult male rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011;5,(20):5083-5088.

Mori Y, Ohyanagi M, Koida S, Ueda A, Ishiko K, Iwasaki T. Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research* 2006;29(3):187-95.

Moysés MR, Barker LA, Cabral AM. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001;34(7):949-58.

Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicological Sciences* 2004;80(1):14-25.

Murthy KNC, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(17):4791-5.

Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y. 17/ β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* 1995;294:625-635.

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Krust YAA, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of fas ligand in osteoclasts. *Molecular Cell* 2007;130(5):p811-823.

Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *European Journal of Clinical Investigation* 1993;92(6):2867-71.

Neyrinck AM, Héé VFV, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *British Journal of Nutrition* 2013;109(5):802-9.

Nickenig G & Harrison DG. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002;105:393-396.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 2001;81(4):1535-1565.

Obermeyer CM. Menopause across cultures: a review of the evidence. *Menopause* 2000;7(3):184–192.

Okamoto k & Aok, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Circulation Journal* 1963;27:282-293.

Ou HC, Lee WJ, Lee SD, Huang CY, Chiu TH, Tsai KL, Hsu WC, Sheu WHH. Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010;248(2):134-43.

Oviedo PJ, Sobrino A, Laguna-Fernandez A, Novella S, Tarín JJ, García-Pérez MA, Sanchís J, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011;335(2):96-103.

Pantaleão JAS, Henriques HN, Carvalho ACB, Pollastri CE, Filho PJS, Guzmán-Silva MA. Efeito da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia* 2009;31(3):124-30.

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

Pedro AO, Neto AMP, Paiva LHSC, Osis MJO, Hardy E. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. *Caderno de Saúde Pública* 2003;19(1):17-25.

Persson L, Henriksson P, Westerlund E, Hovatta O, Angelin B, Rudling M. Endogenous estrogens lower plasma PCSK9 and LDL cholesterol but not Lp(a) or bile acid synthesis in women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2012;32(3):810-4.

Peskin AV & Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using water soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta* 2000;293:157-166.

Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, Basta L, Brown EJ, Guddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, Klein M, Lamas GA, Packer M, Rouleau J, Rouleau JL, Rutherford J, Wertheimer JH, Hawkins CM. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 1992;327(10):669-677.

Picco DCR, Delbem ACB, Sasaki KT, Sumida DH, Antoniali. The effect of chronic treatment with fluoride on salivary activity, tooth, and bone in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2014;387:321-328.

Pontes-Neto OM, Silva GS, Feitosa MR, de Figueiredo NL, Fiorot JA Jr, Rocha TN. Stroke awareness in Brazil: alarming results in a community-based study. *Stroke* 2008;39(2):292-6.

Prossnitz ER & Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Endocrinology* 2011;7(12):715-26.

Proudler AJ, Crook D, Stevenson JC, Ahmed AIH, Rymer JM, Fogelman I. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. *The Lancet* 1995;346:89-90.

Rani UP, Kesavan R, Ganugula R, Avaneesh T, Kumar UP, Reddy GB, Dixit M. Ellagic acid inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and prevents atheroma formation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2013;24(11):1830-9.

Reckelhoff JF & Fortepiani LA. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension* 2004;43(5):918–23.

Reckelhoff JF & Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2003;284:R893-R912.

Regoli D, Barabé J, Park WK. Receptors for bradykinin in the rabbit aorta. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1977;55(4):855-867.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005;307(5715):1625-30.

Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of nad(p)h oxidase assembly attenuates vascular O_2^- and systolic blood pressure in mice. *Circulation Research* 2001;89(5):408-414.

Richard D, Rochon L, Deshaies Y, Denis R. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1987;253(5):R740-745.

Riso P, Visioli F, Gardana C, Grande S, Brusamolino A, Galvano F, Galvano G, Porrini M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53(4):941-7.

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology* 1949;156:261-273.

Rodrigues E, Mariutti LRB, Faria AF, Mercadante AZ. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry* 2012;134(2):704-11.

Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(23): 1950-2.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Ockene J. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 2002;288(3):321-333.

Rubin B, Antonaccio MJ, Goldberg EM, Harris DN, Itkin AG, Horovitz ZP, Panasevich RE, Laffan RJ. Chronic antihypertensive effects of captopril (SQ 14,225), an orally active angiotensin I-converting enzyme inhibitor, in conscious 2-kidney renal hypertensive rats *European Journal of Pharmacology* 1978;51(4):377-388.

Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 2001;104:1767-72.

Ruhlen RL, Howdeshell KL, Mao J, Taylor JA, Bronson FH, Newbold RR, Welshons WV, Vom Saal FS. Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the "fetal estrogenization syndrome" and obesity in cd-1 mice. *Environmental Health Perspectives* 2008;116(3):322-328.

Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar I; Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 2006;24(1):75-84.

Santos RL, Silva FB, Ribeiro Jr. RF, Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2014;18(2):89-103.

Santos RL, Marin EB, Gonçalves WLS, Bissoli NS, Abreu GR, Moysés MR. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica* 2010;200(3):203-10.

Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 2000;283(4):485-91.

Schenkel PC, Fernandes RO, Viegas VU, Campos C, Fernandes TRG, Araujo ASR, Belló-Klein A. Catalase influence in the regulation of coronary resistance by estrogen: joint action of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014.

Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 1999;66(1):11-7.

Semenkovich CF & Ostlund RE. Estrogens induce low-density lipoprotein receptor activity and decrease intracellular cholesterol in human hepatoma cell line Hep G2. *Biochemistry* 1987;26(16):4987-92.

Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clinica Chimica Acta* 2004;348(1-2):63-68.

Sharaf A & Nigm SAR. The oestrogenic activity of pomegranate seed oil. *Journal of Endocrinology* 1964;29:91-92.

