



BEATRIZ MENEGATE SANTOS

**IMPACTOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS DE
LINHAÇA OU AMOREIRA SOBRE O SISTEMA VASCULAR
DE RATAS WISTAR COM DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA**

**LAVRAS-MG
2024**

BEATRIZ MENEGATE SANTOS

**IMPACTOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS DE LINHAÇA OU
AMOREIRA SOBRE O SISTEMA VASCULAR DE RATAS WISTAR COM
DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Ciências da Saúde, para a obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges
Orientador

**LAVRAS-MG
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Beatriz Menegate.

Impactos da suplementação com extratos de linhaça ou
amoreira sobre o sistema vascular de ratas Wistar com deficiência
estrogênica / Beatriz Menegate Santos. - 2024.

79 p.

Orientador(a): Bruno Del Bianco.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Estrógenos. 2. Nutracêuticos. 3. Reatividade vascular. I.
Bianco, Bruno Del. II. Título.

BEATRIZ MENEGATE SANTOS

**IMPACTOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS DE LINHAÇA OU
AMOREIRA SOBRE O SISTEMA VASCULAR DE RATAS WISTAR COM
DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA**

**EFFECTS OF FLAXSEED OR MULBERRY EXTRACT SUPPLEMENTATION ON
THE VASCULAR SYSTEM OF ESTROGEN-DEFICIENT WISTAR RATS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Ciências da Saúde, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 25 de Setembro de 2024
Dr. Bruno Del Bianco Borges UFLA
Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves UFLA
Dra. Eliana Hiromi Akamine USP

Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges
Orientador

**LAVRAS-MG
2024**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade.

Ao professor Bruno Del Bianco Borges pela orientação, paciência e disposição em ajudar.

À professora Aline Carvalho Pereira pelo auxílio na execução do teste de reatividade vascular.

À professora Laura Cristina Jardim Pôrto Pimenta, ao técnico Geraldo e à Ana Clara Borges pela ajuda com as análises do estresse oxidativo.

Aos colegas: Ana Luiza, Débora, Giovane, Jéssica, Luiza, Mariana Cambraia, Mariana Cunha, Tales e Vitória pela ajuda na execução do projeto.

À minha família pelo incentivo e apoio incondicional. Agradeço especialmente meu namorado Eduardo, minha avó Ângela, minha mãe Oneida, meu tio João e Cristiane que diretamente ajudaram durante os dois anos de mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Ao Núcleo de Criação de Animais de Laboratório (NUCAL) da Universidade Federal de São João (UFSJ) pelo fornecimento dos animais.

Ao Departamento de Nutrição pelo empréstimo do Biotério e de laboratórios.

À Central de Análises e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras, e a Finep, Fapemig, CNPq e Capes pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para as análises cromatográficas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

INTRODUÇÃO: A deficiência estrogênica contribui para a disfunção endotelial por meio da redução da biodisponibilidade de óxido nítrico e do aumento do estresse oxidativo, favorecendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e aterosclerose. Embora estudos clínicos e experimentais demonstrem efeitos cardioprotetores dos estrogênios, o tratamento exógeno com estradiol pode aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e câncer de mama em algumas mulheres, o que limita sua utilização na terapia de reposição hormonal. Assim, a busca por produtos naturais com potenciais respostas antioxidantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras, tem sido de grande interesse, com intuito de trazer benefícios para o organismo com deficiência estrogênica e consequentemente cardioproteção. **OBJETIVO:** Identificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça ou de amoreira, bem como investigar a ação vascular da suplementação com esses extratos em ratas Wistar com deficiência estrogênica. **MÉTODOS:** A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para determinar os compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça e amoreira. Ratas Wistar adultas foram divididas em cinco grupos experimentais, sendo um grupo com animais em proestro que tiveram cirurgia simulada e foram tratados com salina (SHAM) e 04 grupos ovariectomizados tratado com salina (OVX); estradiol (E2; 5 µg/kg/dia); extrato de linhaça (Flaxseed; 400 mg/kg/dia); ou extrato de amoreira (Mulberry; 400 mg/kg/dia). Foram realizadas curvas de concentração-resposta para avaliar a resposta contrátil desencadeada por fenilefrina e a resposta vasodilatadora desencadeada por acetilcolina. Assim como, foi avaliado o efeito da pré-incubação com indometacina, L-NAME e Tiron sobre a resposta contrátil à fenilefrina na artéria aorta torácica dos animais. A concentração de hidroperóxidos e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram determinadas na artéria aorta torácica. Os dados foram analisados utilizando a ANOVA *one-way* ou *two-way* seguido pelo teste de Bonferroni, e foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Por meio do HPLC foi observado a presença de trigonelina, ácido gálico e ácido p-cumárico no extrato de linhaça, enquanto no extrato de amoreira foram identificados ácido gálico, teobromina, ácido clorogênico e ácido síringico. A deficiência estrogênica aumentou a vasoconstrição das artérias aorta torácicas em resposta à fenilefrina, mas não alterou o relaxamento vascular. A realização da ovariectomia aumentou a produção de radicais livres após 8 semanas de deficiência de estrogênio. O tratamento com estradiol ou a suplementação com extrato de linhaça ou amoreira nos animais ovariectomizados reduziu a contração vascular induzida por fenilefrina de forma dependente da modulação da óxido nítrico sintase e da proteção contra danos oxidativos. A suplementação com estes extratos reduziu a concentração de peróxido de hidrogênio, assim como a suplementação com extrato de linhaça aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase, na aorta torácica. **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que a suplementação com extratos de linhaça ou amoreira pode promover proteção vascular na deficiência estrogênica por meio da redução da resposta vascular contrátil e do estresse oxidativo. Além disso, a suplementação com extrato de linhaça demonstrou maior eficácia.

Palavras-chave: Estrógenos; Nutracêuticos; Reatividade vascular; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Estrogen deficiency contributes to endothelial dysfunction by reducing nitric oxide bioavailability and increasing oxidative stress, favoring the development of cardiovascular diseases such as hypertension and atherosclerosis. Although clinical and experimental studies demonstrate the cardioprotective effects of estrogens, exogenous treatment with estradiol can increase the risk of developing cardiovascular diseases and breast cancer in some women, limiting its use in hormone replacement therapy. Thus, the search for natural products with potential antioxidant, anti-inflammatory, and vasodilator responses has been of great interest, aiming to bring benefits to the estrogen-deficient organism and consequently cardioprotection. **OBJECTIVE:** To identify the phenolic compounds present in flaxseed or mulberry extracts, as well as to investigate the vascular action of supplementation with these extracts in estrogen-deficient Wistar rats. **METHODS:** High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the phenolic compounds present in flaxseed and mulberry extracts. Adult Wistar rats were divided into five experimental groups, one group with animals in proestrus that underwent sham surgery and were treated with saline (SHAM) and four ovariectomized groups treated with saline (OVX); estradiol (E2; 5 µg/kg/day); flaxseed extract (Flaxseed; 400 mg/kg/day); or mulberry extract (Mulberry; 400 mg/kg/day). Concentration-response curves were performed to evaluate the contractile response triggered by phenylephrine and the vasodilatory response triggered by acetylcholine. Likewise, the effect of pre-incubation with indomethacin, L-NAME, and Tiron on the contractile response to phenylephrine in the thoracic aorta of the animals was evaluated. The concentration of hydroperoxides and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined in the thoracic aorta. The data were analyzed using one-way or two-way ANOVA followed by the Bonferroni test, and were considered statistically significant if $p < 0.05$. **RESULTS:** Through HPLC, trigonelline, gallic acid, and p-coumaric acid were observed in the flaxseed extract, while gallic acid, theobromine, chlorogenic acid, and syringic acid were identified in the mulberry extract. Estrogen deficiency increased vasoconstriction of the thoracic aortas in response to phenylephrine but did not alter vascular relaxation. Ovariectomy increased the production of free radicals after 8 weeks of estrogen deficiency. Treatment with estradiol or supplementation with flaxseed or mulberry extract in ovariectomized animals reduced the vascular contraction induced by phenylephrine in a manner dependent on the modulation of nitric oxide synthase and protection against oxidative damage. Supplementation with these extracts reduced the concentration of hydrogen peroxide, as well as supplementation with flaxseed extract increased the activity of the enzyme superoxide dismutase, in the thoracic aorta. **CONCLUSION:** The results suggest that supplementation with flaxseed or mulberry extracts can promote vascular protection in estrogen deficiency through the reduction of vascular contractile response and oxidative stress. Furthermore, supplementation with flaxseed extract demonstrated greater efficacy.

Keywords: Estrogens; Nutraceuticals; Vascular reactivity; Oxidative stress.

INDICADORES DE IMPACTO

A deficiência estrogênica, como ocorre na menopausa, está associada com o surgimento de diversos sinais e sintomas, como por exemplo ondas de calor, sudorese noturna, distúrbios do sono, alteração de humor, diminuição da libido, aumento da ansiedade, diminuição da massa mineral óssea e alterações cardiovasculares. No entanto, o tratamento exógeno com estrógenos pode aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e câncer de mama em algumas mulheres, o que limita sua utilização na terapia de reposição hormonal. Com isto, tem-se investigado o uso de produtos naturais com potenciais respostas antioxidantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras, tem sido de grande interesse, com intuito de trazer benefícios para o organismo com deficiência estrogênica e consequentemente cardioproteção. Desta forma, a dissertação teve como objetivo identificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça ou de amoreira, bem como investigar a ação vascular da suplementação com esses extratos em ratas Wistar com deficiência estrogênica. O estudo tem um grande potencial contribuirá para o desenvolvimento de novas terapias para prevenir os sinais e sintomas associados à deficiência estrogênica no organismo feminino, explorando o potencial terapêutico de compostos bioativos presentes em plantas medicinais. Assim como, os resultados geram impactos no “objetivo 3 - Saúde e Bem-Estar” de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) e na área temática “6 - saúde” da Política Nacional de extensão. Os resultados encontrados podem contribuir para o desenvolvimento de fármacos que melhoram a qualidade de vida de mulheres na menopausa.

IMPACT INDICATORS

Social, technological, economic and cultural impacts Estrogen deficiency, as seen in menopause, is associated with the onset of various signs and symptoms, such as hot flashes, night sweats, sleep disturbances, mood swings, decreased libido, increased anxiety, decreased bone mineral density, and cardiovascular alterations. However, exogenous estrogen treatment can increase the risk of developing cardiovascular disease and breast cancer in some women, limiting its use in hormone replacement therapy. Therefore, the investigation of natural products with potential antioxidant, anti-inflammatory, and vasodilator responses has been of great interest, aiming to provide benefits for the estrogen-deficient organism and consequently cardioprotection. Thus, the dissertation aimed to identify the phenolic compounds present in flaxseed or mulberry extracts, as well as to investigate the vascular action of supplementation with these extracts in ovariectomized Wistar rats. The study has great potential to contribute to the development of new therapies to prevent the signs and symptoms associated with estrogen deficiency in the female organism, exploring the therapeutic potential of bioactive compounds present in medicinal plants. Likewise, the results generate impacts on the "goal 3 - Health and Well-being" of the Sustainable Development Goals (SDGs) of the United Nations (UN) and in the thematic area "6 - health" of the National Extension Policy. The results found can contribute to the development of drugs that improve the quality of life of women in menopause.

LISTA DE SIGLAS

ACE1	Enzima conversora de angiotensina 1
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
Ach	Acetilcolina
ALA	Ácido alfa-linolênico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora 1
AT	Área de contagem
AT1R	Receptor de angiotensina tipo I
AT2R	Receptor de angiotensina tipo II
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEE	Estrogênio equino conjugado
cmi	Cardiomiócitos
cmin	Núcleo dos cardiomiócitos
COX	Via das ciclooxigenases
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCV	Doença cardiovascular
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
E2	Grupo ovariectomizado tratado com estradiol
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ER	Receptor estrogênio
ER α	Receptor estrogênio do tipo alfa
ER β	Receptor estrogênio do tipo beta

ERE	Elemento responsivo à estrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Flaxseed	Grupo ovariectomizado tratado com linhaça
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPER	Receptor de estrogênio da proteína G
GRP30	Receptor acoplado à proteína G 30
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPG	Hipotálamo-hipófise-gonadal
HPLC	cromatografia líquida de alta intensidade
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
Log EC ₅₀	Concentração de agonista que produz 50% da resposta máxima
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MasR	Receptor Mas
MDA	Malondialdeído
MR	Receptor mineralocorticóide
Mulberry	Grupo ovariectomizado tratado com amora
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAMS	Sociedade Norte-Americana de Menopausa
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	Complexo NADPH oxidase
NOX2	NADPH oxidase 2
NOX4	NADPH oxidase 4
O ₂ ⁻	Superóxido
ovx	ovariectomizados

OVX	Grupo ovariectomizado tratado com salina
PGE2	Prostaglandina E2
Phe	Fenilefrina
PVDF	Filtros de seringa de fluoreto de polivinilideno
R ²	Coefficiente de determinação
R _{max}	Efeito máximo
RID	Detector de índice de refração
SHAM	Animais com cirurgia simulada tratado com salina
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TFs	Fatores de transcrição ativados por ligantes
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
UFLA	Universidade federal de Lavras
UFSJ	Universidade Federal de São João del-Rei
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Sistema reprodutor feminino	17
2.2	Ciclo estral	17
2.3	Estrogênios	19
2.4	Estrogênios e sistema cardiovascular	22
2.6	Redução da ação estrogênica	25
2.7	Ações cardiovasculares dos fitoquímicos presentes na linhaça e na amoreira	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	47
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	Obtenção e preparo das soluções administradas	51
2.1.1	Extratos de Linhaça e Amoreira	51
2.1.2	Estrogênio	52
2.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	52
2.3	Animais	52
2.4	Ovariectomia bilateral	53
2.5	Ciclo estral	53
2.6	Eutanásia	54
2.7	Reatividade Vascular	54
2.8	Estresse oxidativo	55
2.9	Análise estatística	55
3	RESULTADOS	55
3.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	55
3.2	Reatividade Vascular	57
3.3	Estresse oxidativo	65
4	DISCUSSÃO	66

5	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXO	78

1 INTRODUÇÃO

Os estrogênios são responsáveis por importantes efeitos fisiológicos em ambos os sexos, atuando, por exemplo, na regulação dos sistemas reprodutor, cardiovascular, músculo-esquelético, imunológico e nervoso central (MOREIRA et al., 2014; PAKDEL, 2023). No organismo feminino, os estrogênios são responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo feminino, incluindo o desenvolvimento das mamas, local de deposição do tecido adiposo, alterações no epitélio vaginal e na parede uterina (MOREIRA et al., 2014). Como consequência, baixas concentrações de estrogênio observadas em mulheres após a menopausa ou após a realização da ovariectomia bilateral, assim como alterações na expressão e na atividade de receptores para estrogênios, são associadas com o desenvolvimento de episódios vasomotores, distúrbios do sono, depressão, desequilíbrio metabólico, diminuição da massa mineral óssea, diminuição do turgor da pele e alterações cardiovasculares (GEORGIEVA et al, 2022; LEE et al, 2022; O'NEILL; EDEN, 2012; PAKDEL et al, 2023; YU et al, 2022).

As doenças cardiovasculares compreendem um grupo de doenças inter-relacionadas que afetam o coração e os vasos sanguíneos, que incluem, doença arterial coronariana, hipertensão, arritmia cardíaca, cardiomiopatia e tromboembolismo (LIU; WU, 2019). Este grupo de doenças está entre as principais causas de mortalidade precoce, incapacidade e aumento dos gastos com a saúde em todo o mundo (LIU; WU, 2019; MOHAMED et al, 2022; ROTH et al, 2020). Roedores fêmeas ovariectomizadas a baixa ação estrogênica no organismo foi associada com aumento da pressão arterial (SILVA-ANTONIALLI et al, 2004), aumento da vasoconstrição induzida por angiotensina II em artérias aortas torácicas (SILVA-ANTONIALLI et al, 2004; VIDAL-GÓMEZ et al, 2016), redução da capacidade de relaxamento de artérias aortas torácicas e de arteríolas coronárias (COSTA-FRAGA et al, 2018; KANG et al, 2011), aumento do estresse oxidativo no coração (KANG et al, 2011; ZHANG et al, 2017), além de hipertrofia do ventrículo esquerdo e remodelação cardíaca (BABIKER et al, 2006; WANG et al, 2012). Assim como, foi demonstrado que a administração de estrogênios foi capaz de restaurar as alterações cardiovasculares desencadeadas pela ovariectomia (BABIKER et al, 2006; COSTA-FRAGA et al, 2018; SILVA-ANTONIALLI et al, 2004).

No entanto, a terapia de reposição hormonal (TRH) é considerada um dos temas mais controversos da saúde da mulher nas últimas décadas (FLORES; MANSON, 2021). Estudos observacionais associaram o uso de estrogênios sintéticos, combinados ou não com progestágenos, com a redução dos sintomas vasomotores e com benefícios no tratamento e na

prevenção de osteoporose, doença arterial coronariana, demência e mortalidade (GRODSTEIN et al, 1997; MENDELSON; KARAS, 1999; YAFFE et al, 1998). No entanto, ensaios randomizados realizados posteriormente observaram que os principais desfechos primários da TRH incluíam doença coronariana, infarto agudo do miocárdio não fatal, morte por doença coronariana, câncer de mama invasivo e redução do risco de fratura de quadril (ANDERSON et al, 2004; GRADY et al, 2002; ROSSOUW et al, 2002).

Para tentar entender as discordâncias entre os achados cardiovasculares evidenciados nos estudos observacionais e nos ensaios clínicos randomizados, estudos de meta-análises exploraram a hipótese de que o momento do início da TRH pode ser decisivo para o desenvolvimento de doenças coronarianas (CHLEBOWSKI et al, 2020; SALPETER et al, 2006; SALPETER et al, 2009). Desta forma, foi demonstrado que mulheres na transição para a menopausa, mulheres cuja última menstruação tenha ocorrido em um período inferior a 10 anos, ou que possuam menos de 60 anos de idade, a TRH reduziu em 32% a prevalência de doença coronariana (SALPETER et al, 2006) e em 25% a mortalidade (SALPETER et al, 2009). Por outro lado, mulheres que iniciaram a TRH com mais de 60 anos ou após 10 anos desde a última menstruação, apresentaram um risco maior de desenvolver doenças coronarianas, acidente vascular cerebral, tromboembolismo e demência (HODIS et al, 2016; ROSSOUW et al, 2007; SALPETER et al, 2006; SALPETER et al, 2009; SHUMAKER et al 2003).

Considerando estes achados, a Sociedade Norte-Americana de Menopausa (NAMS) posicionou-se favorável a terapia hormonal para o tratamento de sintomas vasomotores e prevenção da perda óssea em mulheres com menos de 60 anos ou que estejam na menopausa por um período inferior a 10 anos (FAUBION et al, 2022). Assim como, contraindica a TRH na presença de sangramento vaginal inexplicável, doença hepática, histórico de câncer sensível ao estrogênio (câncer de mama, por exemplo), histórico de doença coronariana, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, histórico pessoal ou familiar de tromboembolismo (FAUBION et al, 2022).

A TRH continua sendo a estratégia mais eficaz no manejo da perda óssea, dos sintomas vasomotores e da síndrome geniturinária da menopausa (FAUBION et al, 2022). Contudo, o uso de hormônios sintéticos pode aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e câncer de mama em algumas mulheres (ROSSOUW et al, 2002; SALPETER et al, 2009). Assim, considerando os riscos da TRH, bem como as alterações cardiovasculares decorrentes da falta de ação estrogênica no organismo feminino (EL KHOUDARY et al, 2019; LEE et al, 2022; O'NEILL; EDEN, 2012; TALAULIKAR, 2022),

novas terapias e estratégias para reduzir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em mulheres na menopausa e na pós-menopausa são necessárias (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al, 2021). Simultaneamente, estudos demonstram que metabólitos secundários provenientes de alimentos funcionais, como por exemplo os compostos fenólicos, exercem benefícios cardiovasculares, incluindo ações vasodilatadoras, antioxidantes e antiproliferativas (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al, 2021).

Entre os alimentos funcionais, a semente de linhaça e a folha de amoreira destacam-se por suas ações benéficas no alívio dos sintomas associados à deficiência estrogênica no organismo feminino, incluindo efeitos promissores na prevenção de alterações cardiovasculares (BŁASZCZUK et al, 2022; COSTA et al, 2020; EEKHOUDT et al, 2022; PETRINE et al, 2022; SERRAINO et al, 2003; TARHAN et al, 2021) devido a presença de altas concentrações de compostos fenólicos, alto poder antioxidante e baixa toxicidade hepática e renal (PETRINE et al, 2022). Além disso, foi demonstrado que ratas ovariectomizadas suplementadas com os extratos de linhaça ou amoreira apresentaram menor ganho de peso, predomínio de células epiteliais vaginais no lavado vaginal, melhora do perfil lipídico, aumento da espessura endometrial e do peso hipofisário, semelhantes aos animais ovariectomizados tratados com estrogênio exógeno (PETRINE et al, 2022). A suplementação com extrato de linhaça em ratas com diabetes, induzida por estreptozotocina, preveniu o aumento da contração vascular das artérias aorta torácicas por meio de vias dependentes de óxido nítrico e prostaglandinas (TARHAN et al, 2021).

Considerando o exposto, este estudo tem como objetivo verificar o perfil de compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça e de amoreira, bem como verificar os impactos da suplementação com esses extratos na reatividade vascular e no estresse oxidativo da artéria aorta torácica de ratas Wistar com deficiência estrogênica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

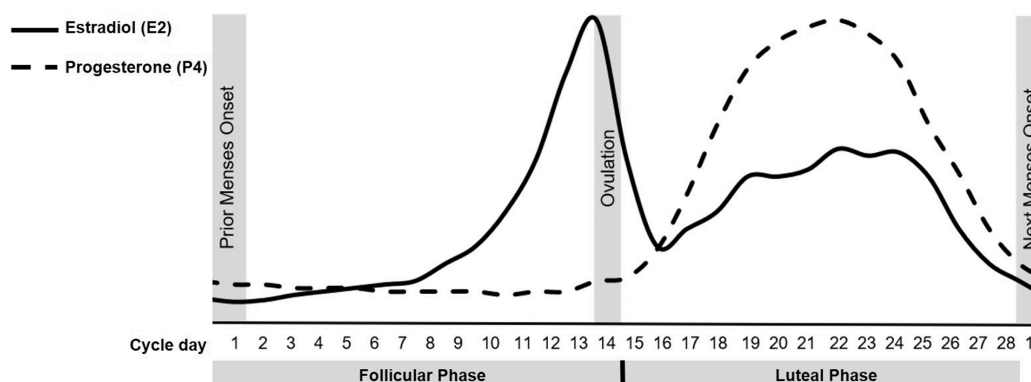
2.1 Sistema reprodutor feminino

O eixo reprodutivo e a expressão do fenótipo feminino são regulados por hormônios sintetizados e secretados no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) (HAN et al, 2023). A kisspeptina, por exemplo, é um neuropeptídeo hipotalâmico secretagogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que promove importantes eventos relacionados com a vida reprodutiva feminina, incluindo o início da puberdade e a regulação da ovulação

(MAGGI et al, 2016; TSOUTSOUKI; ABBARA; DHILLO, 2022). A secreção pulsátil de GnRH estimula a liberação de gonadotrofinas hipofisárias, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (TSOUTSOUKI; ABBARA; DHILLO, 2022). Estes dois hormônios atuam nas gônadas promovendo o desenvolvimento dos gametas e estimulando a síntese de diversas moléculas, dentre elas os esteroides sexuais, principalmente progesterona e estrogênio, que possuem várias ações no organismo, como por exemplo no controle do ciclo menstrual (TSOUTSOUKI; ABBARA; DHILLO, 2022; VELARDO, 1960).

O ciclo menstrual de mulheres eumenorréicas tem duração média de 28 dias e, conforme demonstrado abaixo na figura 1, é comumente dividido em três fases: (I) fase folicular, (II) fase ovulatória e (III) fase lútea (SCHMALENBERGER et al, 2019; SCHMALENBERGER et al, 2021). A fase folicular tem início no primeiro dia da menstruação, período em que o endométrio proliferado é eliminado, e termina no dia da ovulação (SCHMALENBERGER et al, 2021). No início desta fase, as concentrações de progesterona e estrogênio estão baixas, entretanto, por volta do sétimo dia o estrogênio começa a aumentar sua concentração e há aumento na concentração de progesterona cerca de 36 horas antes da ovulação (SCHMALENBERGER et al, 2021). As altas concentrações de estrogênio e o leve aumento da progesterona promovem o aumento da frequência dos pulsos de GnRH que, por consequência, estimulam a liberação de grandes quantidades de LH e FSH pela hipófise anterior (DUFFY et al, 2019). O pico de LH permite a liberação do oócito que ocorre por volta do 14º dia do ciclo menstrual (GÖTZ et al, 2023; SCHMALENBERGER et al, 2021).

Figura 1 - Representação das flutuações dos hormônios ovarianos, progesterona e estradiol, nas fases folicular e lútea do ciclo menstrual.



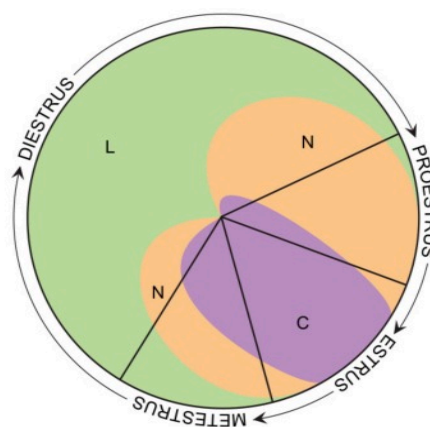
Fonte: Schmalenberger et al (2021).

A ovulação marca o início da fase lútea, neste período as células da teca e da granulosa se luteinizam dando origem ao corpo lúteo (SCHMALENBERGER et al, 2021). O corpo lúteo sintetiza progesterona e estrogênio, o que promove um aumento das concentrações destes dois hormônios na primeira metade da fase lútea (GÖTZ et al, 2023; SCHMALENBERGER et al, 2021). Caso não ocorra a fecundação, o corpo lúteo sofre atresia seguida pela diminuição das concentrações de progesterona e estrogênio que, conseqüentemente, desencadeia a menstruação e o início de um novo ciclo (SCHMALENBERGER et al, 2021). Semelhante ao que acontece no ciclo menstrual feminino, o ciclo estral de roedores fêmeas também são caracterizados por variações hormonais (AJAYI; AKHIGBE, 2020).

2.2 Ciclo Estral

Ciclo estral é o termo utilizado para denominar o ciclo reprodutivo de roedores fêmeas (AJAYI; AKHIGBE, 2020). Em ratas e camundongos fêmeas, o ciclo estral tem duração média de 4 dias e é dividido em quatro fases: metaestro (ou diestro I), diestro (ou diestro II), proestro e estro (AJAYI; AKHIGBE, 2020; JAIMES et al, 2019). Estas fases podem ser distinguidas por meio da realização do lavado vaginal seguido pela análise das células presentes na secreção vaginal em microscópio óptico (AJAYI; AKHIGBE, 2020). Conforme demonstrado na figura 2, a estimativa da fase do ciclo estral pode ser realizada por meio da observação da quantidade de leucócitos, células epiteliais cornificadas (queratinizadas) e células epiteliais nucleadas presentes no lavado vaginal (AJAYI; AKHIGBE, 2020).

Figura 2 - Classificação do ciclo estral de ratas conforme prevalência do tipo de células observadas no lavado vaginal.



Legenda: verde (L) - leucócitos ; laranja (N) - células epiteliais nucleadas; Roxo (C) - células epiteliais cornificadas.

Fonte: Ajayi; Akhigbe (2020)

As fases de metaestro e diestro possuem padrões de secreção hormonal semelhantes, sendo possível observar baixas concentrações de estradiol (JAIMES et al, 2019). Em ratas, o metaestro tem duração de 6 a 8 horas e o lavado vaginal exhibe grande quantidade de leucócitos e poucas células cornificadas e epiteliais, enquanto o diestro tem duração de 48 a 72 horas e o lavado vaginal é constituído em grande parte por leucócitos (AJAYI; AKHIGBE, 2020). A fase de proestro tem duração média de 14 horas em ratas e é marcada pelo aumento das concentrações de estrogênio que impulsionam o aumento da liberação de LH (AJAYI; AKHIGBE, 2020; HEAPE, 1900). Na secreção vaginal coletada nesta fase é possível observar uma grande quantidade de células nucleadas e uniformes, tanto em tamanho quanto em aparência, podendo existir uma pequena quantidade de células epiteliais cornificadas anucleadas e poucos leucócitos (AJAYI; AKHIGBE, 2020).

Na noite entre as fases de proestro e estro ocorre a receptividade reprodutiva e ovulação (HEAPE, 1900). Em ratas, a fase de estro tem duração de 24 a 48 horas e é possível observar uma diminuição das concentrações de FSH e LH (JAIMES et al, 2019). Na microscopia desta fase é possível identificar muitas células cornificadas anucleadas, citoplasma granular e grande quantidade de bactérias, assim como podem aparecer com menor frequência células epiteliais nucleadas (AJAYI; AKHIGBE, 2020). De um modo geral, estas alterações no epitélio vaginal ocorrem por maior ou menor ação estrogênica ao longo do ciclo estral.

2.4 Estrogênios

Os estrogênios são hormônios esteroides, lipossolúveis, derivados do colesterol e sintetizados a partir da aromatização de andrógenos pela enzima aromatase (ZHU et al, 2023). A aromatase está presente em diversos tecidos humanos, como por exemplo, nas células da granulosa ovariana, fibroblastos adiposos, pele, sinciciotrofblastos placentários, encéfalo e ossos (NELSON; BULUN, 2001; ZHU et al, 2023). O estradiol (E_2) é o principal estrogênio circulante e, em mulheres no período reprodutivo, é secretado principalmente pelas células da granulosa ovariana. O E_2 pode originar dois metabólitos menos potentes: estrona (E_1) e estriol (E_3). O E_1 é produzido no tecido adiposo e cutâneo e se torna o principal estrogênio após a menopausa. Já o E_3 é produzido no fígado e em grandes quantidades na placenta de mulheres grávidas (ZHU et al, 2023). No organismo masculino, o E_2 é sintetizado em pequenas

concentrações nos testículos e em órgãos extragonadais por meio da aromatização dos andrógenos (MORSELLI et al, 2017).

Os estrogênios apresentam importantes efeitos fisiológicos em ambos os sexos, atuando, por exemplo, na regulação dos sistemas reprodutor, cardiovascular, músculo-esquelético, imunológico e nervoso central (MOREIRA et al., 2014; PAKDEL, 2023). Além destas ações, no organismo feminino, os estrogênios são responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo feminino, incluindo o desenvolvimento das mamas, local de deposição do tecido adiposo, alterações no epitélio vaginal e na parede uterina (MOREIRA et al., 2014). As baixas concentrações de estrogênio observadas em mulheres após a menopausa, após ovariectomia bilateral ou após uso de medicamentos que inibem a produção ou ação estrogênica, podem estar associadas com episódios vasomotores, distúrbios do sono, depressão, desequilíbrio metabólico, diminuição da massa mineral óssea, diminuição da elasticidade da pele e alterações cardiovasculares (GEORGIEVA et al, 2022; LEE et al, 2022; LØNNING et al, 2005; O'NEILL; EDEN, 2012; YU et al, 2022).

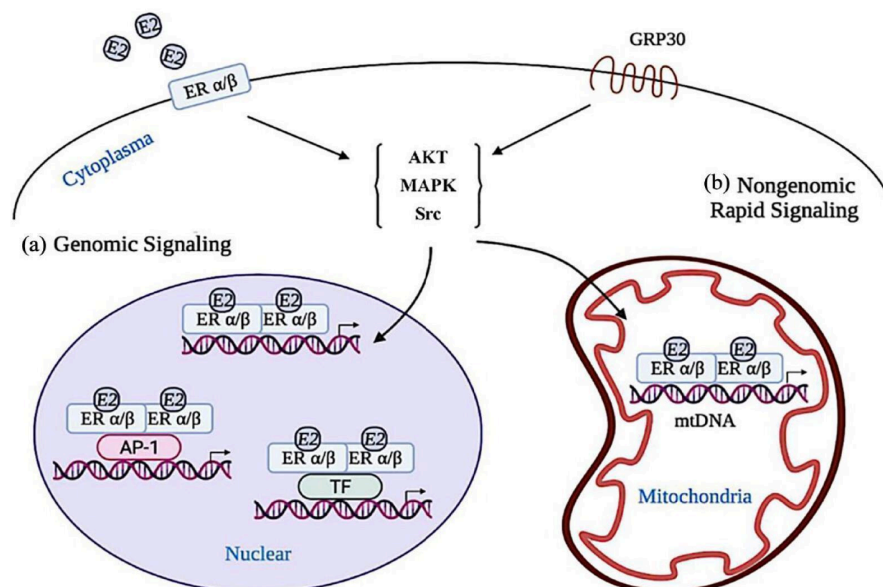
Os efeitos celulares desencadeados pelos estrogênios podem ocorrer por meio da sua ligação aos receptores estrogênicos (ER) (DEROO et al, 2006). Os ER podem ser receptores pertencentes à superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição ativados por ligantes (TFs) e apresentam duas isoformas ER α e ER β (DAMA et al, 2021) ou receptores de membrana ligado à proteína G (ZHU et al, 2023). Os estrogênios são permeáveis à membrana celular e, no citoplasma, ligam-se aos ER formando o dímero hormônio-receptor (YAŞAR et al, 2017). As respostas celulares desencadeadas a seguir, podem ocorrer por meio de dois mecanismos que envolvem ações genômicas (ativação canônica) e ações não genômicas. Pelo modelo genômico, o dímero hormônio-receptor formado é translocado para o núcleo celular, onde irá se ligar ao elemento responsivo à estrogênio (ERE) e, por ação direta, modular a expressão gênica ou atuar recrutando co-reguladores que podem estimular ou inibir a expressão gênica (SMITH; O'MALLEY, 2004; ZHU et al, 2023). Além disso, os dímeros hormônios-receptores podem regular a transcrição por meio da associação com outros fatores de transcrição, como por exemplo, ligados à proteína ativadora 1 (AP-1) e, na ausência de ligantes, os ER podem provocar modificações pós-traducionais (DAHLMAN-WRIGHT et al, 2006; TIANO; MAUVAIS-JARVIS, 2012).

Os estrogênios também podem desencadear eventos de sinalização celular rápidos por vias não genômicas mediadas por receptores de membrana (ZHU et al, 2023). A ligação dos estrogênios com o receptor para estrogênio ligado à proteína G (GPER), anteriormente

conhecido como receptor acoplado à proteína G 30 (GRP30), ou com ER α ou ER β de membrana, podem ativar diversas cascatas de sinalização celular, incluindo a cascata de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), proteína quinase B, proteína Src, adenosina monofosfato cíclico (AMPc), influxo de cálcio (Ca²⁺), vias de sinalização da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), induzível (iNOS) e neuronal (nNOS) (BHUIYAN; SHIODA; FUKUNAGA, 2007; DA SILVA et al, 2021; LEVIN; HAMMES, 2016; MURPHY; STEENBERGEN, 2007; NODE et al, 1997; ZHU et al, 2023). Além disso, novas evidências demonstram a presença de ER α e ER β nas mitocôndrias e indicam uma possível ação dos estrogênios na manutenção bioenergética celular (YAŞAR et al, 2017) (FIGURA 3).

As isoformas de receptores para estrogênio são amplamente expressas em quase todos os tecidos do organismo (HARRIS, 2007). No sistema cardiovascular, ER α , ER β e GPER são expressos nas células cardíacas, incluindo cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos cardíacos, tanto em humanos quanto em animais (DWORATZEK et al, 2014; GROHÉ et al, 1997; MAHMOODZADEH; DWORATZEK, 2019; MAHMOODZADEH et al, 2006; NORDMEYER et al 2004), demonstrando alta ação dos estrogênios no sistema cardiovascular.