Shang Y & Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002;295(5564):2465-8.

Shen Y, Croft KD, Hodgson JM, Kyle R, Lee IE, Wang Y, Stocker R, Ward NC. Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. *Biochemical Pharmacology* 2012;84(8):1036-44.

Shingai Y, Fujimoto A, Nakamura M, Masuda T. Structure and function of the oxidation products of polyphenols and identification of potent lipoxygenase inhibitors from Fe-catalyzed oxidation of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011;59(15):8180-6.

Shuster LT, Rhodes DJ, Gostout BS, Grossardt BR, Rocca WA. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas* 2010;65(2):161-166.

Slater AFG, Stefan C, Nobel I, Dobbelsteen DJVD, Orrenius S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology Letters* 1995;82-83:149-153.

Soloff MS & Szego CM. Purification of estradiol receptor from rat uterus and blockade of its estrogen-binding function by specific antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1969;34(1):141-147.

Sreeja S, Kumar TRS, Lakshmi BS, Sreeja S. Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2012;23(7):725-32.

Stamler J, Neaton JD, Wentworth DN. Blood pressure (systolic and diastolic) and risk of fatal coronary heart disease. *Hypertension* 1989;13(5):11-112.

Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008;469(2):209-219.

Stirone C, Chu Y, Sunday L, Duckles SP, Krause DN. 17 β -estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction. *European Journal of Pharmacology* 2003;478(1):35-38.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Uleri S, Magagna A, Salvetti A. Lacidipine Restores Endothelium-dependent vasodilation in essential hypertensive patients. *Hypertension* 1997;30:1606-1612.

Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, Ando J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to

fluid shear stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;240(3):737-741.

Tang EHC, Leung FP, Huang Y, Feletou, M, So KF, Man RYK, Vanhoutte PM. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *British Journal of Pharmacology* 2007;151(1):15-23.

Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2009;9:27.

Thom TJ. International mortality from heart disease: rates and trends. *International Journal of Epidemiology* 1989;18:S20–S28.

Ueda K, Lu Q, Baur W, Aronovitz MJ, Karas RH. Rapid estrogen receptor signaling mediates estrogen-induced inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2013;33(8):1837-43.

Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R. Acute activation of maxi-k channels (hslo) by estradiol binding to the subunit. *Science* 1999;285(5435):1929-1931.

Van Den Ende W & Peshev D, De Gara L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology* 2011;22(12):689-697.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation Journal* 2009;73(7):595-601..

Varadarajan P, Rathinaswamy G, Asirvatham D. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of *Rheo discolor*. *Ethnobotanical Leaflet* 2008;12:841–845.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e

marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* 2007;30(5):1323-1338.

Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews* 2004;25:612-628.

Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001;15(12):2121-30.

Wang H, Jessup JA, Zhao Z, Da Silva J, Lin M, MacNamara LM, Ahmad S, Chappell MC, Ferrario CM, Groban L. Characterization of the cardiac renin angiotensin system in oophorectomized and estrogen-replete mRen2.Lewis rats. *PloS one* 2013;8(10):e76992.

White RE. Estrogen and vascular function. *Vascular Pharmacology* 2002;38(2):73-80.(a)

White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, Catravas JD, Snead C, Carrier GO, Zhu S, Yu X. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca(2+)-activated K(+) channels in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovascular Research* 2002;53(3):650-61.(b)

Willianson KS, Hensley K, Floyd R. Fluorometric and colorimetric assessment of thiobarbituric acid-reactive lipid aldehydes in biological matrices. *Methods in Pharmacology and Toxicology* 2003:57-65..

Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AHS, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler K, Schmidt HHHW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension* 2010;56(3):490-7.

Wu D, Ma X, Tian W. Pomegranate husk extract, punicalagin and ellagic acid inhibit fatty acid synthase and adipogenesis of 3T3-L1 adipocyte. *Journal of Functional Foods* 2013;5(2):633-641.

Xia N, Daiber A, Habermeier A, Closs EI, Thum T, Spanier G, Lu Q, Oelze M, Torzewski M, Lackner KJ, Munzel T, Forstermann U, Li H. Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2010;335(1):149-154.

Yang E, Jeon SB, Baek I, Chen Z, Jin Z, Kim IK. 17beta-estradiol attenuates vascular contraction through inhibition of RhoA/Rho kinase pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2009;380(1):35-44.

Yang HYT, Erdos EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Acta Biochimica et Biophysica* 1970;214:374-376.

Yen CH, Hsieh CC, Chou SY, Lau YT. 17Beta-estradiol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced generation of reactive oxygen species in endothelial cells. *Life Sciences* 2001;70(4):403-13.

Yilmaz B & Usta C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aortic rings and the underlying mechanism. *Phytotherapy Research* 2013;27(2):285-9.

Yu X, Ma H, Barman SA, Liu AT, Sellers M, Stallone JN, Prossnitz ER, White RE, Han G. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism* 2011;301(5):E882-8.

Zanella I, Marrazzo E, Biasiotto G, Penza M, Romani A, Vignolini P, Caimi L, Di Lorenzo D. Soy and the soy isoflavone genistein promote adipose tissue development in male mice on a low-fat diet. *European Journal of Nutrition* 2014;1-13.

Zahar SEV, Aldrighi JM, Neto AMP, Conde DM, Zahar LO, Russomano F. Qualidade de vida em usuárias e não usuárias de terapia de reposição hormonal. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2005;51(3):133-8.

Zahar SEV, Aldrighi JM, Tostes MA, Russomano F, Zahar LO. Avaliação da qualidade de vida na menopausa. *Reprodução e Climatério* 2001;16:163-72

Zhang XF & Tan BK. Antihyperglycemic and antioxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2000;27:358–363.