Figura 3 - Vias de ação genômicas e não genômicas dos estrogênios



Legenda: AKT - proteína quinase B; AP-1 - proteína ativadora 1; E2 - estradiol; MAPK - proteínas quinases ativadas por mitógeno; GRP30 - receptor acoplado à proteína G; RE α/β - receptor de estrogênio do tipo alfa ou beta; Src - proteína Src; TF - fatores de transcrição ativados por ligantes

Fonte: Zhu et al (2023).

2.5 Estrogênios e sistema cardiovascular

Como demonstrado anteriormente, os estrogênios são responsáveis por importantes ações fisiológicas no organismo feminino, incluindo ações cardiovasculares mediadas por ER α , ER β e GPER (DA SILVA et al, 2021; STEVENSON, 2011). Essas ações são cardioprotetoras pois envolvem a redução das espécies reativas de oxigênio (ERO), modulação da via das ciclooxigenases, modulação da biogênese mitocondrial, atenuação da remodelação cardíaca e modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (CRESCIOLI, 2021; YU et al, 2022; ZHOU et al, 2020). Simultaneamente, a redução das concentrações de estrogênio, assim como alterações na expressão e/ou atividade dos receptores para estrogênio são associados com o aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares (DCV) (PAKDEL et al, 2023). DCV é um termo genérico que compreende um grupo de doenças que afetam o coração e os vasos sanguíneos (LIU; WU, 2019). Este grupo de doenças está entre as principais causas de mortalidade precoce, incapacidade e aumento dos gastos com a saúde em todo o mundo (LIU; WU, 2019; MOHAMED et al, 2022; ROTH et al, 2020).

As espécies reativas de oxigênio (ou radicais livres) são importantes moléculas sinalizadoras que regulam a homeostase tecidual (SABBATINI; KARARIGAS, 2020). O óxido nítrico (NO), por exemplo, é um radical livre gasoso que pode ser sintetizado pelas três isoformas da enzima óxido nítrico sintase: eNOS, iNOS e nNOS (GOSHI; ZHOU; HE, 2019). O NO desempenha inúmeras ações fisiológicas incluindo redução da pressão arterial por meio da vasodilatação endotelial (GOSHI; ZHOU; HE, 2019; TENOPOULOU; DOULIAS, 2020). Os estrogênios são capazes de estimular a síntese de NO por meio da regulação da atividade da eNOS e iNOS levando à proteção cardiovascular (BHUIYAN; SHIODA; FUKUNAGA, 2007; MURPHY; STEENBERGEN, 2007; NODE et al, 1997). Lindsey e colaboradores demonstraram que os estrogênios ligados ao GPER promovem vasodilatação das artérias de resistência mesentéricas via aumento da síntese de óxido nítrico e da estimulação do AMPc no músculo liso (LINDSEY; LIU; CHAPPELL, 2014), enquanto a inibição da NOS suprime os efeitos vasculares benéficos associados a administração de E₂ em ratas ovariectomizadas (SHI; LEUNG, 2020).

Em resposta a condições patológicas e ao estresse ambiental, as concentrações de ERO (superóxido e peróxido de hidrogênio, por exemplo) podem aumentar drasticamente causando danos oxidativos à diferente tipos celulares (HALLIWELL, 2011; SABBATINI;

KARARIGAS, 2020). O estresse oxidativo refere-se ao acúmulo desbalanceado de espécies reativas de oxigênio em uma concentração que supera a capacidade de proteção antioxidante do organismo (HALLIWELL, 2011). Em ratas espontaneamente hipertensas, a ovariectomia foi associada ao aumento do estresse oxidativo (SULLIVAN; SASSER; POLLOCK, 2007). Kang e colaboradores (2011) observaram que a ovariectomia promoveu redução da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), enquanto a reposição de estrogênio restaurou as concentrações de SOD e desencadeou vasodilatação mediada pelo NO (KANG et al, 2011). Corroborando com estes achados, Vidal-Gómez e colaboradores (2016) demonstram que a ovariectomia aumentou a vasoconstrição da artéria aorta torácica de camundongos via redução de NO e aumento da produção de superóxido mediada pela via das ciclooxigenases (COX). O estudo também demonstrou que a inibição da COX, assim como o tratamento com E₂, atenuou a produção de superóxido e restaurou a resposta vasoconstritora (VIDAL-GÓMEZ et al, 2016).

As mitocôndrias são as principais fontes endógenas de ERO, as quais são sintetizadas na cadeia transportadora de elétrons (IDE et al, 2001). O aumento crônico de ERO está associado com a disfunção mitocondrial, aumento da produção de radicais livres e lesão celular do ventrículo esquerdo de camundongos machos (IDE et al, 2001). Os estrogênios favorecem a proteção cardiovascular ao modular a função mitocondrial e a geração de ERO em células cardiovasculares, incluindo cardiomiócitos, células endoteliais e fibroblastos cardíacos (MAHMOODZADEH; DWORATZEK, 2019; RATTANASOPA et al, 2015; ZHOU et al, 2020).

A NADPH oxidase 4 (NOX4), enzima capaz de produzir ERO, está aumentada na presença de estímulos hipertróficos, assim como intermedia a hipertrofia cardíaca e a insuficiência cardíaca induzida pelo aumento da pressão arterial após a administração crônica de angiotensina II (AGO et al, 2010; KURODA et al, 2010). Animais *Knockout* para NOX4 apresentam proteção contra o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca induzidos por Angiotensina II, bem com concentrações plasmáticas de triglicerídeos reduzidas (BOUABOUT et al, 2018). Em ratos machos, o tratamento com E₂ promoveu ações cardioprotetoras por meio da regulação da expressão dos genes NOX4 e NADPH oxidase 2 (NOX2) (ZHANG et al, 2017). Wang e colaboradores (2012) observaram que a ovariectomia aumentou a expressão cardíaca de RNA mensageiro (mRNA) para NOX4, promoveu hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) e aumentou a pressão arterial, enquanto as ratas ovariectomizadas que foram submetidas a ativação crônica do GPER pelo seu agonista (G-1) apresentaram redução dos efeitos desencadeados pela ovariectomia (WANG et al, 2012). Os

autores também demonstraram que, *in vitro*, o G-1 inibiu a hipertrofia de cardiomiócitos H9c2, assim como a administração de G15 (antagonista de GPER) promoveu a hipertrofia dos cardiomiócitos (WANG et al, 2012).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um sistema imunorregulador que apresenta duas vias de sinalização inter-relacionadas e com ações (I) pró-inflamatória e (II) anti-inflamatória (GERSH et al, 2021). Estas vias de sinalização são fundamentais para a regulação da inflamação, do equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão arterial (AMES; ATKINS; PITT, 2019; MILLER; ARNOLD, 2019). O predomínio da via pró-inflamatória do SRAA favorece o desenvolvimento de disfunção cardíaca e endotelial (CHAKRABARTI; LEKONTSEVA; DAVIDGE, 2008; GERSH et al, 2021; XUE; JOHNSON; HAY, 2008).

Situações como baixa pressão arterial, hipovolemia, baixa ingestão de sódio e estimulação simpática promovem aumento da síntese e liberação de renina (AMES; ATKINS; PITT, 2019). A renina na circulação metaboliza o angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I), que é convertida em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina 1 (ACE1). A Ang II pode se ligar tanto no receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) quanto tipo II (AT2R). A Ang II ligada ao AT1R provoca vasoconstrição, retenção do sódio, síntese de aldosterona e inflamação, enquanto a ativação do AT2R promove efeitos anti-inflamatórios, anti-fibróticos e vasodilatadores (AMES; ATKINS; PITT, 2019; BADER, 2013; DE MELLO; FROHLICH et al, 2014). Por um mecanismo não clássico, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) pode degradar a Ang II em um potente peptídeo vasodilatador conhecido como Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (CHAPPEL; FERRARIO, 2006). A Ang 1-7 ligada ao receptor Mas (MasR) previne a proliferação de cardiomiócitos, aumenta a síntese de óxido nítrico, protege contra a hipertrofia cardíaca, reduz fibrose induzida por Ang II e atenua o estresse oxidativo em roedores (CASTRO et al, 2006; HAMMER et al, 2016; KITTANA, 2018). Assim como, promove redução da deposição de colágeno em fibroblastos isolados de corações de ratos (MCCOLLUM; GALLAGHER; TALLANT, 2012).

Schunkert e colaboradores (1997) demonstraram que a reposição estrogênica em mulheres adultas promoveu redução da concentração de renina e aumento da concentração plasmática de angiotensinogênio (SCHUNKERT et al 1997). Além disso, foi demonstrado que os efeitos cardioprotetores promovidos pelos estrogênios, via SRAA, envolviam a redução da Ang II e o aumento da Ang 1-7 (BROSNIHAN et al, 1997). A administração de estrogênio em ratas ovariectomizadas promoveu redução da pressão arterial, atenuação da expressão do AT1R vascular e renal, aumento a expressão do AT2R renal e redução do efeito

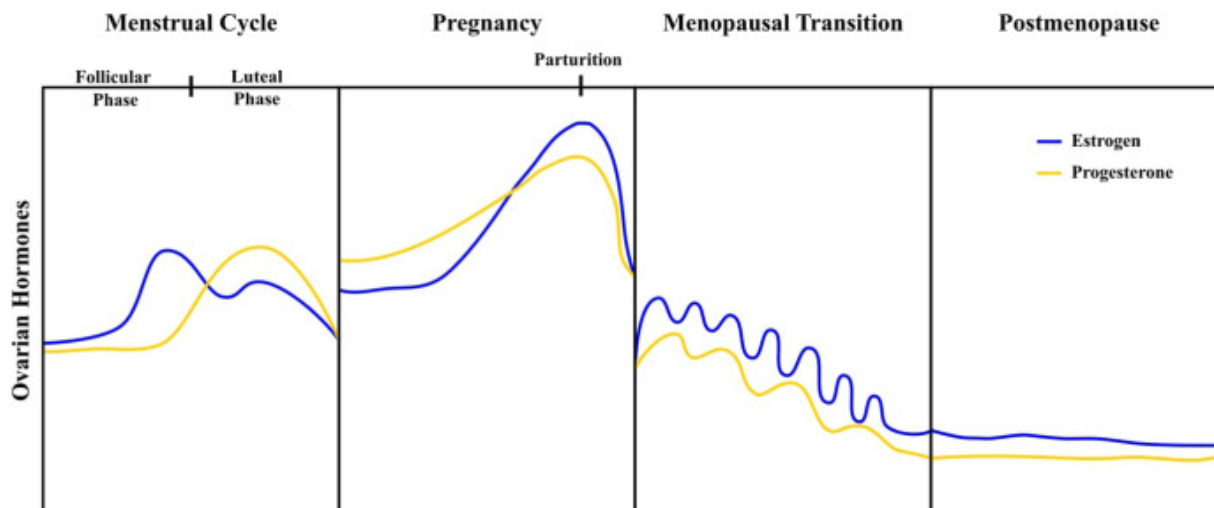
da Ang II tanto nos anéis aórticos quanto nos vasos mesentéricos (SILVA-ANTONIALLI et al, 2004).

Costa-Fraga e colaboradores (2018) observaram que Ang 1-7 é capaz de promover vasodilatação dose-dependente na artéria aorta torácica de camundongos fêmeas jovens (10 semanas), enquanto os camundongos fêmeas idosas (20 meses) não foram responsivas a nenhuma dose de Ang 1-7. Entretanto, a administração de estradiol nas fêmeas idosas promoveu restauração dos efeitos vasodilatadores da Ang 1-7, bem como redução das ERO e restauração das concentrações de óxido nítrico (COSTA-FRAGA et al, 2018), sugerindo que a resposta vasodilatadora promovida pela Ang 1-7 pode ser perdida devido a alterações hormonais e resgatada com a ação estrogênica. Corroborando com estes achados, foi demonstrado que a administração de estrogênios provoca o aumento da síntese de Ang 1-7 via ER α , assim como o tratamento com E₂ provoca o aumento da expressão de mRNA para ACE1 e ACE2 em células endoteliais humanas (MOMPEÓN et al 2016).

2.6 Redução da ação estrogênica

A menopausa corresponde a uma fase natural da vida da mulher que marca o fim dos anos reprodutivos (AL WATTAR; TALAULIKAR, 2023). Em geral, ocorre entre 45 e 55 anos de idade e é caracterizada pela redução dos folículos ovarianos que, conseqüentemente, provoca uma diminuição nas concentrações de estrogênio e progesterona (CARTER; MERRIAM, 2023; SANTORO et al, 2021) (FIGURA 4). A menopausa é precedida por um período de transição marcado por irregularidades do ciclo menstrual, início dos sinais e sintomas da redução dos esteroides sexuais e uma variedade de mecanismos endócrinos compensatórios, como o aumento compensatório das concentrações de FSH, que tem por objetivo tentar manter os ciclos menstruais na presença de um baixo número de folículos ovarianos (SANTORO et al, 2021). Na transição da menopausa, as concentrações de estrogênios reduzem de tal forma que a insuficiência ovariana não pode ser compensada levando a perda da capacidade reprodutiva (FINKELSTEIN et al, 2008; SANTORO et al, 2021). A menopausa é estabelecida após 12 (doze) meses de amenorréia não associada a qualquer outra condição fisiológica ou patológica (TALAULIKAR, 2022).

Figura 4 - Representação esquemática das alterações de hormônios ovarianos (estrogênio e progesterona) ao longo da vida das mulheres.



Fonte: Haufe; Baker; Leeners (2022).

Apesar da menopausa ser uma fase natural da vida da mulher, a depleção dos hormônios ovarianos está associada com o surgimento de sintomas variáveis que dependem de uma complexa interação entre aspectos biológicos, psicológicos e sociais (AL WATTAR; TALAULIKAR, 2023; EL KHOUDARY et al, 2019). Ondas de calor e sudorese noturna, são os sintomas mais comuns que acometem cerca de 80% das mulheres (EL KHOUDARY et al, 2019). Assim como, é comumente relatado a presença de distúrbios do sono, cansaço, alteração de humor, diminuição da libido, aumento da ansiedade, diminuição da massa mineral óssea e alterações cardiovasculares (EL KHOUDARY et al, 2019; LEE et al, 2022; O'NEILL; EDEN, 2012; TALAULIKAR, 2022).

A ovariectomia bilateral é a remoção cirúrgica de ambos os ovários que promove uma diminuição abrupta das concentrações de estrogênio e dos demais hormônios ovarianos (YU et al, 2022). O desequilíbrio hormonal provocado pela ovariectomia bilateral mimetiza as alterações hormonais vivenciadas no organismo feminino durante a menopausa, sendo uma técnica cirúrgica muito utilizada em pesquisas pré-clínicas em modelo animal (GEORGIEVA et al, 2022; YU et al, 2022). Além de desencadear a menopausa precoce, a ovariectomia bilateral é associada com o aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares em mulheres adultas (MICHELSEN et al, 2023). Enquanto a diminuição da expectativa de vida (BENEDUSI et al, 2015), alterações cardiovasculares (DUTTA; SINGH; MALIK, 2023) e alterações musculoesqueléticas (PEYTON et al, 2023) são observadas em roedores fêmeas ovariectomizadas.

Para controlar os sintomas decorrentes da redução da concentração hormonal ovariana e consequente falta de ação estrogênica desencadeada pela remoção cirúrgica dos ovários ou pela menopausa, a terapia de reposição hormonal (TRH) com uso de hormônios estrogênicos, combinados ou não com hormônios progestágenos, têm sido a mais utilizada para este tipo de tratamento (AL WATTAR; TALAULIKAR, 2023; NAFTOLIN et al 2019). Entretanto, a TRH é considerada um dos temas mais controversos da saúde da mulher nas últimas décadas (FLORES; MANSON, 2021). Estudos anteriores demonstraram que a TRH amenizava sintomas vasomotores comumente observados na menopausa, como também promovia benefícios no tratamento e prevenção de osteoporose, doença arterial coronariana, demência e mortalidade (GRODSTEIN et al, 1997; MENDELSON; KARAS, 1999; YAFFE et al, 1998). No entanto, outros estudos randomizados começaram a questionar os benefícios da TRH a longo prazo (ANDERSON et al, 2004; ROSSOUW et al, 2002).

O *Women's Health Initiative* (WHI) foi um estudo randomizado duplo-cego que avaliou os riscos e benefícios da terapia hormonal combinada (estrogênio + progesterona) em 16.608 mulheres pós-menopáusicas saudáveis, com idades entre 50 e 79 anos (média de 63,3 anos). No entanto, devido à alta prevalência de câncer de mama invasivo, o estudo foi interrompido precocemente após 5,2 dos 8,5 anos pretendidos, por recomendação de um conselho independente de monitoramento de dados e segurança que se baseava nas recomendações propostas por O'Brien e Fleming (O'BRIEN; FLEMING, 1979). Os principais desfechos incluíram doença coronariana, infarto agudo do miocárdio não fatal, morte por doença coronariana e câncer de mama invasivo (ROSSOUW et al, 2002). Em outro estudo, o WHI utilizou estrogênio equino conjugado (CEE), por um período médio de 6,8 anos, em 10.739 mulheres na pós-menopausa, com idades entre 50 e 79 anos (média de 63,9 anos), as quais previamente tinham realizado histerectomia. Esse tratamento aumentou o risco de acidente vascular cerebral, reduziu o risco de fratura de quadril e não afetou a incidência de doença coronariana (ANDERSON et al, 2004). Corroborando com estes achados, outros ensaios randomizados e duplo-cego não observaram efeitos da TRH na redução da prevalência de doença coronariana em mulheres saudáveis na pós-menopausa (CHERRY et al, 2002; GRADY et al, 2002; HULLEY et al 1998; MANSON et al, 2013). Além disso, a intervenção com TRH combinada (estrogênio + progesterona) em 2.763 mulheres, com média de 66,7 anos, demonstrou aumento de 50% do risco de doença coronariana durante o primeiro ano de tratamento (GRADY et al, 2002).

Simultaneamente, meta-análises exploraram a hipótese de que o momento do início da TRH poderia ser decisivo para o desenvolvimento de doenças coronarianas (SALPETER et al,

2006; SALPETER et al, 2009). Esses dados sugerem que a TRH em mulheres na transição para a menopausa ou que a última menstruação tenha ocorrido em um período inferior a 10 anos, pode promover redução de 32% na prevalência de doença coronariana (SALPETER et al, 2006) e de 25% na mortalidade (SALPETER et al, 2009). Por outro lado, o início da terapia hormonal em mulheres com idades superior a 60 anos ou que a última menstruação tenha ocorrido há mais de 10 anos, promove aumento no risco de desenvolver doenças coronarianas, acidente vascular cerebral, tromboembolismo e demência (HODIS et al, 2016; ROSSOUW et al, 2007; SALPETER et al, 2006; SALPETER et al, 2009; SHUMAKER et al 2003).

Um consenso global apoiado por diversas sociedades médicas, afirma que atualmente a TRH é eficaz para os sintomas vasomotores, síndrome geniturinária da menopausa e prevenção da perda óssea e fraturas em mulheres com idade inferior a 60 anos ou que estão na menopausa por um tempo inferior a 10 anos. Entretanto, é contraindicada na presença de sangramento vaginal inexplicável, doença hepática, histórico de câncer sensível ao estrogênio, histórico de doença coronariana, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, histórico pessoal ou familiar de tromboembolismo (FAUBION et al, 2022).

Desta forma, o uso de hormônios sintéticos pode aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e câncer de mama em algumas mulheres (ROSSOUW et al, 2002; SALPETER et al, 2009). Assim como, estudos associam a falta de ação estrogênica no organismo feminino com o desenvolvimento de alterações cardiovasculares (EL KHOUDARY et al, 2019; LEE et al, 2022; O'NEILL; EDEN, 2012; TALAULIKAR, 2022). Neste sentido, terapias alternativas para reduzir o risco de desenvolver doenças cardiovasculares em mulheres na menopausa e na pós-menopausa são necessárias (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al, 2021).

2.7 Ações cardiovasculares dos fitoquímicos presentes na linhaça e na amoreira

A terapia não hormonal pode ser considerada uma alternativa segura e eficaz para o tratamento e prevenção de diversos sintomas no organismo (AL WATTAR; TALAULIKAR, 2023). O tratamento não hormonal abrange mudanças no estilo de vida (prática regular de atividade física e dieta saudável), terapias alternativas (como por exemplo, hipnose) e consumo de alimentos ricos em fitoquímicos (AL WATTAR; TALAULIKAR, 2023; STACHOWIAK; PERTYŃSKI; PERTYŃSKA-MARCZEWSKA, 2015). Os fitoquímicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas para a sua proteção e são definidos como

nutrientes não essenciais (IQBAL et al 2023; KUMAR et al, 2023). Estes metabólitos secundários, como por exemplo, os compostos fenólicos, podem promover ações cardioprotetoras por meio da modulação das vias antioxidantes, vasodilatadoras, anti-inflamatórias e antiproliferativas (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al, 2021; SHAITO et al, 2020). Os fitoquímicos podem ser consumidos diretamente nos alimentos (alimentos funcionais) ou concentrados na forma de extratos vegetais (KUMAR et al, 2023).

O linho (*Linum usitatissimum*) é uma planta com flores azuis e sementes achatadas, conhecidas como sementes de linhaça, com coloração que varia do amarelo dourado ao marrom avermelhado (KAJLA; SHARMA; SOOD, 2015; RUBILAR et al, 2010). A linhaça é considerado um alimento funcional e possui em sua composição a presença de fitoestrógenos, ácidos graxos poliinsaturados (ômega-3 e ácido alfa-linolênico) e compostos fenólicos (ISMAIL, 2011; KASOTE et al, 2013; KHALESI; JAMALUDDIN; PETRINE et al, 2022). Entre os compostos fenólicos presentes nas sementes de linhaça destacam-se os ácidos fenólicos, flavonoides e lignanas (KAJLA; SHARMA; SOOD, 2015). Os ácidos fenólicos mais abundantes são o ácido ferúrico e o ácido clorogênico, enquanto o glicosídeos de ácido p-cumárico, glicosídeos de ácido hidroxicinâmico e ácido 4-hidroxibenzoico estão presentes em pequenas quantidades (BEEJMOHUN et al, 2007; MAZZA; BILIADERIS, 1989). Quanto aos flavonoides, os principais são Flavona C- e Flavona O-glicosídeos (MAZZA; BILIADERIS, 1989). Esses compostos fenólicos são reconhecidos por suas ações antioxidantes e anticancerígenas (KAJLA; SHARMA; SOOD, 2015).

O consumo da semente de linhaça pode promover ações benéficas à saúde cardiovascular, assim como em distúrbios metabólicos e hormonais (PEREIRA et al, 2022; SHAYAN et al 2020). Neste sentido, Petrine e colaboradores (2022) demonstraram que a suplementação com extrato de linhaça promoveu redução do colesterol total, da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e da lipase plasmática em ratas com baixa ação estrogênica (PETRINE et al, 2022). Ratas diabéticas suplementadas com linhaça apresentaram maior vasodilatação das artérias aorta torácicas por meio de vias dependentes de NO e prostaglandinas (TARHAN et al, 2021). Além disso, o tratamento com linhaça em camundongos fêmeas preveniu a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina e trastuzumab de forma semelhante ao grupo tratado com inibidor da enzima conversora de angiotensina (perindopril) (EEKHOUDT et al, 2022).

Os frutos, cascas, caules e folhas da amoreira (*Morus nigra*) apresentam várias propriedades terapêuticas e biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos, antidiabéticos, anti-obesidade, anti-hiperlipidêmico e anticâncer (LIM; CHOI, 2019). Serraino e

colaboradores (2003) identificaram a cianidina-3-O-glicosídeo (curomanina) como o principal composto fenólico do extrato de amora preta. Em seu estudo, a curomanina isolada ou o extrato de amora preta demonstraram potente atividade antioxidante, sendo capaz de inibir os processos oxidativos induzidos por peroxinitrito em células endoteliais humanas. Além disso, a administração dessas substâncias em banho de órgãos promoveu efeitos benéficos na função vascular, reduzindo a contratilidade da artéria aorta de ratos exposta ao peroxinitrito (SERRAINO et al, 2003). Assim como, foi relatado que a suplementação com extratos de amoreira promoveu ações cardioprotetoras por meio da redução do colesterol total, da LDL-c, da lipase plasmática (PETRINE et al, 2022) e aumento da recaptação de LDL-c de forma semelhante a lovastatina (RÖHRL et al, 2021) em roedores.

Tem sido demonstrado que o extrato de amoreira possui em sua composição a presença de polifenóis, compostos fenólicos, fitoestrógenos e ácidos graxos (MAQSOOD et al, 2022; NADERI et al, 2004; SAMANIEGO et al, 2020). Nas folhas de amoreira foram identificados quercetina, ácido clorogênico, ácido gálico, catequina, rutina, isoquercitrina, kaempferol-3-O-ramnosídeo (DIAB et al, 2020; SILVA et al, 2021; ZENI et al, 2017), assim como foi relatado a presença de queracianina, kuromanina, cianidina, cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo e cianidina-3-rutinosídeo no fruto da amoreira (SUTTISANSANEE et al., 2020; YAZDANKHAH, MOHAMMAD, MOHAMMAD, 2019). No entanto, tanto a composição nutricional da linhaça quanto da amoreira pode variar de acordo com a genética da planta e fatores ambientais, incluindo a região de plantio e clima (SAMANIEGO et al, 2020; SHAYAN et al 2020).

Considerando as alterações cardiovasculares decorrentes da deficiência estrogênica, como a disfunção endotelial e o aumento do risco de doenças cardiovasculares (LEE et al., 2022), e a associação entre a terapia hormonal e o aumento do risco de eventos cardiovasculares e câncer de mama em algumas mulheres (ROSSOUW et al., 2002; SALPETER et al., 2009), surge a necessidade de explorar alternativas terapêuticas mais seguras. Assim, diante das evidências promissoras de estudos pré-clínicos que demonstram os efeitos cardioprotetores de extratos de linhaça e amoreira (EEKHOUDT et al, 2022; PETRINE et al, 2022; SERRAINO et al, 2003; TARHAN et al., 2021), a hipótese deste estudo é que a suplementação com esses extratos promovem proteção contra alterações vasculares em ratas com deficiência estrogênica, sugerindo uma possível alternativa à terapia de reposição hormonal convencional.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Identificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça ou de amoreira, bem como investigar a ação vascular da suplementação com esses extratos em ratas Wistar com deficiência estrogênica.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença de compostos fenólicos nos extratos de linhaça e de amoreira por meio da cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliar os efeitos da suplementação com linhaça ou amoreira sobre a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas Wistar com deficiência estrogênica.
- Avaliar o efeito da pré-incubação com indometacina (inibidor não seletivo da COX), L-NAME (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase) e tiron (conversor de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio) sobre a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas Wistar com deficiência estrogênica suplementadas com extrato de linhaça e amoreira.
- Avaliar os efeitos da suplementação com linhaça ou amoreira sobre o relaxamento vascular promovido pela acetilcolina em segmentos de aorta torácica de ratas Wistar com deficiência estrogênica.
- Investigar o efeito da suplementação com extratos de linhaça e amoreira na concentração de hidroperóxidos (H_2O_2) e na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) na artéria aorta torácica de ratas com deficiência estrogênica.

REFERÊNCIAS

- ABAZARI, Mohammad F. et al. An updated review of various medicinal applications of p-Coumaric acid: From antioxidative and anti-inflammatory properties to effects on cell cycle and proliferation. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 2187-2201, 2021.
- ABDEL-WAHAB, M. H. et al. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 5, p. 461-465, 2003.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGO, Tetsuro et al. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. **Circulation research**, v. 106, n. 7, p. 1253-1264, 2010.
- AJAYI, Ayodeji Folorunsho; AKHIGBE, Roland Eghoghosoa. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. **Fertility research and practice**, v. 6, n. 1, p. 1 - 15, 2020.
- AL WATTAR, Bassel H.; TALAULIKAR, Vikram. Non-oestrogen-based and complementary therapies for menopause. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2023.
- ALLRED, Kimberly F. et al. Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 10, p. 1833-1838, 2009.
- AMES, Marisa K.; ATKINS, Clarke E.; PITT, Bertram. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 2, p. 363-382, 2019.
- ANDERSON, Garnet L. et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **Jama**, v. 291, n. 14, p. 1701-1712, 2004.
- BABIKER, Fawzi A. et al. Estrogen receptor β protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 7, p. 1524-1530, 2006.
- BADER, Michael. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 465, p. 79-85, 2013.
- BAGGOTT, Matthew J. et al. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 228, p. 109-118, 2013.
- BEEJMOHUN, Vickram et al. Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 18, n. 4, p. 275-282, 2007.

BENEDUSI, Valeria et al. Ovariectomy shortens the life span of female mice. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 10801, 2015.

BLASZCZUK, Agata et al. Role of phytoestrogen-rich bioactive substances (*Linum usitatissimum* L., *Glycine max* L., *Trifolium pratense* L.) in cardiovascular disease prevention in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 14, n. 12, p. 2467, 2022.

BOUABOUT, Ghina et al. Nox4 genetic inhibition in experimental hypertension and metabolic syndrome. **Archives of cardiovascular diseases**, v. 111, n. 1, p. 41-52, 2018.

BROSNIHAN, K. Bridget et al. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 273, n. 6, p. R1908-R1915, 1997.

BHANDARKAR, Nikhil S.; BROWN, Lindsay; PANCHAL, Sunil K. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. **Nutrition research**, v. 62, p. 78-88, 2019.

BHAT, Javeed Ahmad; GUPTA, Sushma; KUMAR, Manish. Neuroprotective effects of theobromine in transient global cerebral ischemia-reperfusion rat model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 571, p. 74-80, 2021.

BHAT, Javeed Ahmad; KUMAR, Manish. Neuroprotective effects of theobromine in permanent bilateral common carotid artery occlusion rat model of cerebral hypoperfusion. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 6, p. 1787-1801, 2022.

BHUIYAN, Md Shenuarin; SHIODA, Norifumi; FUKUNAGA, Kohji. Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in Akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, 2007.

CARNEIRO-RAMOS, M. S. et al. Cardiac angiotensin II type I and type II receptors are increased in rats submitted to experimental hypothyroidism. **The Journal of Physiology**, v. 583, n. 1, p. 213-223, 2007.

CARTER, Andrea E.; MERRIAM, Sarah. Menopause. **Medical Clinics of North American**, v. 107, n. 2, p. 199-212, 2023.

CAROCCIA, Brasilina et al. GPER-1 and estrogen receptor- β ligands modulate aldosterone synthesis. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4296-4304, 2014.

CASTRO, Carlos H. et al. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. **Life sciences**, v. 80, n. 3, p. 264-268, 2006.

CHAKRABARTI, Subhadeep; LEKONTSEVA, Olga; DAVIDGE, Sandra T. Estrogen is a modulator of vascular inflammation. **IUBMB life**, v. 60, n. 6, p. 376-382, 2008.

CHAPPEL, M. C.; FERRARIO, C. M. ACE and ACE2: their role to balance the expression of angiotensin II and angiotensin-(1-7). **Kidney international**, v. 70, n. 1, p. 8-10, 2006.

CHERRY, Nicola et al. Oestrogen therapy for prevention of reinfarction in postmenopausal women: a randomised placebo controlled trial. **Lancet** (London, England), v. 360, n. 9350, p. 2001-2008, 2002.

CHLEBOWSKI, Rowan T. et al. Association of menopausal hormone therapy with breast cancer incidence and mortality during long-term follow-up of the women's health initiative randomized clinical trials. **Jama**, v. 324, n. 4, p. 369-380, 2020.

COSTA-FRAGA, Fabiana P. et al. Age-related changes in vascular responses to angiotensin-(1-7) in female mice. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 19, n. 3, 2018.

COSTA, Joyce PL et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of *Morus nigra* L.(black mulberry) leaf powder on symptoms and quality of life among climacteric women. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 148, n. 2, p. 243-252, 2020

CRESCIOLI, Clara. The role of estrogens and vitamin D in cardiomyocyte protection: a female perspective. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1815, 2021.

DA SILVA, Jaqueline S. et al. Estrogen receptors: therapeutic perspectives for the treatment of cardiac dysfunction after myocardial infarction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 525, 2021.

DAHLMAN-WRIGHT, Karin et al. International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 4, p. 773-781, 2006.

DAMA, Aida et al. Estrogen receptor functions and pathways at the vascular immune interface. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4254, 2021.

DE MELLO, Walmor C.; FROHLICH, Edward D. Clinical perspectives and fundamental aspects of local cardiovascular and renal renin-angiotensin systems. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 16, 2014.

DEROO, Bonnie J. et al. Estrogen receptors and human disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 3, p. 561-570, 2006.

DIAB, Kawthar A. et al. Inhibitory activity of black mulberry (*Morus nigra*) extract against testicular, liver and kidney toxicity induced by paracetamol in mice. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 3, p 1733-1749, 2020.

DO, Sun Hee et al. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. **Menopausa** , v. 15, n. 4, pág. 676-683, 2008.

DOS SANTOS, Michel David et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

DUFFY, Diane M. et al. Ovulation: parallels with inflammatory processes. **Endocrine reviews**, v. 40, n. 2, p. 369-416, 2019.

DUTTA, Shubha R.; SINGH, Purnima; MALIK, Kafait U. Ovariectomy Via 12/15-lipoxygenase Augments Angiotensin II-Induced Hypertension and Its Pathogenesis in Female Mice. **Hypertension**, v. 80, n. 6, p. 1245-1257, 2023.

DWORATZEK, Elke et al. Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta. **Cardiovascular research**, v. 102, n. 3, p. 418-428, 2014.

EKHOUDT, Cameron R. et al. Comparing flaxseed and perindopril in the prevention of doxorubicin and trastuzumab-induced cardiotoxicity in C57Bl/6 mice. **Current Oncology**, v. 29, n. 5, p. 2941-2953, 2022.

EL KHOUDARY, Samar R. et al. The menopause transition and women's health at midlife: a progress report from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). **Menopause (New York, NY)**, v. 26, n. 10, p. 1213, 2019.

FAUBION, Stephanie S. et al. The 2022 hormone therapy position statement of the North American Menopause Society. **Menopause**, v. 29, n. 7, p. 767-794, 2022.

FELDMAN, Ross D.; GROS, Robert. Vascular effects of aldosterone: sorting out the receptors and the ligands. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 12, p. 916-921, 2013.

FINKELSTEIN, Joel S. et al. Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 3, p. 861-868, 2008.

FLORES, Valerie A.; PAL, Lubna; MANSON, JoAnn E. Hormone therapy in menopause: concepts, controversies, and approach to treatment. **Endocrine reviews**, v. 42, n. 6, p. 720-752, 2021.

FREDHOLM, Bertil B.; SMIT, Hendrik Jan. Theobromine and the pharmacology of cocoa. **Methylxanthines**, p. 201 - 234, 2011.

FUNDER, John V. et al. Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors. **Endocrinology**, v. 125, n. 4, p. 2224-2226, 1989.

GALVÃO, Elisângela Lopes et al. Evaluation of the antioxidant potential and sub-critical extraction of linseed oil. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 551-557, 2008.

GEORGIEVA, Antoaneta et al. Behavioral effects of Aronia melanocarpa fruit juice in a rat model of ovariectomy-induced estrogen deficit. **Folia Medica**, v. 64, n. 6, p. 975-981, 2022.

GERSH, Felice L. et al. The renin-angiotensin-aldosterone system in postmenopausal women: the promise of hormone therapy. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2021. p. 3130-3141.

GOMEZ-SANCHEZ, Elise; GOMEZ-SANCHEZ, Celso E. The multifaceted mineralocorticoid receptor. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 965, 2014.

GOSHI, Ekta; ZHOU, Gaoxin; HE, Qianjun. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. **Medical gas research**, v. 9, n. 4, p. 192, 2019.

GÖTZ, Viktoria et al. Ovulation is triggered by a cyclical modulation of gonadotropes into a hyperexcitable state. **Cell Reports**, v. 42, n. 6, 2023.

GRADY, Deborah et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). **Jama**, v. 288, n. 1, p. 49-57, 2002.

GRODSTEIN, Francine et al. Postmenopausal hormone therapy and mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 25, p. 1769-1776, 1997.

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

GROS, Robert et al. Aldosterone mediates its rapid effects in vascular endothelial cells through GPER activation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 304, n. 6, 2013.

GROS, Robert et al. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 442-451, 2011.