Zhao J, Imbrie GA, Baur WE, Iyer LK, Aronovitz MJ, Kershaw TB, Haselmann GM, Lu Q, Karas RH. Estrogen receptor-mediated regulation of microRNA inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2013;33(2):257-65.

Zhu L, Yang Y, Xu P, Zou F, Yan X, Liao L, Xu J, O'Malley BW, Xu Y. Steroid Receptor Coactivator-1 mediates estrogenic actions to prevent body weight gain in female mice. *Endocrinology* 2013;154:150-158.

Zou JZ, Wang ZR, Huang YZ, Cao KJ, Wu JM. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *International Journal of Molecular Medicine* 2003;11(3):317-20.

PAPER

Pomegranate enhances endothelium-dependent relaxation in an isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats.

Nathalie Tristão Banhos Delgado^a, Tiago Dal-cin^b, Leandro Ceotto Lima^c, Wender do Nascimento Rouver^a, Jocitonio Barcellos Rodrigues^a, Alexandre Martins Costa Santos^a, Helder Mauad^a, Roger Lyrio dos Santos^a, Margareth Ribeiro Moysés^{a*}

^a Department of Physiological Sciences, Biomedical Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^b Department of Pharmacology State University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^c Department of Biophysics and Physiology Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author: Avenue Marechal Campos, 1468, 29040-755, Vitória, ES, Brazil Tel.: +55 27 3335 7353; fax: +55 27 3335 7353
E-mail address: mmoyses51@gmail.com (M.R. Moysés).

Abbreviations

BK; bradykinin

CPP; coronary perfused pressure

CVD; cardiovascular disease

E₂; 17β-estradiol

EDHF; endothelium-derived hyperpolarizing factor

eNOS; endothelial nitric oxide synthase

H₂O₂; hydrogen peroxide

HDL; high density lipoproteins

LDL; low density lipoprotein

L-NAME; L-Nitro-Arginine Methyl Ester

MDA; malondialdehyde

NO; nitric oxide

O₂⁻; superoxide anion

OVX; ovariectomized

PG; *Punica granatum L.*

ROS; oxygen species reactive

SBP; systolic blood pressure

SHR; spontaneously hypertensive rats

SOD-2; superoxide dismutase - 2

TC; total cholesterol

TG; triglycerides

ABSTRACT

Pomegranate (PG), a phytoestrogen, possesses several biological actions and may be beneficial for the prevention of disease, including cardiovascular disease (CVD). We hypothesized that treatment with PG would improve the vascular reactivity. The purpose of this study was to examine the cardiovascular and antioxidant effects of treatment with PG in hypertensive and ovariectomized rats. SHR females were divided in Sham and OVX, treated with PG extract (250 mg/ kg) or filtered water (Vehicle) for 30 days. The systolic blood pressure (SBP) was measured by tail plethysmography. The heart was removed and perfused according to the Langendorff method. The protein expression of SOD-2, catalase and eNOS were analyzed by western blot. A dose-response curve to bradykinin (BK) was performed followed by inhibition with L-NAME. We observed significant increase in SBP in the OVX group, and was reduced after treatment. The baseline CPP was reduced in the Sham group. The bradykinin-induced relaxation was significantly higher in the treated group. Ovariectomy significantly reduced the relaxation, which was restored by treatment with PG, and L-NAME abolished the BK-induced relaxation in all groups. There was an increase in SOD expression and decrease in eNOS levels in the OVX-PG group. The MDA levels were significantly reduced in the Sham-PG group. We observed a reduction in total cholesterol and LDL in the Sham-PG group. In addition, we observed an increase in oestrogen and progesterone levels in the OVX-PG group. Therefore, we suggest a therapeutic role of PG extract on the cardiovascular system and a reduction in oxidative stress.

Keywords: Hypertension, Pomegranate, Phytoestrogens, Antioxidants effects, Vasodilatation

1. Introduction

The cardiovascular disease (CVD) is one of the leading causes of death in many economically developed nations as well as in emerging economies. Although some of the major risk factors for CVD are not "modifiable", such as age, sex, genetic predisposition, diet and lifestyle issues are recognized as the major modifiable risk factors [1]. The greater incidence of hypertension in men and postmenopausal women than in premenopausal women has suggested vascular protective effects of female sex hormones in premenopausal woman [2]. The beneficial vascular effects of oestrogen have been ascribed to a variety of factors, including endothelium-dependent [3] and independent vascular relaxation that involve direct action on vascular smooth muscle [4] and reduction of the proliferation of vascular smooth muscle [5]. The beneficial effects of oestrogen replacement therapy in postmenopausal women have further supported a protective role for oestrogen against hypertension [6]. The beneficial effects of oestrogen on oxidative stress might be attributable to their capacity to reduce the rate of formation of reactive oxygen species (ROS). Thus, new substances that could offer similar benefits to oestrogen are necessary [7].

In recent years, consumers, researchers, and the food industry have shown increased interest in how food products can help maintain health, and the role that diet plays in the prevention and treatment of many illnesses has become widely accepted [8]. There are exogenous agents that have the ability to mimic endogenous hormones such as oestrogens and androgens [9]. These

compounds are present in the environment and range from natural plant-derived molecules to man-made substances [10]. From a dietary point of view, the plant-derived phytoestrogens have attracted attention as “natural” selective estrogen receptor modulators (SERMs) that are similar to estradiol in structure and function [11]. Phytoestrogens may have beneficial effects on the cardiovascular system and may also alleviate common illnesses afflicting women, such as menopausal symptoms, osteoporosis and breast cancer [12]. The fruit with the highest phytoestrogen concentrations is pomegranate (PG), which contains relevant amounts of phenolic antioxidants, particularly ellagic acid [13]. Recently, oestrogenic/antioestrogenic activity via the oestrogen receptor (ER) subtypes ER α , ER β [14] and GPER has also been proposed for phytoestrogens [15].