GU, Ronghe et al. Theobromine mitigates IL-1 β -induced oxidative stress, inflammatory response, and degradation of type II collagen in human chondrocytes. **International Immunopharmacology**, v. 82, p. 106226, 2020.

GÜNZLER, Wolfgang A. et al. The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. **De Gru.**, v. 365, p. 195-212, 1984.

HABIG, William H. et al. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 10, p. 3879-3882, 1974.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants—quo vadis?. **Trends in pharmacological sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HAN, Xiongyi et al. Syringic acid mitigates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by downregulating Ereg. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 26, n. 14, p. 4076-4086, 2022.

HAN, Yuqing et al. Role and regulatory mechanism of inhibin in animal reproductive system. **Theriogenology**, v. 202, p. 10-20, 2023.

HAMMER, Anna et al. Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 49, 2016.

HARRIS, Heather A. Estrogen receptor- β : recent lessons from in vivo studies. **Molecular endocrinology**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2007.

HAUFE, Annika; BAKER, Fiona C.; LEENERS, Brigitte. The role of ovarian hormones in the pathophysiology of perimenopausal sleep disturbances: a systematic review. **Sleep medicine reviews**, v. 66, 2022.

HEAPE, Walter. Memoirs: The "Sexual Season" of Mammals and the Relation of the "Pro-œstrum" to Menstruation. **Journal of Cell Science**, v. 2, n. 173, p. 1-70, 1900.

HODIS, Howard N. et al. Vascular effects of early versus late postmenopausal treatment with estradiol. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 13, p. 1221-1231, 2016.

HUANG, Yunke et al. Ex vivo to in vivo extrapolation of syringic acid and ferulic acid as grape juice proxies for endothelium-dependent vasodilation: Redefining vasoprotective resveratrol of the French paradox. **Food Chemistry**, v. 363, p. 130323, 2021.

HULLEY, Stephen et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. **Jama**, v. 280, n. 7, p. 605-613, 1998.

IDE, Tomomi et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. **Circulation research**, v. 88, n. 5, p. 529-535, 2001.

ILAVENIL, Soundharrajan et al. Trigonelline protects the cardiocyte from hydrogen peroxide induced apoptosis in H9c2 cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 4, p. 263-268, 2015.

IQBAL, Iram et al. Plant polyphenols and their potential benefits on cardiovascular Health: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 17, p. 6403, 2023.

JAIMES, Luisauris et al. A review of the actions of endogenous and exogenous vasoactive substances during the estrous cycle and pregnancy in rats. **Animals**, v. 9, n. 6, p. 288, 2019.

JIN, L. I. et al. Gallic acid reduces blood pressure and attenuates oxidative stress and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15607, 2017.

JANG, Myeong Hwan et al. Theobromine alleviates diet-induced obesity in mice via phosphodiesterase-4 inhibition. **European journal of nutrition**, v. 59, p. 3503-3516, 2020.

KAJLA, Priyanka; SHARMA, Alka; SOOD, Dev Raj. Flaxseed—a potential functional food source. **Journal of food science and technology**, v. 52, p. 1857-1871, 2015.

KANG, Lori S. et al. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 6, 2011.

KASOTE, D. M. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, 2013.

KHALESI, Saman; JAMALUDDIN, Rosita; ISMAIL, Amin. Effect of raw and heated flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) on blood lipid profiles in rats. **International Journal of Applied**, v. 1, n. 4, 2011.

KITTANA, Naim. Angiotensin-converting enzyme 2–Angiotensin 1-7/1-9 system: novel promising targets for heart failure treatment. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 14-25, 2018.

KUMAR, Ashwani et al. Major phytochemicals: Recent advances in health benefits and extraction method. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 887, 2023.

KUMAR, Subramanian; PRAHALATHAN, Pichavaram; RAJA, Boobalan. Syringic acid ameliorates L-NAME-induced hypertension by reducing oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, p. 1175-1184, 2012.

KURODA, Junya et al. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 35, 2010.

LEE, Emma et al. Vasomotor symptoms of menopause, autonomic dysfunction, and cardiovascular disease. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 323, n. 6, p. H1270-H1280, 2022.

LEVIN, Ellis R.; HAMMES, Stephen R. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 17, n. 12, p. 783-797, 2016.

LIM, Sung Ho; CHOI, Chang-Ik. Pharmacological properties of *Morus nigra* L. (*black mulberry*) as a promising nutraceutical resource. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 437, 2019.

LINDSEY, Sarah H.; LIU, Liu; CHAPPELL, Mark C. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. **Steroids**, v. 81, p. 99-102, 2014.

LIU, Gen et al. Syringic acid mitigates myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 531, n. 2, p. 242-249, 2020.

LIU, Jian-Di; WU, Yan-Qing. Anabolic-androgenic steroids and cardiovascular risk. **Chinese medical journal**, v. 132, n. 18, p. 2229-2236, 2019.

LØNNING, Per E. et al. Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically resected early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 22, p. 5126-5137, 2005.

MACOVA, Miroslava et al. Estrogen reduces aldosterone, upregulates adrenal angiotensin II AT2 receptors and normalizes adrenomedullary Fra-2 in ovariectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 88, n. 4, p. 276-286, 2008.

- MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 346, n. 2, p. 187-192, 1997.
- MAGGI, Roberto et al. GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. **Human reproduction update**, v. 22, n. 3, p. 358-381, 2016.
- MAHMOODZADEH, Shokoufeh; DWORATZEK, Elke. The role of 17 β -estradiol and estrogen receptors in regulation of Ca²⁺ channels and mitochondrial function in cardiomyocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 310, 2019.
- MAHMOODZADEH, Shokoufeh et al. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. **The FASEB journal**, v. 20, n. 7, p. 926-934, 2006.
- MANDARIM-DE-LACERDA, Carlos A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia brasileira de Ciências**, v. 75, p. 469-486, 2003.
- MANSON, JoAnn E. et al. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. **Jama**, v. 310, n. 13, p. 1353-1368, 2013.
- MARTÍN-PELÁEZ, Sandra et al. Effect of cocoa's theobromine on intestinal microbiota of rats. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 10, p. 1700238, 2017.
- MARZOLLA, Vincenzo et al. Mineralocorticoid receptor in adipocytes and macrophages: a promising target to fight metabolic syndrome. **Steroids**, v. 91, p. 46-53, 2014.
- MAQSOOD, Maria et al. Phytochemical characterization of *Morus nigra* fruit ultrasound-assisted ethanolic extract for its cardioprotective potential. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. e14335, 2022.
- MAZZA, G.; BILIADERIS, C. G. Functional properties of flax seed mucilage. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 5, p. 1302-1305, 1989.
- MCCOLLUM, LaTronya T., GALLAGHER, Patricia E., TALLANT E. Ann. A. Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts. **Peptides**, v. 34, n. 2, p. 380-388, 2012.
- MENDELSON, Michael E.; KARAS, Richard H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **New England journal of medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801-1811, 1999.
- MENG, F. U. et al. Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts in vitro. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 2, p. 129-134, 2012.
- MICHELSSEN, Trond M. et al. All-cause and cardiovascular mortality after hysterectomy and oophorectomy in a large cohort (HUNT2). **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 102, n. 4, p. 465-472, 2023.
- MILLER, Amanda J., ARNOLD Amy C. "The renin-angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications." **Clinical Autonomic Research**, v. 29, p. 231-243, 2019.

MOHAMED, M. G. et al. Polypill for cardiovascular disease prevention: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **International Journal of Cardiology**, v. 360, p. 91-98, 2022.

MOMPEÓN, Ana et al. Estradiol, acting through ER α , induces endothelial non-classic renin-angiotensin system increasing angiotensin 1–7 production. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 422, p. 1-8, 2016.

MOREIRA, A. Seixas Bello et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 19, n. 11, p. 805-810, 2009.

MOREIRA et al. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 149, p. 61-71, 2014.

MORSELLI, Eugenia et al. The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 352-364, 2017.

MURPHY, Elizabeth, STEENBERGEN, Charles. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia–reperfusion injury. **Cardiovascular research**, v. 75, n. 3, p. 478-486, 2007.

NADERI, Gholam Ali et al. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 18, n. 5, p. 365-369, 2004.

NAFTOLIN, Frederick et al. Cardiovascular health and the menopausal woman: the role of estrogen and when to begin and end hormone treatment. **F1000Research**, v. 8, 2019.

NELSON, Linda R.; BULUN, Serdar E. Estrogen production and action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 3, 2001.

NODE, Koichi et al. Roles of NO and Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary vasodilation induced by 17 β -estradiol in ischemic heart failure. **The FASEB journal**, v. 11, n. 10, p. 793-799, 1997.

NORDMEYER, Johannes et al. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. **Circulation**, v. 110, n. 20, p. 3270-3275, 2004.

NYSKA, Abraham et al. Acute hemorrhagic myocardial necrosis and sudden death of rats exposed to a combination of ephedrine and caffeine. **Toxicological sciences**, v. 83, n. 2, p. 388-396, 2005.

O'BRIEN, Peter C.; FLEMING, Thomas R. A multiple testing procedure for clinical trials. **Biometrics**, p. 549-556, 1979.

OHLSTEIN, Eliot H. et al. Application of in vivo and ex vivo magnetic resonance imaging for evaluation of tranilast on neointima formation following balloon angioplasty of the rat carotid artery. **Cardiovascular research**, v. 47, n. 4, p. 759-768, 2000.

OMIDI-ARDALI, Hossein et al. Inflammatory responses bridge comorbid cardiac disorder in experimental model of IBD induced by DSS: protective effect of the trigonelline. **Inflammopharmacology**, v. 27, p. 1265-1273, 2019.

O'NEILL, Sheila; EDEN, John. The pathophysiology of menopausal symptoms. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 22, n. 3, p. 63-69, 2012.

PAKDEL, Farzad. The Role of Estrogen Receptors in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11354, 2023.

PANCHAL, Sunil K. et al. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 611-624, 2011.

PAPADIMITRIOU, Alexandros et al. Theobromine increases NAD⁺/Sirt-1 activity and protects the kidney under diabetic conditions. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 308, n. 3, p. F209-F225, 2015.

PETRINE, Jéssica Castro et al. Beneficial Effects of Flaxseed and/or Mulberry Extracts Supplementation in Ovariectomized Wistar Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 15, p. 3238, 2022.

PERRONE, Daniel; DONANGELO, Carmen Marino; FARAH, Adriana. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 110, n. 4, p. 1030-1035, 2008.

PEYTON, Mina P. et al. Natural aging and ovariectomy induces parallel phosphoproteomic alterations in skeletal muscle of female mice. **Aging (Albany NY)**, v. 15, n. 15, p. 7362, 2023.

PITT, Bertram et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1309-1321, 2003.

PITT, Bertram et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 709-717, 1999.

PRAHALATHAN, Pichavaram; KUMAR, Subramanian; RAJA, Boobalan. Morin attenuates blood pressure and oxidative stress in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: a biochemical and histopathological evaluation. **Metabolism**, v. 61, n. 8, p. 1087-1099, 2012.

PRASANNA, Nagalakshmi; RASOOL, Mahaboobkhan. Modulation of gene-expression profiles associated with sodium arsenite-induced cardiotoxicity by p-coumaric acid, a common dietary polyphenol. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 174-180, 2014.

PROSSNITZ, Eric R.; ARTERBURN, Jeffrey B. International union of basic and clinical pharmacology. XCVII. G protein-coupled estrogen receptor and its pharmacologic modulators. **Pharmacological reviews**, v. 67, n. 3, p. 505-540, 2015.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, Diana et al. Early Estrogen Replacement Therapy Attenuates Cardiac Dysfunction Caused by Aging and Ovariectomy in Female Wistar Rats. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 29, n. 1, p. 46, 2024.

RATTANASOPA, Chutima et al. Significant role of estrogen in maintaining cardiac mitochondrial functions. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 147, p. 1-9, 2015.

RÖHRL, Clemens et al. Aqueous extracts of lingonberry and blackberry leaves identified by high-content screening beneficially act on cholesterol metabolism. **Food & Function**, v. 12, n. 21, p. 10432-10442, 2021.

ROMAGNI, Paola et al. Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 2, p. 345-349, 2003.

ROSSOUW, Jacques E. et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. **Jama**, v. 297, n. 13, p. 1465-1477, 2007.

ROSSOUW, Jacques E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. **Jama**, v. 288, n. 3, p. 321-333, 2002.

ROSSI, Gian Paolo; CAROCCIA, Brasilina; SECCIA, Teresa M. Role of estrogen receptors in modulating aldosterone biosynthesis and blood pressure. **Steroids**, v. 152, p. 108486, 2019.

ROTH, A. R. et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019. **J Am Coll Cardiol**, v. 76, n. 25, p. 2982-3021, 2020.

RUBILAR, M. et al. Flaxseed as a source of functional ingredients. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, p. 373-377, 2010.

SABBATINI, Andrea Rodrigues; KARARIGAS, Georgios. Estrogen-related mechanisms in sex differences of hypertension and target organ damage. **Biology of sex differences**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2020.

SALPETER, Shelley R. et al. Bayesian meta-analysis of hormone therapy and mortality in younger postmenopausal women. **The American journal of medicine**, v. 122, n. 11, p. 1016-1022. e1, 2009.

SALPETER, Shelley R. et al. Brief report: coronary heart disease events associated with hormone therapy in younger and older women: a meta-analysis. **Journal of general internal medicine**, v. 21, p. 363-366, 2006.

SAMANIEGO, Iván et al. Influence of the maturity stage on the phytochemical composition and the antioxidant activity of four Andean blackberry cultivars (*Rubus glaucus* Benth) from Ecuador. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1027, 2020.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, Lorena et al. A systematic review of the cardiometabolic benefits of plant products containing mixed phenolics and polyphenols in postmenopausal women:

insufficient evidence for recommendations to this specific population. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4276, 2021.

SANTORO, Nanette et al. The menopause transition: signs, symptoms, and management options. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 106, n. 1, p. 1-15, 2021.

SAWANT, Sameer H.; BODHANKAR, Subhash L. Flax lignan concentrate reverses alterations in blood pressure, left ventricular functions, lipid profile and antioxidant status in DOCA-salt induced renal hypertension in rats. **Renal Failure**, v. 38, n. 3, p. 411-423, 2016.

SCHMALENBERGER, Katja M. et al. A systematic review and meta-analysis of within-person changes in cardiac vagal activity across the menstrual cycle: implications for female health and future studies. *Journal of clinical medicine*, v. 8, n. 11, p. 1946, 2019.

SCHMALENBERGER, Katja M. et al. How to study the menstrual cycle: Practical tools and recommendations. **Psychoneuroendocrinology**, v. 123, 2021.

SCHUNKERT, Heribert et al. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. **Circulation**, v. 95, n. 1, p. 39-45, 1997.

SEELIGER, Erdmann et al. The 'body fluid pressure control system' relies on the renin-angiotensin-aldosterone system: balance studies in freely moving dogs. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 32, n. 5-6, p. 394-399, 2005.

SERRAINO, Ivana et al. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **Life sciences**, v. 73, n. 9, p. 1097-1114, 2003.

SHACKEBAEI, Dareuosh et al. Gallic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 41, 2022.

SHAYAN, Mersedeh et al. Flaxseed for health and disease: Review of clinical trials. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 23, n. 8, p. 699-722, 2020.

SHAITO, Abdullah et al. Herbal medicine for cardiovascular diseases: efficacy, mechanisms, and safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 422, 2020.

SHI, Yi; LEUNG, Susan Wai Sum. Long-term nitric oxide synthase inhibition prevents 17 β -estradiol-induced suppression of cyclooxygenase-dependent contractions and enhancement of endothelium-dependent hyperpolarization-like relaxation in mesenteric arteries of ovariectomized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 882, 2020.

SHUMAKER, Sally A. et al. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 289, n. 20, p. 2651-2662, 2003.

SILVA-ANTONIALLI, Michele Melo et al. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 3, p. 587-593, 2004.

SILVA, Dionísio Henrique Amaral da et al. Hexane fraction from Brazilian *Morus nigra* leaves improved oral carbohydrate tolerance and inhibits α -amylase and α -glucosidase activities in diabetic mice. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4785-4788, 2021.

SMITH, Carolyn L.; O'MALLEY, Bert W. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 1, p. 45-71, 2004.

SMOLDERS, Lotte et al. Theobromine does not affect postprandial lipid metabolism and duodenal gene expression, but has unfavorable effects on postprandial glucose and insulin responses in humans. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 719-727, 2018.

STACHOWIAK, Grzegorz; PERTYŃSKI, Tomasz; PERTYŃSKA-MARCZEWSKA, Magdalena. **Metabolic disorders in menopause**. Menopause Review/Przegląd Menopauzalny, v. 14, n. 1, p. 59-64, 2015.

STEVENSON, John C. A woman's journey through the reproductive, transitional and postmenopausal periods of life: impact on cardiovascular and musculo-skeletal risk and the role of estrogen replacement. **Maturitas**, v. 70, n. 2, p. 197-205, 2011.

SULLIVAN, Jennifer C.; SASSER, Jennifer M.; POLLOCK, Jennifer S. Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. American Journal of Physiology-Regulatory, **Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 2, 2007.

SUTTISANSANEE, Uthaiwan et al. Mulberry fruit cultivar 'Chiang Mai' prevents beta-amyloid toxicity in PC12 neuronal cells and in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 25, n. 8, 2020.

TALAULIKAR, Vikram. Menopause transition: Physiology and symptoms. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 81, p. 3-7, 2022.

TANAKA, Miori et al. Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. extract and gallic acid attenuate LPS-induced inflammation and oxidative stress via MAPK/NF- κ B and Akt/AMPK/Nrf2 pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

TARHAN, Nilay et al. Effects of flaxseed intake on vascular contractile function in diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology (IJEb)**, v. 59, n. 06, p. 398-405, 2021.

TENOPOULOU, Margarita; DOULIAS, Paschalis-Thomas. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Research**, v. 9, 2020.

TIANO, Joseph P.; MAUVAIS-JARVIS, Franck. Importance of oestrogen receptors to preserve functional β -cell mass in diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 6, p. 342-351, 2012.

TSCHANZ, Stefan A.; BURRI, Peter Hermann; WEIBEL, Ewald Rudolf. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. **Journal of microscopy**, v. 243, n. 1, p. 47-59, 2011.

TSOUTSOUKI, Jovanna; ABBARA, Ali; DHILLO, Waljit. Novel therapeutic avenues for kisspeptin. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 67, 2022.

TSUCHIYA, Tomofumi; SUZUKI, Ori; IGARASHI, Kiharu. Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 765-768, 1996.

VELARDO, Joseph Thomas. Induction of ovulation in immature hypophysectomized rats. **Science**, v. 131, n. 3397, p. 357-359, 1960.

VIDAL-GÓMEZ, Xavier et al. Decreased bioavailability of nitric oxide in aorta from ovariectomized senescent mice. Role of cyclooxygenase. **Experimental Gerontology**, v. 76, p. 1-8, 2016.

VILELA, Márcio Gomes; JÚNIOR, J. L. S.; SILVA, JG de C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.

WANG, Di et al. Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, p. 110773, 2020.

WANG, Hao et al. Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodelling in oophorectomized mRen2. Lewis rats. **Cardiovascular research**, v. 94, n. 1, p. 96-104, 2012.

XU, Fujie et al. The Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) in Vascular Pathology and Physiology. **Biomolecules**, v. 13, n. 9, p. 1410, 2023.

XUE, Baojian; JOHNSON, Alan Kim; HAY, Meredith. Sex differences in angiotensin II-and aldosterone-induced hypertension: the central protective effects of estrogen. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 5, 2013.

YADAV, Umesh CS; BAQUER, Najma Z. Pharmacological effects of *Trigonella foenum-graecum* L. in health and disease. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 2, p. 243-254, 2014.

YAFFE, Kristine et al. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. **Jama**, v. 279, n. 9, p. 688-695, 1998.

YAN, Xiao et al. Gallic acid suppresses cardiac hypertrophic remodeling and heart failure. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 5, 2019.

YAN, Xiao et al. Gallic acid attenuates angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction by inhibiting the degradation of endothelial nitric oxide synthase. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1121, 2020.

YAŞAR, Pelin et al. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. **Reproductive medicine and biology**, v. 16, n. 1, p. 4-20, 2017.

YAZDANKHAH, Samira; MOHAMMAD, Hojjati; MOHAMMAD; Hossein Azizi. Extraction of phenolic compounds from Black Mulberry using aqueous, ethanol and aqueous-ethanol solvents: effects of heat treatments on chemical properties of the extracts. **Nutrition and Food Sciences Research**, v. 6, n. 3, p. 39-47, 2019.

YOSHINARI, Ori; SATO, Hideyo; IGARASHI, Kiharu. Anti-diabetic effects of pumpkin and its components, trigonelline and nicotinic acid, on Goto-Kakizaki rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1033-1041, 2009.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 243, n. 6, p. H941-H947, 1982.

YU, Zhen et al. Follicle stimulating hormone promotes production of renin through its receptor in juxtaglomerular cells of kidney. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2022.

YU, Zhuo et al. Level of Estrogen in Females—The Different Impacts at Different Life Stages. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1995, 2022.

YUYAMA, S.; SUZUKI, T. The excretion of N1-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid and related compounds in human subjects after oral administration of nicotinic acid, trigonelline and N1-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid. **Kynurenine and Serotonin Pathways: Progress in Tryptophan Research**, p. 475-479, 1991.

ZENI, Ana Lucia B. et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2805-2815, 2017.

ZHANG, Hongchao et al. Role of interleukin-6 in cardiac inflammation and dysfunction after burn complicated by sepsis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 5, 2007.

ZHANG, Xiao-Juan et al. 17 β -estradiol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in male Sprague-Dawley rats by regulating NADPH oxidase and apoptosis genes. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 5, p. 2695-2702, 2017.

ZHOU, Zhenqi et al. Estrogen receptor α controls metabolism in white and brown adipocytes by regulating Polg1 and mitochondrial remodeling. **Science translational medicine**, v. 12, n. 555, 2020.

ZHU, Jing et al. Role of estrogen in the regulation of central and peripheral energy homeostasis: from a menopausal perspective. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, p. 20420188231199359, 2023.

SEGUNDA PARTE: ARTIGO - Efeitos da suplementação com extratos de linhaça ou amoreira na função vascular e no estresse oxidativo de artérias aortas torácicas de ratas com deficiência estrogênica

RESUMO

INTRODUÇÃO: A deficiência estrogênica contribui para a disfunção endotelial por meio da redução da biodisponibilidade de óxido nítrico e do aumento do estresse oxidativo, favorecendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e aterosclerose. Embora estudos clínicos e experimentais demonstrem efeitos cardioprotetores dos estrogênios, o tratamento exógeno com estradiol pode aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e câncer de mama em algumas mulheres, o que limita sua utilização na terapia de reposição hormonal. Assim, a busca por produtos naturais com potenciais respostas antioxidantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras, tem sido de grande interesse, com intuito de trazer benefícios para o organismo com deficiência estrogênica e consequentemente cardioproteção. **OBJETIVO:** Identificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça ou de amoreira, bem como investigar a ação vascular da suplementação com esses extratos em ratas Wistar com deficiência estrogênica. **MÉTODOS:** A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para determinar os compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça e amoreira. Ratas Wistar adultas foram divididas em cinco grupos experimentais, sendo um grupo com animais em proestro que tiveram cirurgia simulada e foram tratados com salina (SHAM) e 04 grupos ovariectomizados tratado com salina (OVX); estradiol (E2; 5 µg/kg/dia); extrato de linhaça (Flaxseed; 400 mg/kg/dia); ou extrato de amoreira (Mulberry; 400 mg/kg/dia). Foram realizadas curvas de concentração-resposta para avaliar a resposta contrátil desencadeada por fenilefrina e a resposta vasodilatadora desencadeada por acetilcolina. Assim como, foi avaliado o efeito da pré-incubação com indometacina, L-NAME e Tiron sobre a resposta contrátil à fenilefrina na artéria aorta torácica dos animais. A concentração de hidroperóxidos e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram determinadas na artéria aorta torácica. Os dados foram analisados utilizando a ANOVA *one-way* ou *two-way* seguido pelo teste de Bonferroni, e foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Por meio do HPLC foi observado a presença de trigonelina, ácido gálico e ácido p-cumárico no extrato de linhaça, enquanto no extrato de amoreira foram identificados ácido gálico, teobromina, ácido clorogênico e ácido siríngico. A deficiência estrogênica aumentou a vasoconstrição das artérias aorta torácicas em resposta à fenilefrina, mas não alterou o relaxamento vascular. A realização da ovariectomia aumentou a produção de radicais livres após 8 semanas de deficiência de estrogênio. O tratamento com estradiol ou a suplementação com extrato de linhaça ou amoreira nos animais ovariectomizados reduziu a contração vascular induzida por fenilefrina de forma dependente da modulação da óxido nítrico sintase e da proteção contra danos oxidativos. A suplementação com estes extratos reduziu a concentração de peróxido de hidrogênio, assim como a suplementação com extrato de linhaça aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase, na aorta torácica. **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que a suplementação com extratos de linhaça ou amoreira pode promover proteção vascular na deficiência estrogênica por meio da redução da resposta vascular contrátil e do estresse oxidativo. Além disso, a suplementação com extrato de linhaça demonstrou maior eficácia.

Palavras-chave: Estrógenos; Nutracêuticos; Reatividade vascular; Estresse Oxidativo.

PART TWO: ARTICLE - Effects of flaxseed or mulberry extract supplementation on vascular function and oxidative stress in the thoracic aortas of estrogen-deficient rats

ABSTRACT

INTRODUCTION: Estrogen deficiency contributes to endothelial dysfunction by reducing nitric oxide bioavailability and increasing oxidative stress, favoring the development of cardiovascular diseases such as hypertension and atherosclerosis. Although clinical and experimental studies demonstrate the cardioprotective effects of estrogens, exogenous treatment with estradiol can increase the risk of developing cardiovascular diseases and breast cancer in some women, limiting its use in hormone replacement therapy. Thus, the search for natural products with potential antioxidant, anti-inflammatory, and vasodilator responses has been of great interest, aiming to bring benefits to the estrogen-deficient organism and consequently cardioprotection. **OBJECTIVE:** To identify the phenolic compounds present in flaxseed or mulberry extracts, as well as to investigate the vascular action of supplementation with these extracts in estrogen-deficient Wistar rats. **METHODS:** High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the phenolic compounds present in flaxseed and mulberry extracts. Adult Wistar rats were divided into five experimental groups, one group with animals in proestrus that underwent sham surgery and were treated with saline (SHAM) and four ovariectomized groups treated with saline (OVX); estradiol (E2; 5 µg/kg/day); flaxseed extract (Flaxseed; 400 mg/kg/day); or mulberry extract (Mulberry; 400 mg/kg/day). Concentration-response curves were performed to evaluate the contractile response triggered by phenylephrine and the vasodilatory response triggered by acetylcholine. Likewise, the effect of pre-incubation with indomethacin, L-NAME, and Tiron on the contractile response to phenylephrine in the thoracic aorta of the animals was evaluated. The concentration of hydroperoxides and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined in the thoracic aorta. The data were analyzed using one-way or two-way ANOVA followed by the Bonferroni test, and were considered statistically significant if $p < 0.05$. **RESULTS:** Through HPLC, trigonelline, gallic acid, and p-coumaric acid were observed in the flaxseed extract, while gallic acid, theobromine, chlorogenic acid, and syringic acid were identified in the mulberry extract. Estrogen deficiency increased vasoconstriction of the thoracic aortas in response to phenylephrine but did not alter vascular relaxation. Ovariectomy increased the production of free radicals after 8 weeks of estrogen deficiency. Treatment with estradiol or supplementation with flaxseed or mulberry extract in ovariectomized animals reduced the vascular contraction induced by phenylephrine in a manner dependent on the modulation of nitric oxide synthase and protection against oxidative damage. Supplementation with these extracts reduced the concentration of hydrogen peroxide, as well as supplementation with flaxseed extract increased the activity of the enzyme superoxide dismutase, in the thoracic aorta. **CONCLUSION:** The results suggest that supplementation with flaxseed or mulberry extracts can promote vascular protection in estrogen deficiency through the reduction of vascular contractile response and oxidative stress. Furthermore, supplementation with flaxseed extract demonstrated greater efficacy.

Keywords: Estrogens; Nutraceuticals; Vascular reactivity; Oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, os sinais e sintomas decorrentes da menopausa, que geralmente se inicia entre os 45 e 55 anos de idade, tornou-se cada vez mais longos e impactantes na vida das mulheres (CARTER; MERRIAM, 2023; EL KHOUDARY; NASR, 2022; SANTORO et al, 2021). A menopausa tipicamente ocorre após se passado 12 meses desde a última menstruação da mulher ou por remoção cirúrgica dos ovários, no qual ocorre a redução das concentrações de estrogênios e progesterona (CARTER; MERRIAM, 2023; SANTORO et al, 2021). Essa redução hormonal, assim como alterações na expressão e na atividade de receptores para estrogênios, então associada com diversos sinais e sintomas, como por exemplo, ondas de calor, sudoreses noturnas, insônia, alterações de humor, diminuição da libido, ansiedade, osteoporose e aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares (GEORGIEVA et al, 2022; LEE et al, 2022; O'NEILL; EDEN, 2012; PAKDEL et al, 2023; YU et al, 2022).

Os estrogênios, via receptores para estrogênio alfa ($ER\alpha$), beta ($ER\beta$) ou da proteína G (GPER), podem desencadear eventos de sinalização celular, modulando a expressão gênica, recrutando co-reguladores ou por vias não genômicas, promovendo ações celulares específicas como a expressão da óxido nítrico sintase e de enzimas antioxidantes (SMITH; O'MALLEY, 2004; ZHU et al, 2023). Estas ações podem estimular, por exemplo, a síntese de óxido nítrico (NO) e exercer efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios nas células endoteliais (SHI; LEUNG, 2020; JUNIOR et al, 2017). Dessa forma, a deficiência estrogênica pode contribuir para a disfunção endotelial por meio da redução da biodisponibilidade de NO e do aumento do estresse oxidativo, favorecendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e aterosclerose (BIANCHI et al, 2006; ROSSI et al, 2008 SHI; LEUNG, 2020).

Embora estudos clínicos e experimentais demonstrem efeitos cardioprotetores dos estrogênios, o tratamento exógeno com estradiol pode aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e câncer de mama em algumas mulheres (FAUBION et al, 2022; ROSSOUW et al, 2002; SALPETER et al, 2009), o que limita a utilização da terapia de reposição hormonal. Por outro lado, estudos demonstram que metabólitos secundários encontrados em alimentos funcionais, como os compostos fenólicos, exercem benefícios cardiovasculares, incluindo ações vasodilatadoras, antioxidantes e antiproliferativas (SHAITO et al, 2020; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al, 2021).

Dados demonstram que extratos de linhaça ou amoreira apresentam elevada concentração de compostos fenólicos e propriedades antioxidantes (PETRINE et al, 2022), o que poderia atuar na prevenção da disfunção endotelial promovida pela deficiência estrogênica (OLIVEIRA et al, 2020a). Em ratas ovariectomizadas a suplementação com esses extratos promoveu menor ganho de peso, predomínio de células epiteliais vaginais no lavado vaginal, melhora do perfil lipídico de forma semelhante aos animais ovariectomizados tratados com estrogênio (PETRINE et al, 2022). Além disso, em ratas diabéticas, a suplementação com extrato de linhaça preveniu o aumento da contração vascular das artérias aorta torácicas por mecanismos dependentes de óxido nítrico e prostaglandinas (TARHAN et al, 2021). Assim como, a administração do extrato do fruto da amoreira preta em câmara de órgãos promoveu efeitos benéficos na função vascular, reduzindo a contratilidade da artéria aorta de ratos exposta ao peroxinitrito (SERRAINO et al, 2003).

Em humanos, o consumo da semente de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) e da folha de amoreira preta (*Morus nigra L.*) são associados com alívio dos sintomas associados à deficiência estrogênica (BŁASZCZUK et al, 2022; COSTA et al, 2020; GHAZANFARPOUR et al, 2016). A semente da linhaça, por exemplo, foi associada com melhorias no perfil lipídico, bem como redução da frequência e intensidade de ondas de calor e suores noturnos em mulheres na menopausa (BŁASZCZUK et al, 2022; GHAZANFARPOUR et al, 2016). Assim como, um ensaio clínico randomizado realizado com 62 mulheres no climatério observou que o consumo de 250 mg do pó de folha de *Morus nigra L.* por 60 dias promoveu melhorias nos sintomas do climatério (como ondas de calor e insônia) e melhorias na qualidade de vida (avaliada pelo questionário SF-36 que abrange oito domínios, incluindo aspectos físicos, emocionais e sociais) de forma semelhante as mulheres tratadas com 1 mg de estradiol (COSTA et al, 2020).

Portanto, o presente estudo tem por objetivo identificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) ou de amoreira (*Morus nigra L.*), bem como investigar os efeitos da suplementação com esses extratos sobre a função vascular em um modelo animal com deficiência estrogênica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e preparo das soluções administradas

2.1.1 Extratos de Linhaça e Amoreira

Sementes de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) do tipo marrom e folhas, caules e pecíolos de amoreira (*Morus nigra*) foram adquiridas na empresa Agranel Armazém Comercio De Alimentos Ltda (CNPJ: 22.094.724/0001-84) e na empresa Botica Chá da Terra Ltda (CNPJ 64.178.445/0001-49; Lote: AMORR01/0124), respectivamente. O preparo do extrato de linhaça e de amoreira foi realizado no Laboratório de Análise de Alimentos localizado no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes de linhaça e as folhas, caules e pecíolos da amoreira foram triturados separadamente em liquidificador da marca Philips Walita até a obtenção de uma farinha que, em seguida, foi peneirada em uma peneira de 20 mesh. Trinta gramas destas pequenas frações de linhaça e amoreira foram pesadas para a realização da extração.

O extrato de linhaça foi obtido por meio da metodologia descrita por Galvão e colaboradores (GALVÃO et al, 2008). As pequenas frações de linhaça foram misturadas em éter etílico na proporção 1:20, levadas para a agitação por uma hora e filtradas a vácuo. O extrato seco (precipitado 1) resultante foi misturado em álcool etílico (proporção 1:20), levado para a agitação por uma hora e filtrado a vácuo. O precipitado 2 foi misturado em água destilada (proporção 1:20), levado a agitação por 1 hora e filtrado a vácuo. O precipitado 3 formado foi descartado e o extrato aquoso foi armazenado em frasco âmbar envolto por papel alumínio e acondicionado na geladeira a 4° Celsius.

A metodologia de Meng e colaboradores e adaptada para a amoreira por Petrine e colaboradores por foi utilizada para preparar o extrato de amoreira (MENG et al, 2012; PETRINE et al, 2022). As pequenas frações de folhas, caules e pecíolos de amoreira foram misturados em etanol 95% (proporção 1:20) por três horas em uma temperatura de 60-70 °C. Em seguida, a amostra foi concentrada em um evaporador rotativo a vácuo até a obtenção de um extrato seco. O extrato foi ressuscitado em 135 ml de água destilada, filtrado a vácuo e armazenado em frasco âmbar envolto por papel alumínio e acondicionado na geladeira a 4 °C.

A administração do extrato de linhaça (SAWANT; BODHANKAR, 2016) e do extrato de amoreira (DO et al, 2008) foi realizada na dose de 400 mg/kg/dia, via gavagem, por 60 dias (PETRINE et al, 2022).

2.1.2 Estrogênio

Comprimido contendo 1 mg de 17-beta-estradiol (Natifa, Libbs Farmacêutica) foi macerado e diluído em 400 ml de salina. Em seguida, a solução foi envasada em frasco protegido da luz e acondicionada a 4° Celsius (PETRINE et al, 2022). O estrogênio foi administrado, via gavagem, na dose de 5 µg/kg/dia (RAMÍREZ-HERNÁNDEZ et al, 2024) por 60 dias.