There has been an elevated interest in PG as a medicinal and nutritional product because of its multifunctionality and benefits for the human diet and disease risk reduction. This is mainly due to its high polyphenol content, which contributes to a strong antioxidant effect and is a useful tool against damage caused by hypertension. However, information about the specific role of PG extract in coronary arteries has not been fully elucidated. We hypothesized that treatment with PG can improve or prevent CVD and hypertension in ovariectomized females by reducing oxidative stress. The aim of this study was to determine the effect of chronic treatment with PG on the endothelium-dependent vasodilator response.

2. Methods and materials

2.1. Animals

SHR female (4 weeks old) were randomly divided into four groups: Sham Vehicle (Sham-V), Sham Pomegranate (Sham-PG), OVX Vehicle (OVX-V) and OVX Pomegranate (OVX-PG). Animals were obtained from animal facilities at the Federal University of Espirito Santo. PG extract was dissolved in filtered water and administered for 30 days orally by gavage. The control groups received filtered water. At the end of the treatment, the animals were 8 weeks old. The animals were maintained in a room with controlled temperature (22 ± 2 °C) under a 12 h light/dark cycle. All procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines for animal research, and the protocols were previously approved by the Institutional Ethics Committee for Use of Animals (CEUA 054/2012).

2.2. Experimental design

The animals were subjected to two experimental protocols.

Protocol 1: Measurement of systolic blood pressure (SBP), serum collection for biochemical and hormonal analysis, removal of fat deposits and functional studies on an isolated heart.

Protocol 2: Plasma collection for malondialdehyde (MDA) analysis, and collecting the septal coronary artery and the left anterior descending artery to examine the expression of enzymes.

2.3. Non-invasive arterial blood pressure assessment

Non-invasive measurement of tail-cuff pressure as an estimate of systolic arterial pressure (SBP) was done one day before the treatment had started and on the last day (30th) of the treatment. Rats were warmed in a restraining chamber, and occluding cuffs and pneumatic pulse transducers were placed on the rat's tail. A sphygmomanometer was inflated and deflated automatically, and the tail-cuff signals from the transducer were automatically collected using an IITC apparatus (IITC Inc., California, USA) connected to a computer. For each blood pressure measurement session, the mean of three arterial blood pressure readings was recorded for each rat.

2.4. Preparation of pomegranate peel extract

For extraction purposes, the peel was removed and dried in the shade for 10 days before the material was ground. Extract preparation protocol was modified from that described in Lapornik *et al.* (2005)[16]. The grounded material (85,71 g) was mixed in 1000 mL of ethanol (95 °GL) in an amber bottle until the complete extraction of peel compounds. Afterwards, the sample was *vacuum filtered*, the supernatant was collected, and the alcohol was evaporated in a rotary evaporator at 60 °C. Crude extract (68 %, w/w) was kept in a refrigerator in an amber bottle. The hydro-alcoholic extract was diluted in filtered water (250 mg/Kg/2 mL) before administration.

2.5. Phytochemical analysis

The crude extract was fractionated by work bench chromatography using different concentrations: 30, 50, 70 and 95 % ethanol, sequentially. The chromatographic column used was 33.5 cm high and 0.7 cm in diameter and was filled with flash silica 70-230 mesh. A total of two column volumes were eluted in 0.5 mL/min. Fractions of each ethanol concentration were collected and their volumes reduced 10 times using a speedvac. Extracts were tested for the presence of active principles such as triterpenoids, steroids, glycosides, saponins, alkaloids, flavonoids, tannins, proteins, free amino acids, carbohydrate and organic acid. Standard procedures were used [17].

2.6. Ovariectomy

Ovariectomy was performed under general anesthesia with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) i.p. A dorsolateral incision was made through skin, and the underlying muscle was dissected to locate the ovary and fallopian tube. The tube was ligated to the suture line and the ovary was removed. The muscle and skin were then sutured with an absorbable suture. After the surgery, the animals received an injection of antibiotic (2,5 % enrofloxacin, 0,1 mL, i.m). All animals were subjected to surgery and began the treatment with PG extract during the same time period.

2.7. Isolation of Coronary Arteries

The animals were sacrificed by decapitation. The thorax cavity was opened, and the heart was removed and placed in cold Krebs-Henseleit solution buffer (in mmol/L): 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄.7H₂O, 2,5 CaCl₂, 1,2

KH_2PO_4 , 5,5 glucose and 0,01 Na_2EDTA at pH 7.4 during the dissection procedure. The left anterior descending branch of the left coronary artery and the septal branch were isolated in a dissection microscope (D.F. Vasconcelos M900, São Paulo, Brazil), freed of the surrounding ventricular muscle tissue and flash frozen in liquid nitrogen. Afterwards, the samples were stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until their use.

2.8. Isolated Heart Preparation

To assess coronary perfusion pressure (CPP), the rats were anesthetized with chloral hydrate (40 mg/kg, i.p.) and decapitated for collection of serum or plasma. The heart was excised and immediately perfused at a constant flow, using a modified Langendorff preparation protocol as previously described [18]. Briefly, using a Langendorff apparatus (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Germany), the isolated hearts were perfused with modified Krebs solution containing (in mM): NaCl, 120; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,25; KCl, 5,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2,0; NaHCO_3 , 27,0; Na_2SO_4 , 1,2; EDTA, 0,03 and glucose 5,5 equilibrated with a 95 % oxygen and 5 % carbon dioxide mixture at a controlled pressure of 100 mmHg to give a pH of 7.4, at a rate of 10 mL/min with a peristaltic pump (Hugo Sachs, Germany), and kept at $37\text{ }^\circ\text{C}$. A fluid-filled balloon was introduced into the left ventricle through a steel cannula with a latex balloon and connected to a transducer (AD Instrument MLT0380/A Reusable BP Transducer) to measure the isovolumetric force. The balloon was pressurized with a spindle syringe until it reached a preload of 10 mmHg. CPP was monitored with a transducer connected to a sidearm of the aortic perfusion catheter. After the stabilization period (40 min), baseline CPP was measured.