2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de índice de refração (RID) foi utilizada para determinar o perfil e a quantidade de compostos fenólicos dos extratos utilizados. As análises cromatográficas foram realizadas na Central de Análises e Prospecção Química, localizada no Departamento de Química da UFLA. Os extratos de linhaça e amoreira foram diluídos em água destilada nas respectivas proporções 1:10 e 1:100. Em seguida, três repetições de cada amostra (extrato de linhaça ou de amoreira) e uma de água destilada (branco) foram filtradas utilizando filtros de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm, acondicionadas em vials e injetadas no sistema cromatográfico. O tempo de retenção dos padrões foi utilizado para verificar a presença dos seguintes compostos: ácido clorogênico; cafeína; trigonelina; ácido gálico; catequina; ácido cafeico; ácido cumárico; ácido clorogênico; ácido siríngico; quercetina; campferol; cianidina e teobromina. A quantificação dos compostos foi realizada por meio da construção de curvas analíticas obtidas por regressão linear, considerado o coeficiente de determinação (R^2) médio de 0,99.

2.3 Animais

Foram utilizadas ratas adultas (10 semanas; 250-300g) heterogêneas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) adquiridos no Biotério da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ, São João del-Rei, Brasil). Os animais foram acondicionados em caixas plásticas (50x60x22 cm) contendo quatro animais em cada. O ambiente era controlado com temperatura de 22±2°C e mantido em ciclo claro/escuro (12/12 horas), com acesso a ração

comercial padrão e água à *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFLA sob o número de protocolo 071/19.

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, sendo um grupo com animais com cirurgia simulada e tratados com salina (SHAM; n =7) e 04 grupos ovariectomizados e tratados com salina (OVX; n=9); estradiol (E2; n=9); extrato de linhaça (Flaxseed; n = 9); ou extrato de amoreira (Mulberry; n=10).

2.4 Ovariectomia bilateral

A ovariectomia bilateral é uma técnica cirúrgica muito utilizada em pesquisas pré-clínicas em modelo animal para mimetizar as alterações hormonais vivenciadas no organismo feminino durante a menopausa (GEORGIEVA et al, 2022; YU et al, 2022). Resumidamente, após a administração intraperitoneal de Xilazina (10 mg/kg) e Ketamina (90 mg/kg) foi realizada uma incisão bilateral entre a última costela e a coxa das ratas. Em seguida, os ovários foram exteriorizados e removidos. As incisões foram suturadas com fio de algodão preto Suturim 5 mm e os animais receberam uma dose profilática de Pentabiótico Veterinário (0,2 ml/rata, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda) e do anti-inflamatório e analgésico flunixinina (2,5 mg/kg, Banamine, Chemitec Agro-Vetrinária Ltda). No grupo SHAM, foi realizado o mesmo procedimento, porém sem a retirada dos ovários. Durante 7 dias após a realização da ovariectomia bilateral, as ratas permaneceram em recuperação.

2.5 Ciclo estral

O ciclo estral de roedores é dividido em quatro fases, sendo elas: metaestro (ou diestro I), diestro (ou diestro II), proestro e estro (AJAYI; AKHIGBE, 2020; JAIMES et al, 2019). No dia da eutanásia, foi verificado a fase do ciclo estral dos animais do grupo SHAM por meio da realização do lavado vaginal. As células epiteliais vaginais foram avaliadas em microscópio óptico da marca Olympus CX22 RFS2, com objetiva de 10 e 40X (VILELA; JÚNIOR; SILVA, 2007). Todos os experimentos conduzidos no grupo SHAM foram realizados em animais que apresentavam células vaginais correspondentes à fase de proestro. A fase de proestro é marcada pelo aumento das concentrações de estrogênio (AJAYI; AKHIGBE, 2020)

2.6 Eutanásia

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com solução inalatória (Isoflurano, BioChimico) e decapitados. A artéria aorta torácica foi dissecada e seccionada para realização do teste de reatividade vascular e de análises de estresse oxidativo.

2.7 Reatividade Vascular

Artérias aorta torácica foram dissecadas, retiradas a gordura perivascular e seccionadas em anéis de 4 mm. Os anéis foram suspensos em banho de órgão contendo solução de Krebs-Henseleit (contendo 118,0 mM de NaCl, 25,0 mM de NaHCO₃, 11,1 mM de glicose, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KH₂PO₄, 1,2 mM de MgSO₄.7H₂O e 2,5 mM de CaCl₂) a 37 °C, pH 7,4 e aerado continuamente com uma mistura de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico sobre tensão de repouso de 1g, que foi ajustada a cada 15 min durante 60 minutos. A tensão isométrica foi registrada utilizando um transdutor de deslocamento de força (Ugo Basile, Comércio, VA, Itália) conectado a um sistema de aquisição (Data Capsule Digital Recorder 17400, Ugo Basile).

Após estabilização de 1 hora, todos os anéis foram expostos duas vezes à solução de Krebs-Henseleit de 90 mM de KCl para avaliar, respectivamente, a integridade funcional e a tensão máxima desenvolvida. Em seguida, a integridade endotelial foi avaliada com acetilcolina (10^{-6}) em anéis contraídos previamente com fenilefrina (10^{-7}). Os anéis foram considerados íntegros quando o relaxamento promovido pela acetilcolina foi superior a 70% (MORAIS et al, 2019). Nos anéis íntegros foram realizadas curvas de concentração-resposta para avaliar a resposta contrátil desencadeada por fenilefrina (10^{-10} - 10^{-5}), um agonista alfa 1-adrenérgico, e a resposta vasodilatadora desencadeada por acetilcolina (10^{-2} - 10^{-7} M) após uma pré-contração com fenilefrina (10^{-4} M) ou após uma pré-contração com solução de Krebs-Henseleit de 60 mM de KCl (JUNIOR et al, 2017).

A participação do óxido nítrico, das prostaglandinas e das espécies reativas ao oxigênio na resposta contrátil desencadeada por fenilefrina (10^{-10} - 10^{-5} M) foi avaliada após pré-incubação por 20 minutos com, respectivamente, inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (L-NAME, 10^{-4} M) (BRAGA et al, 2015), indometacina (10^{-5} M), um inibidor não-seletivo da ciclooxigenase (COX) e Tiron (10^{-4} M), um conversor de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (OLIVEIRA et al, 2020b).

2.8 Estresse oxidativo

A aorta torácica foi imersa em solução de Krebs-Henseleit gelada para remover o sangue. Com o auxílio de um homogeneizador de tecidos, 20mg de artéria aorta torácica foram homogeneizados em 200µl de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$. O homogenato resultante foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi retirado, aliquotado e armazenado em -80°C . As concentrações de proteína do homogenato foram determinadas pela técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração de hidroperóxido foi determinada pela técnica de Banerjee et al (2002). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi baseada na capacidade da enzima em inibir o superóxido (O_2^-) e, portanto, diminuir a razão de autooxidação do pirogalol (DIETERICH et al., 2007). A atividade da catalase (CAT) foi medida pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante um minuto a um comprimento de onda de 240 nm (AEBI et al, 1994; NELSON; KIESOW, 1972).

2.9 Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As respostas contráteis à fenilefrina foram expressas como porcentagem da resposta máxima induzida por 90 mM KCl, enquanto as respostas vasodilatadoras à acetilcolina foram expressas como porcentagem de relaxamento das artérias pré-contraídas com KCl 60 mM ou com fenilefrina.

O efeito máximo (R_{max}) e a concentração de agonista que produz 50% da resposta máxima ($\log \text{EC}_{50}$) de cada curva de concentração-resposta foram calculados através da análise de regressão não linear (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). As sensibilidades do antagonista foram expressas como pD_2 ($-\log \text{EC}_{50}$). O delta da área sobre a curva (ΔAUC) foi expresso pela diferença entre a contração com inibidor e sem inibidor.

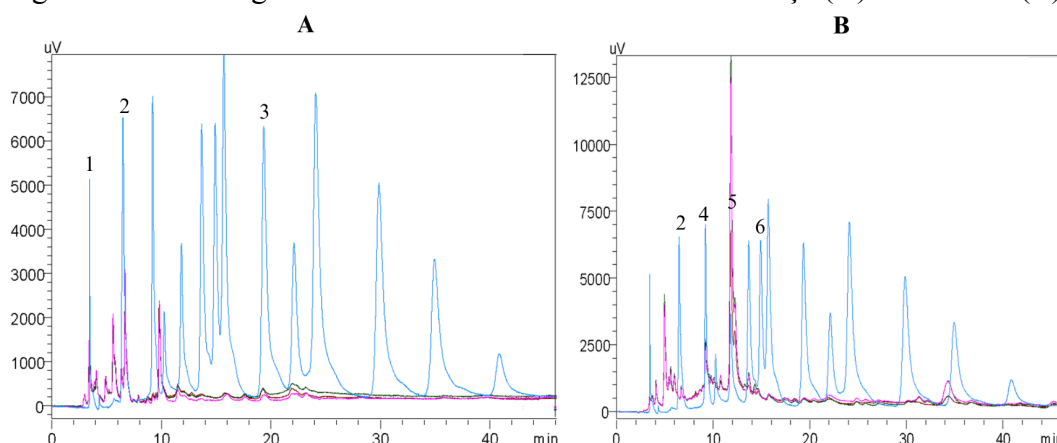
Os dados foram analisados usando a ANOVA *one-way* ou *two-way* seguido pelo teste de Bonferroni, foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise cromatográfica dos compostos fenólicos no extrato de linhaça identificou a presença de trigonelina, ácido gálico e ácido p-cumárico, enquanto no extrato de amoreira foram identificados ácido gálico, teobromina, ácido clorogênico e ácido siríngico (FIGURA 1). Conforme demonstrado na figuras 1, picos de outros compostos foram observados no cromatograma, entretanto, não conseguimos identificá-los pelo fato de não possuímos padrões compatíveis com os demais tempos de retenção.

Figura 1 - Cromatograma de HPLC-DAD do extrato de linhaça (A) e amoreira (B).



Legenda: Azul - curvas padrões; Rosa, verde e vermelho - curvas dos compostos presentes no extrato de linhaça observadas na primeira, segunda e terceira repetição, respectivamente; 1- Trigonelina; 2 - Ácido gálico; 3 - Ácido p-cumárico; 4 - Teobromina; 5 - Ácido clorogênico e 6 - Ácido siríngico.

Fonte: Dos autores (2024).

A quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça e de amoreira são demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de linhaça e amoreira

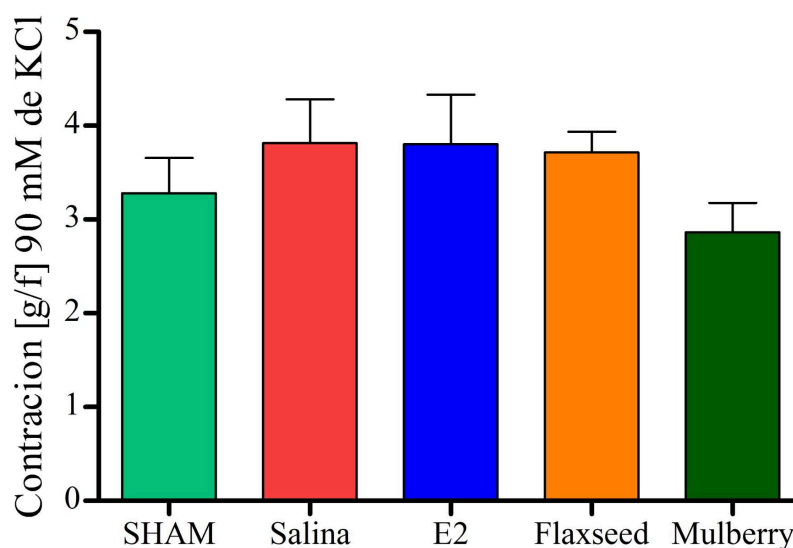
Composto	Extrato de linhaça (mg/L)	Extrato de amoreira (mg/L)
Trigonelina	2,766	-
Ácido gálico	0,591	0,076
Teobromina	-	0,375
Ácido clorogênico	-	4,550
Ácido siríngico	-	0,002
Ácido p-cumárico	0,033	-

Fonte: Do autor (2024).

3.2 Reatividade Vascular

A contração máxima induzida pela administração de solução de Krebs-Henseleit de 90 mM de KCl em anéis aórticos, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos (FIGURA 2).

Figura 2 - Efeito máximo da contração com solução de Krebs-Henseleit de 90 mM de KCl em anéis aórticos dos grupos SHAM, OVX, E2, Flaxseed e Mulberry.

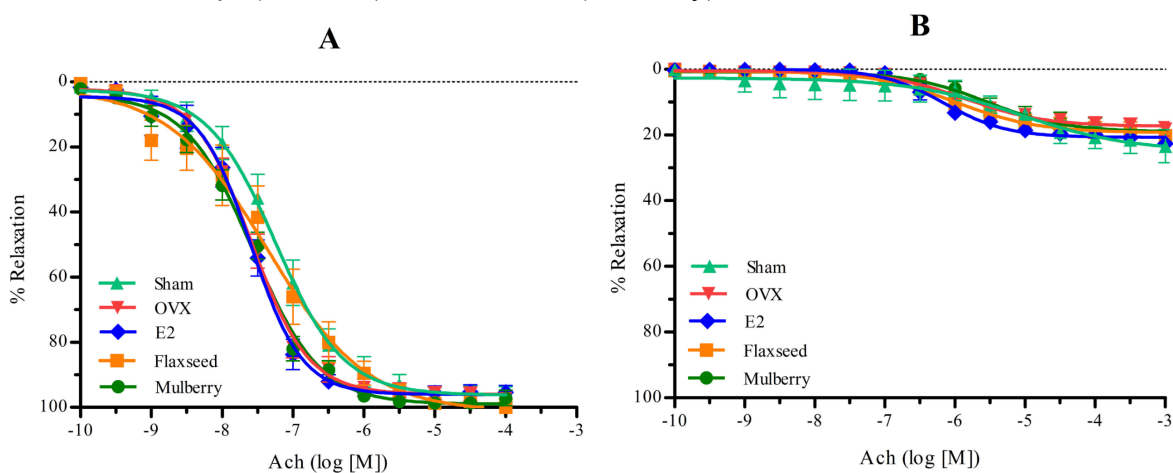


Legenda: Os resultados são expressos como médias \pm SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX por ANOVA de *one-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024)

O relaxamento induzido por acetilcolina (ACh) nos anéis aórticos pré-contraídos com fenilefrina ou com solução de Krebs-Henseleit de 60 mM de KCl, não apresentou alteração entre os grupos (FIGURA 3). Sob estas condições, não foram demonstradas alterações no efeito máximo e no pD_2 das curvas concentração-resposta à acetilcolina nos diferentes grupos estudados (TABELA 2).

Figura 3 - Curva concentração-resposta à Acetilcolina (Ach) em anéis aórticos dos animais em proestro (SHAM), ovariectomizados e tratados com salina (OVX), estrogênio (E₂), ou extratos de linhaça (Flaxseed) e de amoreira (Mulberry).



Legenda: Curvas cumulativas concentração-resposta desencadeada por acetilcolina (10^{-2} - 10^{-7} M) após uma pré-contracção com (A) fenilefrina (10^{-4} M) ou com (B) solução de Krebs-Henseleit de 60 mM de KCl por ANOVA de *two-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

Tabela 2 - Efeitos dos tratamentos no efeito máximo (R_{max}) à acetilcolina e no logaritmo da concentração de acetilcolina resultando em 50% do R_{max} (pD_2) em anéis aórticos após uma pré-contracção com (A) fenilefrina (10^{-4} M) ou com (B) solução de Krebs-Henseleit de 60 mM de KCl (B).

		Sham	OVX	E2	Flaxseed	Mulberry
R_{max}	A	96,32± 1,76	96,42± 2,33	96,67± 2,08	101,63 ± 1,03	98,98 ± 1,53
	B	22,36±4,79	17,52±2,43	20,94±1,40	19,64±2,74	19,43±2,50
pD_2	A	7,28±0,13	7,57 ± 0,09	7,77±0,23	7,67±0,34	7,58±0,06
	B	6,66±1,36	5,90±0,17	6,13±0,15	5,88±0,15	5,50±0,23
AUC	A	319,38±15,78	320,26±24,68	339,77±24,84	344,91±23,07	342,01±17,42
	B	66,72±5,94	51,34±7,22	64,37±4,69	59,93±9,24	51,72±9,78

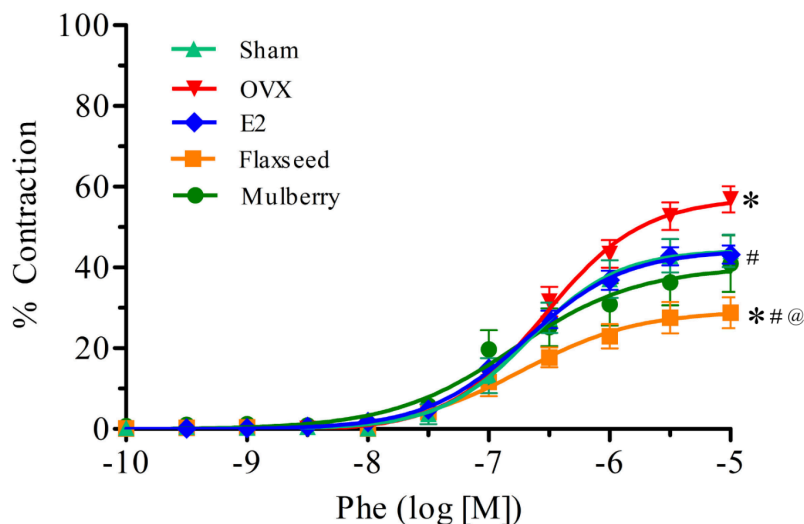
Legenda: Os resultados são expressos como médias ± SEM. por ANOVA de *one-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

Animais deficientes de estrógenos (OVX) demonstraram aumento na contração induzida por fenilefrina em relação aos animais em proestro ($p<0,5$), enquanto os animais tratados com estrogênio ($p<0,01$), extratos de linhaça ($p<0,001$) ou amoreira ($p<0,001$) demonstraram redução na contração induzida por fenilefrina em relação aos animais OVX. Além disso, os animais tratados com extrato de linhaça demonstraram menor contração vascular em relação aos animais em proestro ($p<0,01$), tratados com estrogênio ($p<0,001$) ou

extrato de amoreira ($p < 0,01$) (FIGURA 4). Assim como, o tratamento com linhaça promoveu redução do efeito máximo quando comparado ao grupo OVX ($p < 0,01$) (Tabela 3).