The endothelium-dependent vasodilation was analyzed in coronary arterial bed, randomly, through *in bolus* administration (0,1 mL) of BK (Sigma, St. Louis, MO) in concentrations of 0.1, 1, 10, 100 and 1000 ng, followed by 100 μ M of L-Nitro-Arginine Methyl Ester (L-NAME).

2.9. Western Blot

The coronary arteries were homogenized in lysis buffer containing (mmol/L) 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 5 EDTA.2Na, and 1 MgCl₂ in addition to protease inhibitor (Sigma Fast; Sigma, USA). The protein concentration was determined by the Lowry method and bovine serum albumin (BSA) was used as the standard. Equal amounts of protein (50 μ g) were separated by 10 % SDS-PAGE. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes and incubated with mouse monoclonal antibodies for catalase (CAT; 1:2000; Sigma Fast, USA), rabbit polyclonal antibodies for superoxide dismutase-2 (SOD-2; 1:500; Sigma Fast, USA) and gp91phox (1:1000; BD, New Jersey, EUA). After washing, the membranes were incubated with either an alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG (1:3000, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) or an anti-rabbit antibody (1:7000; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). The bands were visualized using a NBT/BCIP system (Invitrogen Corporation, CA, USA) and quantified using *Image J* software (National Institute of Health, NIH). The same membranes were used to determine β -actin expression using a mouse monoclonal antibody to β -actin (1:5000; Sigma Chemical, CO, St Louis, EUA), and the results were calculated using the ratio of the density of specific bands to the corresponding β -actin.

2.10. Determination of lipid peroxidation

The assay for quantification of TBARS is based on the reaction of MDA with thiobarbituric acid (TBA), which forms a product that can be fluorometrically or spectrophotometrically measured at 532 nm [19]. To determine the degree of lipid peroxidation, 100 μ L of plasma was separated and added to 100 μ L of a cold concentrated solution of TBA (TBA 1% NaOH 0.05 M and 0.1 mM BHT), and 100 μ L of phosphoric acid (H_3PO_4). The samples were incubated in a dry bath for 25 minutes at 98 °C and then placed in a freezer for 10 minutes. Thereafter, 375 μ L of butanol was added to tubes, vortexed for 10 seconds and then centrifuged for 5 minutes at 2000 rpm. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm and 600 nm. The concentration of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of 156 (mM x cm) [20].

2.11. Lipid Profile

After decapitation, 5 mL of blood samples was collected and centrifuged (IV Excelsa® Model 280R) at 3000 g for 15 minutes at 4 °C. The serum was collected and stored at -20 °C. The concentrations of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density cholesterol (HDL) and low density cholesterol (LDL) were determined using AA Colestat Enzyme Kits, TG Color GPO / PAP AA and HDL Cholesterol Single Phase AA Plus, respectively, with a Konelab spectrophotometer, model 600i. The concentrations of LDL and VLDL were determined using the following equation $VLDL = \text{Triglycerides}/5$ and $LDL \text{ cholesterol} = \text{total cholesterol} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$.

2.12. Plasma 17 β -estradiol Concentrations

Blood samples were collected in sterile tubes containing EDTA/K3, centrifuged at 3.000 g for 15 min at 4 °C (Fanem, São Paulo, Brazil) and stored at -80 °C until use. Plasma 17 β -estradiol (E_2) and progesterone concentrations were analyzed by the electro-chemiluminescence immunoassay method (Elecsys® 2010, Roche, Basel, Switzerland) using an enzymatic kit (Cobas®).

2.13. Statistical Analyses

Data analysis was conducted using the statistical program Graph-Pad Prism 6. Data are reported as mean \pm SEM. Data for enzyme expression, lipid profile, hormonal profile, TBARS and baseline CPP were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test, considering the treatment as the main factor. The bradykinin curve dose-responses were tested using the two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post-hoc test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Progression of systolic blood pressure

We observed a progressive increase in SBP in the Sham and OVX groups, although it was significant only in the OVX group. The treatment significantly prevented an increase in SBP for both the Sham and OVX groups (165 ± 4 , 176 ± 5 , 150 ± 2 mmHg and 155 ± 4 , 173 ± 4 , 150 ± 1.5 mmHg) for 0 Day, 30 Day-V and 30 Day-PG, respectively, according to Figure 1.

3.2. Coronary vascular reactivity

In Figure 2, we observed that the treatment significantly reduced the basal PPC only in the Sham group (Sham-V: 137 ± 6 mmHg to Sham-PG: 110 ± 5 mmHg). In Figure 3, we analyzed the functionality of the endothelium through the curve dose-response to bradykinin and observed that the vasodilator response was present in both the Sham (3/A) and OVX (3/B) groups and had a significantly increased vasodilator response at the highest concentration compared to their respective control groups. After inhibition of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) with L-NAME, we observed an attenuation or absence of response in the Sham and OVX groups.

3.3. Analysis of the levels of malondialdehyde

Figure 4 shows that treatment significantly reduced MDA levels in the Sham group (Sham-V: 16 ± 2 nmol/mL vs Sham-PG: 8 ± 0.9 nmol/mL). However, the same effect was not observed in the OVX group (OVX-V: 16 ± 0.9 nmol/mL vs OVX-PG: 13 ± 0.8 nmol/mL).

3.4. Analysis of protein expression (Western blot)

We also found that the treatment was effective in altering the expression of enzymes. SOD-2 (Figure 5/A) showed increase expression in the OVX group after treatment (OVX-V: 0.82 ± 0.1 vs OVX-PG: 1.307 ± 0.124). However, we did not find significant differences in the expression of catalase (Figure 5/B). The expression of eNOS (Figure 5/C) in both groups was not influenced by treatment; however, ovariectomy caused a significant decrease in eNOS expression (Sham-V: 1.449 ± 0.19 ; Sham- PG: 1.353 ± 0.14 ; OVX-V: 0.682 ± 0.08 and OVX-PG: 0.980 ± 0.107).

3.5. Lipid profile

We observed that treatment reduces the total cholesterol and LDL levels (Figure 6/A and B) in the Sham-PG group (CT 39 ± 3 mg/dL and LDL: 14 ± 0.6 mg/dL) compared to the Vehicle group (CT: 54 ± 5 mg/dL and LDL: 21 ± 1.5 mg/dL). In the OVX group, treatment with PG had significantly reduced levels of triglycerides and LDL (Figure 6/C and D) (TG: 37 ± 3 mg/dL and LDL: 18 ± 1.5 mg/dL) when compared to the Vehicle group (CT: 65 ± 4.5 mg/dL and LDL: 24 ± 2 mg/dL). HDL levels were not altered in any of the studied groups.

3.6. Hormonal profile

Furthermore, we analyzed whether the treatment was effective in altering hormone levels due to the presence of phytoestrogens in the crude extract. As shown in qualitative screening of phytochemicals, triterpenoids, glycosides, saponins, flavonoids, tannins, carbohydrates, and acid organic were found (unpublished results). First, we observed that castration was effective for the reduction in hormone levels in both groups. There was not an increase in the concentration of oestrogen (Figure 7/A) in the Sham-PG group compared to the Sham-V group. However, the OVX-PG group showed an increase in the oestrogen concentration (62 ± 8 pg/mL) compared to the OVX-V group (7 ± 2 pg/mL). However, the levels of progesterone (Figure 7/B) were significantly increased in both groups (Sham-V: 21 ± 3 pg/mL, Sham-PG: 39 ± 5 pg/mL, OVX-V: 5 ± 1 pg/mL and OVX-PG: 16 ± 3 pg/mL).

4. Discussion

The present study aimed to analyze the effects of treatment with hydro-alcoholic extract of PG on cardiovascular parameters in hypertensive female rats with and without a sex hormone deficiency. The treatment was effective in attenuating the SBP and preventing its progression. In addition, it also improved the endothelium-dependent relaxation, especially through nitric oxide (NO), by reducing oxidative stress as demonstrated by the analysis of MDA. Moreover, treatment was effective in improving the lipid profile.

There is evidence in humans that hypertension impairs endothelial function, the main characteristic of which is reduction in the bioavailability of NO [21], i.e., endothelial dysfunction. The sex hormone deficiency potentiates progression of endothelial dysfunction because the cardiovascular protection observed in females has been attributed to the beneficial effects of oestrogen on endothelial function. Oestrogen physiologically stimulates the release of endothelium-derived vasodilator factors and inhibits the renin-angiotensin system [22]. The damages related to hormonal deficiency were shown in Figure 1, with an increase in SBP after ovariectomy.

Despite the damage on SBP that was generated by ovariectomy on an animal model that already had hypertension, we found that the treatment with PG was able to prevent the progression and attenuate the SBP. PG can act as a therapeutic agent for hypertension due to its potent antioxidant activity, which is associated with anti-atherosclerotic effects via polyphenols. These polyphenols

are capable of protecting NO against superoxide anion (O_2^-) - mediated oxidation, thus increasing certain biological actions of NO, such as inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation [23]. The most potent antioxidant activity of PG could be related to its high flavonoid content, as well as the specific type of polyphenols present in PG (specifically hydrolysable tannins). In addition to their free radical scavenging capabilities, PG also possesses properties of transition metal ion chelation [24]. Furthermore, the polyphenols are able to reduce the serum ACE activity due to its chemical structure, which promotes chelation of zinc metals present in the structure of the enzyme [25]. The inhibitory effect of PG on serum ACE activity can further contribute to an antioxidant environment and attenuated cardiovascular risk [26]. These characteristics of polyphenols in PG confer protective effects on the blood vessels by improving the reactivity due to a reduction of oxidative stress in endothelial cells. Our data corroborate with the study of Machha & Mustafa (2005)[27], which showed that chronic treatment with flavonoids improves endothelium-dependent relaxations to ACh, reduces SBP and significantly improves endothelial function in hypertensive animals.

Moreover, the treatment was effective in reducing the baseline CPP in the Sham group, showing that the presence of oestrogen is necessary for the PG action. However, our main objective was to assess the impact of PG treatment on the endothelium response to bradykinin.

The endothelium-dependent relaxation was potentiated in the Sham-PG and OVX-PG groups, and the L-NAME blockade of response, showing that there is

strong participation of NO. The results indicate a possible role of polyphenols attenuating oxidative stress as observed by endothelial recovery, thus making it more functional. To our knowledge, we are the first to demonstrate the mechanism with which PG hydro-alcoholic extract modulates vascular reactivity of the coronary bed. The crude extract acts as exogenous antioxidant system neutralizing ROS and increases the NO bioavailability. The antioxidant system functions to inhibit and/or reduce the synthesis of ROS and neutralize and repair the damage caused by ROS [28]. These effects of polyphenols on the relaxation corroborate the findings of several other studies [27, 29, 30].

PG fruit is very rich in phytoestrogens and has cardioprotective effects comparable to that of E₂ [31]. However, urolithins A and B (enterophytoestrogens), the microflora metabolites produced from dietary ellagic acid, display both estrogenic and antioestrogenic activities [10]. In addition, in our study, qualitative phytochemical screening of the crude extract revealed the presence of triterpenoids, glycosides, saponins, flavonoids, tannins, carbohydrates and organic acids.

Nevertheless, to demonstrate that the cardioprotective effects of PG are derived in part from the estrogenic action, we decided to analyze the hormonal profile of these animals. The results show that after treatment with PG there was an increase in the concentration of oestrogen only in the ovariectomized group and an increase in the progesterone concentration in both groups. These data showed that supplementation with PG can maintain sex hormone levels and their benefits on the cardiovascular system.

To verify the efficacy of treatment in reducing oxidative stress, we analyzed MDA levels and observed that it was reduced after treatment in the Sham group. Our results corroborate the results of several studies [32-34]. Oxidative stress usually refers to an increase in ROS generation, thus overloading the enzymatic antioxidant system to neutralize all these substances [28]. Oestrogen deprivation causes oxidative stress because oestrogen has the capacity to reduce ROS synthesis [7]. PG treatment was not effective in reducing the levels of lipid peroxidation in ovariectomized rats. However, López-Grueso *et al.*, (2014)[35] verify that hormonal treatment in ovariectomized rats is effective in reducing MDA levels when it is performed immediately after surgery. The results observed in OVX-PG animals suggest that the presence of endogenous oestrogen is required for activity of the extract in reducing oxidative stress. Interestingly, we found increased expression of antioxidant enzyme SOD-2, which reduces levels of O_2^- and consequently increases levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) without changes in the expression of catalase. However, the endothelium-dependent relaxation and reduced levels of lipid peroxidation without altering the expression of SOD-2 in the Sham–PG group suggest that the treatment was effective in reducing the concentrations of O_2^- due to the high antioxidant power of polyphenols.

In various pathological situations, the production of ROS is increased, leading to a decrease in NO-mediated relaxations. However, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated relaxations are temporarily enhanced to compensate for the reduced NO-mediated relaxations [36]. These observations may explain our results of coronary vascular reactivity in the OVX

group since it has been shown to have potentiating effects after treatment. This suggests that castration promotes a reduction in the formation of NO via eNOS favouring the path of EDHF. Thus, the castration could contribute to the formation of superoxide anion, a precursor of H_2O_2 formation, and could act as EDHF. In fact, the treatment seems to have enhanced the formation of H_2O_2 by increasing levels of SOD-2, but the catalase expression did not change. Therefore, we suggest that enhancement of endothelium-dependent relaxation in the OVX--PG group is linked to increased formation of H_2O_2 that could act as EDHF in microvessels [36].

The phytoestrogens are a heterogeneous group with structural similarities to E_2 that allow them to mimic the effects of E_2 , such as hypocholesterolemic effects [12] that improve cardiovascular function and reduce the risk of CVD associated with menopause [37]. Similarly, we observed a significant reduction in TC and LDL cholesterol levels in the Sham-PG group and in TG and LDL cholesterol in ovariectomized rats. Other studies showed that PG peels and extract help to improve atherogenic markers, such as LDL-cholesterol in high-fat diet-induced obesity [38]. These results are also observed in clinical studies on diabetic subjects with hyperlipidemia, where the consumption of concentrated PG juice improved plasma lipid profiles. Notwithstanding, triacylglycerol was seemingly unaffected by juice consumption [39].

The action of phytoestrogens is similar to oestrogen. However, Fuhrman *et al.* (2010)[40] demonstrated that the polyphenols in PG increased levels of the enzyme HDL-associated PON-1 and reduced LDL-associated paraoxonase-1.

Furthermore, they preserved and increased PON-1 activity. PON-1 is the largest anti-atherosclerotic responsible for protecting the HDL and LDL component of lipid oxidation [25]. Therefore, it is clearly demonstrated that the use of PG extract is effective in promoting anti-atherogenic effects that contribute to reduction in the incidence of CVD. Nevertheless, clinical studies are required to elucidate all these benefits because phytoestrogens are a diverse group with different forms of metabolism and bioavailability that promote different effects in experimental *in vivo* and *ex vivo* models.

We conclude that PG extract contains antioxidants that are able to increase the bioavailability of NO by reducing the synthesis and neutralizing ROS, thus contributing to a better effect on relaxation in the coronary bed, preventing the progression and attenuating SBP and improving anti-atherogenic parameters. Most of these effects may be related to estrogenic action due to the presence of phytoestrogens. These findings have important implications for the prevention of CVD, especially in women with sex hormone deficiency. Characterization of PG actions could lead to a better understanding of hypertension symptoms and perhaps better forms of therapy.

Acknowledgment

This study was funded by research grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors have stated that there was no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res* 2008;28:729-737.
- [2] Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 1996;10:615-624.
- [3] Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM. Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:19-22.
- [4] Jiang C, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol* 1991;104:1033-1037.
- [5] Ueda K, Lu Q, Baur W, Aronovitz MJ, Karas RH. Rapid estrogen receptor signaling mediates estrogen-induced inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Arterioscl Throm Vas* 2013;33:1837-43.
- [6] Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *New Engl J Med* 1991;325:756-762.
- [7] Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV, Viña J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:205–211.

- [8] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Spices as functional foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nut* In Press 2010;51:13-28.
- [9] Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Persp* 1996;104:715-740.
- [10] Larrosa M, González-Sarrías AG, García-Conesa MT, Tomás-Barberán, Espín JC. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *J Agr Food Chem* 2006;54:1611-20.
- [11] Krishnan V, Heath H, Bryant HU. Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Vitam Horm* 2000;60:123-147.
- [12] Lissin LW, Cooke JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(6):1403-10.
- [13] Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 2007;68:2986–3008.
- [14] Papoutsi Z, Kassi E, Tsiapara A, Fokialakis N, Chrousos GP, Moutsatsou PM. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER α and ER β . *J Agr Food Chem* 2005;53:7715-7720.

- [15] Dong WH, Chen JC, He YL, Xu JJ, Mei YA. Resveratrol inhibits KV2.2 currents through the estrogen receptor GPER30-mediated PKC pathway. *Am J Physiol - Cell Ph* 2013;305:C547-C557.
- [16] Lapornik B, Prosek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* 2005;71:214–22.
- [17] Raman N. *Phytochemical Technique*. New Indian Publishing Agencies: New Delhi 2006;p19.
- [18] Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moysés MR. Endothelial mediators of 17 β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:569–575
- [19] Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Reactive species of oxygen and nitrogen, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for its determination. *Quim Nova* 2007;30(5):1323-1338.
- [20] Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine* 1995;19(3):271-280.
- [21] Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001;37:529-34.

[22] Santos RL, Da Silva FB, Ribeiro RF, Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2014;18(2):89-103.

[23] Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, De Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide-Biol Ch* 2006;15:93-102.

[24] Aviram M & Rosenblat R. Pomegranate protection against cardiovascular diseases. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2012.

[25] Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 2001;158:195-8.

[26] Mohan M, Waghulde H, Kasture S. Effect of pomegranate juice on angiotensin II-induced hypertension in diabetic wistar rats. *Phytother Res* 2010;24:S196-203.

[27] Machha A & Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharm* 2005;46:36-40.

[28] Halliwell B & Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 14^o. New York: Biosciences Oxford, 2007.851p.

[29] Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid. *Pharmacol Res* 2007;55:385-91.

[30] Yilmaz B, Usta C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aortic rings and the underlying mechanism. *Phytother Res* 2013;27:285-9.

[31] Sreeja S, Kumar TRS, Lakshmi BS, Sreeja S. Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. *J Nutr Biochem* 2012;23:725-32.

[32] Basu A, Newman ED, Bryant AL, Lyons TJ, Betts NM. In adults with type 2 diabetes but have no effects in healthy volunteers: a pilot study. *Nutr Metab* 2013.

[33] Ahmed MAE, El Morsy EM, Ahmed AAE. Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats. *Life Sci* 2014;110:61-69.

[34] De Nigris F, Ignarro SW, Botti C, Sica V, Ignarro LJ, Napoli C. Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. *Nitric Oxide* 2006;15:259-63.

[35] López-Grueso R, Gambini J, Abdelaziz KM, Monleo D, Díaz A, El Alami M, et al. Early, but not late onset estrogen replacement therapy prevents oxidative stress and metabolic alterations caused by ovariectomy. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:235-246.

[36] Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:725-732.

[37] Gencil VB, Benjamin MM, Bahou SN, Khalil RA. Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy and cardiovascular disease. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:149-174.

[38] Neyrinck AM, Héé VFV, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Brit J Nutr* 2013;109:802-9.

[39] Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *J Med Food* 2004;7:305-8.

[40] Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition* 2010;26:359-366.

Figure 1: Systolic blood pressure (SBP) on day 0 and day 30 in female Vehicle (V) and Pomegranate (PG) in Sham (Top panel) and OVX (Bottom panel) groups. Values are expressed as mean \pm SEM; n= 10–16 animals per group. * $P < 0.05$ compared to 0 Day values, # $P < 0.05$ compared to the Vehicle group.

Figure 2: Baseline coronary perfusion pressure (CPP) from female Sham Vehicle (Sham-V; n = 9), Sham Pomegranate (Sham-PG; n = 11), OVX Vehicle (OVX-V; n = 12) and OVX Pomegranate (OVX-PG; n = 10) groups. All data were expressed as mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ compared to the Sham Vehicle group.

Figure 3: Dose-response curves to bradykinin (0,1–1000 ng) in isolated hearts from Sham (A) and Ovariectomized groups before (closed symbols) and after (open symbols) perfusion with L-NAME (100 μ M) for 20 minutes. Data were expressed as mean \pm SEM; n = 6–10 animals per group. ** $P < 0.01$ compared with the same group before L-NAME.

Figure 4: Plasma malondialdehyde (MDA) values in Sham-V (n = 5); Sham-PG (n = 5); OVX-V (n = 5) and OVX-PG (n = 6). All data were expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared to the Sham-V group.

Figure 5: Analysis of protein expression in treated Sham and OVX rats. (A) superoxide dismutase, SOD-2 (B) catalase (C) eNOS. Data were expressed as mean \pm SEM; n = 4-7 per group. * $P < 0.05$ compared to Sham Vehicle group. # $P < 0.05$ compared with Vehicle OVX group.

Figure 6: Lipid profile of treated OVX and Sham rats. (A) Total cholesterol (B) High-density lipoprotein, HDL (C) Triglycerides and (D) Low density lipoprotein, LDL. Data were expressed as mean \pm SEM; n = 7–13 animals per group. * P

<0.05 compared to the Sham Vehicle group. # $P < 0.05$ compared to the OVX Vehicle group.

Figure 7: Plasma oestrogen (A) and progesterone (B) levels in Sham-V, Sham-PG, OVX-V and OVX-PG rats. Data were expressed as mean \pm SEM; n = 6–9 animals per group. * $p < 0.05$ compared to Sham-V group, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ compared to the OVX-V group.