Figura 4 - Curva concentração-resposta à fenilefrina (Phe) em anéis aórticos dos animais em proestro (SHAM), ovariectomizados e tratados com salina (OVX), estrogênio (E_2), ou extratos de linhaça (Flaxseed) e de amoreira (Mulberry).



Legenda: Os resultados são expressos como médias \pm SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; (#) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX; (@) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação aos grupos Mulberry e E_2 por ANOVA de *two-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

Tabela 3 - Efeitos dos tratamentos no efeito máxima R_{max} à fenilefrina e no pD_2 em anéis aórticos após dos grupos SHAM, OVX, E_2 , Flaxseed e Mulberry.

	Sham	OVX	E_2	Flaxseed	Mulberry
R_{max}	43,89 \pm 3,87	58,22 \pm 2,85	44,22 \pm 2,10	27,83 \pm 3,91 *	40,89 \pm 7,03
pD_2	6,67 \pm 0,11	6,50 \pm 0,12	6,70 \pm 0,05	6,85 \pm 0,14	6,54 \pm 0,14
AUC	74,56 \pm 9,76	87,00 \pm 5,419	75,58 \pm 4,72	50,31 \pm 6,65	67,39 \pm 11,84

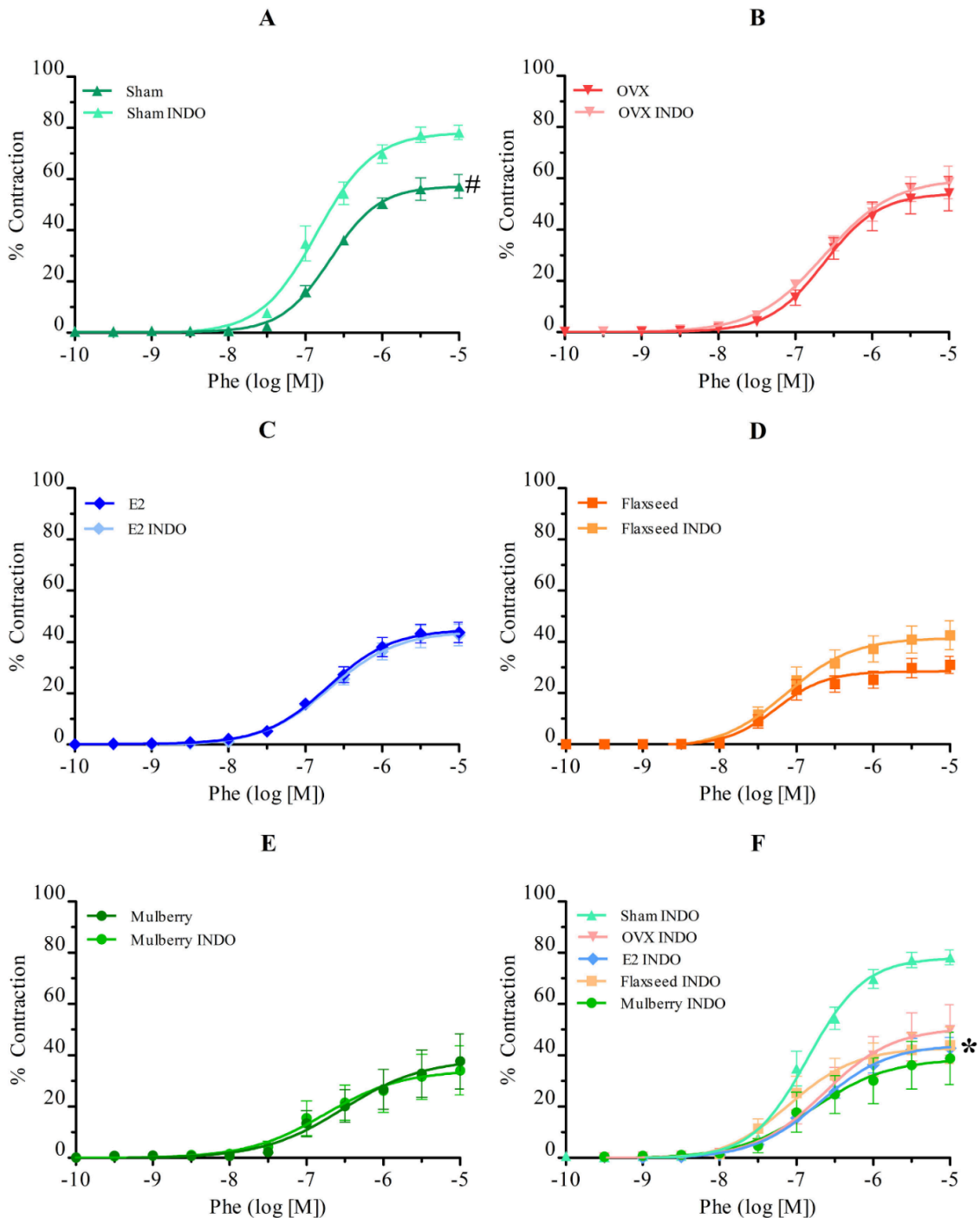
Legenda: Os resultados são expressos como médias \pm SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX por ANOVA de *one-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

Produtos derivados da ciclooxygenases (COX) modulam a vasodilatação e a vasoconstrição (CRESCENTE et al, 2019). A participação dos prostanóides nas respostas contráteis induzidas por fenilefrina foi avaliada após incubação dos anéis aórticos com indometacina, um inibidor não seletivo da COX. O animais em proestro demonstraram maior contração na presença de indometacina em relação aos tratados com estrogênio ($p < 0,001$), linhaça ($p < 0,001$), amoreira ($p < 0,001$) ou OVX ($p < 0,01$) (FIGURA 4). Além disso, após a incubação com indometacina, animais ovx tratados com linhaça apresentaram um efeito

máximo reduzido quando comparados aos animais em proestro (Flaxseed: $42,95 \pm 6,01$; SHAM: $77,99 \pm 2,35$; $p < 0,05$) (TABELA 4).

Figura 4 - Curva concentração-resposta à fenilefrina (Phe) em anéis aórticos pré-incubados com INDO dos animais em proestro (SHAM), ovariectomizados e tratados com salina (OVX), estrogênio (E2), ou extratos de linhaça (Flaxseed) e de amoreira (Mulberry).



Legenda: Os resultados são expressos como médias \pm SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; (#) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a pré-incubação com INDO por ANOVA de *two-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

Tabela 4 - Efeitos dos tratamentos no R_{max} e no pD_2 induzidos por Phe em anéis aórticos pré-incubados com INDO dos grupos SHAM, OVX, E2, Flaxseed e Mulberry.

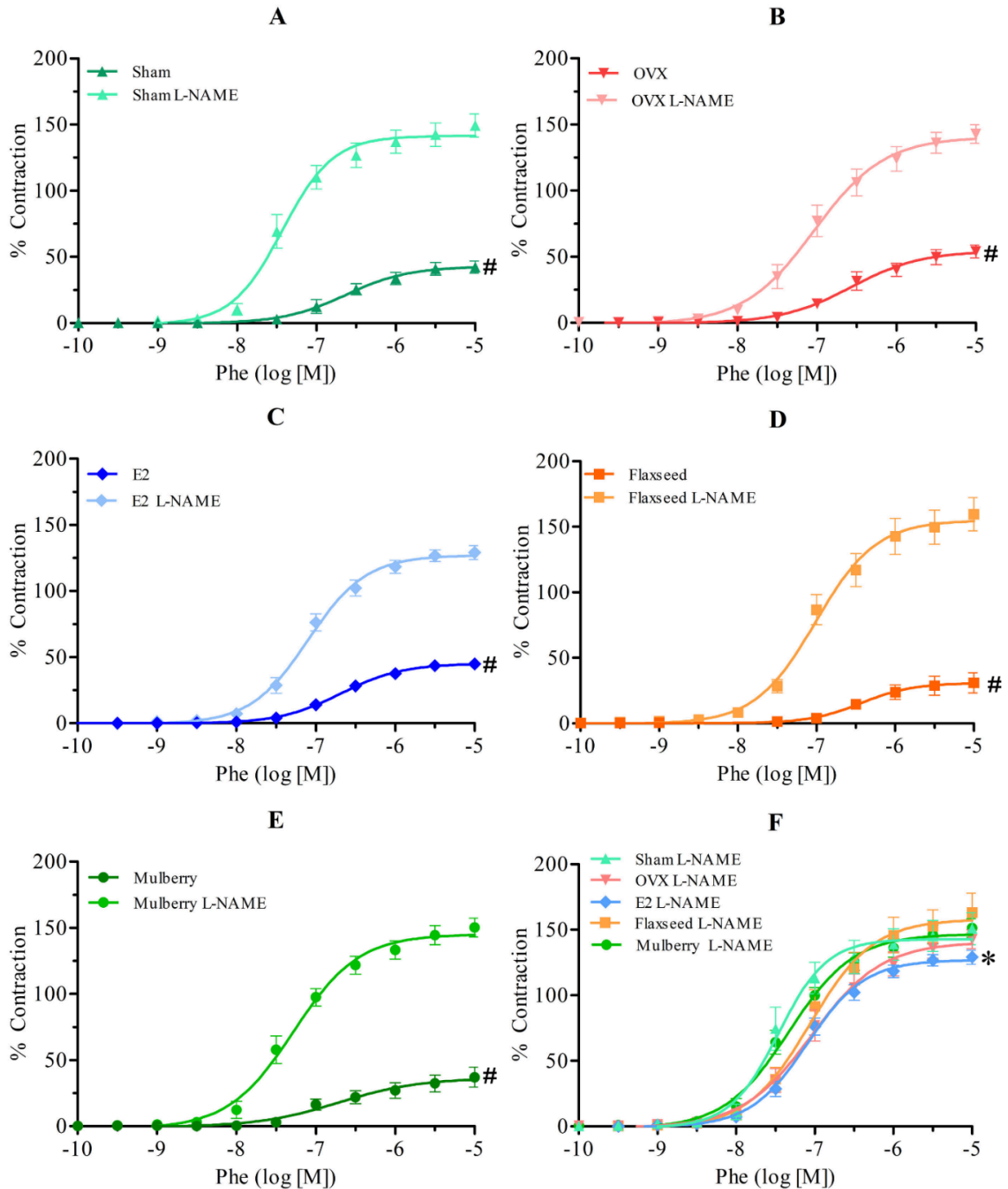
	Sham	OVX	E2	Flaxseed	Mulberry
R_{max}	77,99± 2,35	50,83±10,35	43,82±4,30	42,95± 6,01*	38,05± 9,20
pD_2	6,85±0,10	6,68±0,06	6,72±0,06	7,03±0,18	6,7± 0,15
ΔAUC	46,84±5,01	4,75±4,22*	-3,655±9,20*	22,20±7,28	1,827±4,37*

Legenda: Os resultados são expressos como médias ± SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; por ANOVA de *one-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

A incubação com L-NAME aumentou a contração induzida por fenilefrina em todos os grupos estudados ($p < 0,001$). Os animais suplementados com extrato de linhaça apresentaram maior contração na presença de L-NAME quando comparado com os animais tratados com E_2 , indicando uma maior participação do óxido nítrico (NO) no efeito de diminuição da contração induzida por fenilefrina nos animais tratados com linhaça ($p < 0,05$) (FIGURA 6F). O bloqueio não seletivo da NOS não promoveu diferenças significativas no R_{max} ou no pD_2 dos diferentes grupos (TABELA 5)

Figura 6 - Curva concentração-resposta à fenilefrina (Phe) em anéis aórticos pré-incubados com L-NAME dos animais em proestro (SHAM), ovariectomizados e tratados com salina (OVX), estrogênio (E2), ou extratos de linhaça (Flaxseed) e de amoreira (Mulberry).



Legenda: Os resultados são expressos como médias \pm SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo Flaxseed; (#) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a pré-incubação com L-NAME por ANOVA de *two-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

Tabela 5 - Efeitos dos tratamentos no R_{max} e no pD_2 induzidos por Phe em anéis aórticos pré-incubados com L-NAME dos animais em proestro (SHAM), ovariectomizados e tratados com salina (OVX), estrogênio (E2), ou extratos de linhaça (Flaxseed) e de amoreira (Mulberry).

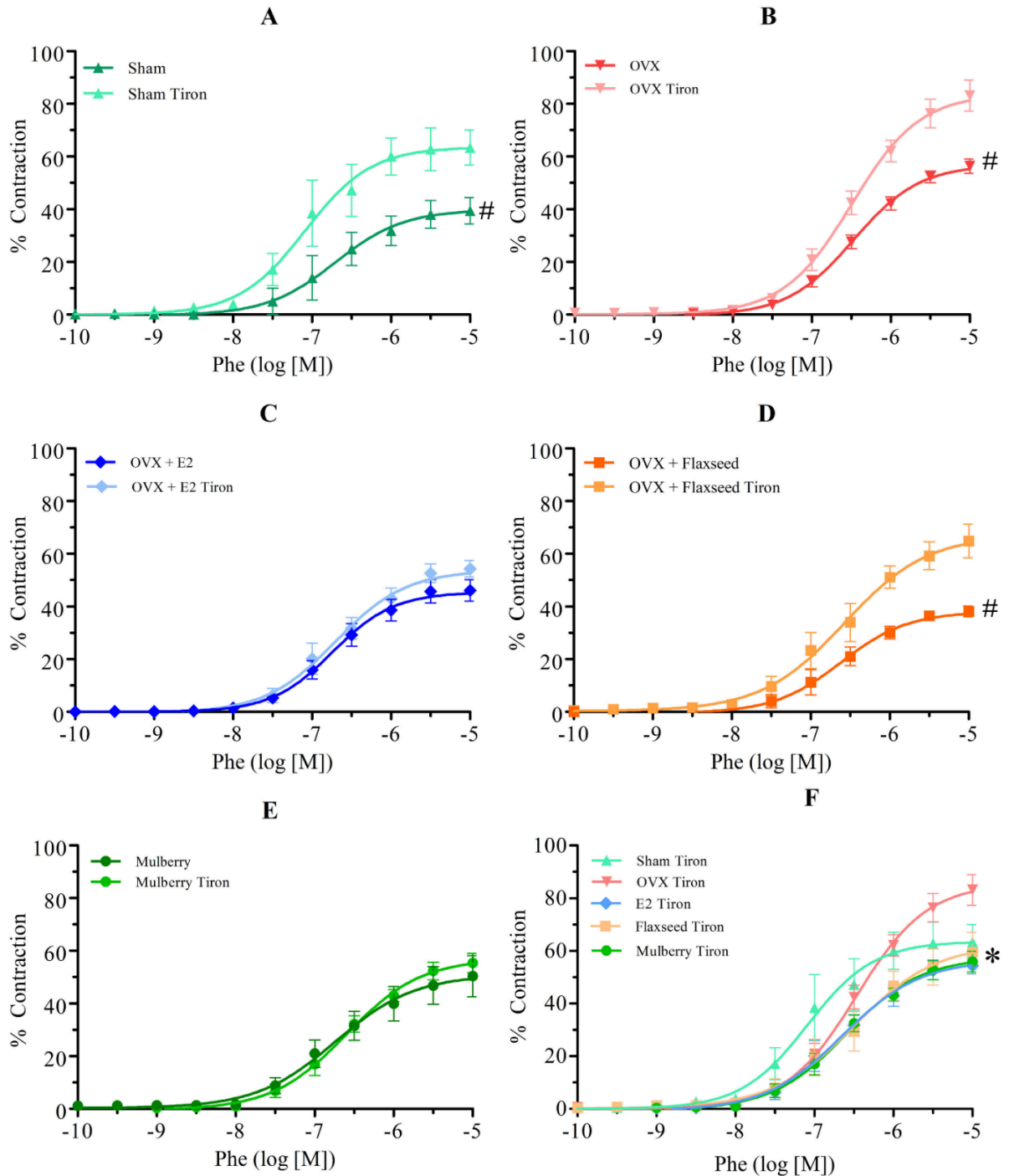
	Sham	OVX	E2	Flaxseed	Mulberry
R_{max}	140,88± 8,92	140,58±6,37	127,28±4,30	154,83± 12,57	143,94± 7,82
pD_2	7,43±0,09	7,00±0,11	7,09±0,07	7,02±0,08	7,30± 0,08
ΔAUC	268,95±36,36	197,12±27,60	187,84±9,28	264,52±25,52	263,18±22,50

Legenda: Os resultados são expressos como médias \pm SEM por ANOVA de *one-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

A incubação com Tiron, um conversor de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, aumentou a contração induzida por fenilefrina nos animais em proestro ($p<0,05$), OVX ($p<0,001$) e tratados com linhaça ($p<0,001$) (FIGURA 7). Os animais tratados com E_2 ($p<0,01$), linhaça ($p<0,05$) ou amoreira ($p<0,01$) apresentaram resposta máxima reduzida quando comparados ao grupo OVX (TABELA 6). Estes achados sugerem que o tratamento com E_2 e a suplementação com os extratos estudados preveniu o aumento da contração desencadeada pelo peróxido de hidrogênio, assim como a suplementação com linhaça reduziu a resposta máxima desencadeada pela ação do peróxido de hidrogênio.

Figura 7 - Curva concentração-resposta à fenilefrina (Phe) em anéis aórticos pré-incubados com Tiron dos animais em proestro (SHAM), ovariectomizados e tratados com salina (OVX), estrogênio (E2), ou extratos de linhaça (Flaxseed) e de amoreira (Mulberry).



Legenda: Os resultados são expressos como médias \pm SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX; (#) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a pré-incubação com Tiron por ANOVA de *two-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

Tabela 6 - Efeitos dos tratamentos no R_{max} e no pD_2 induzidos por Phe em anéis aórticos pré-incubados com TIRON dos animais em proestro (SHAM), ovariectomizados e tratados com salina (OVX), estrogênio (E2), ou extratos de linhaça (Flaxseed) e de amoreira (Mulberry).

	Sham	OVX	E2	Flaxseed	Mulberry
R_{max}	63,14± 6,32	84,65±10,35	55,50±2,80*	57,91± 7,48*	56,29± 4,45*
pD_2	7,03±0,22	6,50±0,09	6,65±0,12	6,62±0,18	6,68± 0,15
ΔAUC	66,21±12,12	42,04±10,30	11,63±8,71	45,64±10,79	0,76±15,56#

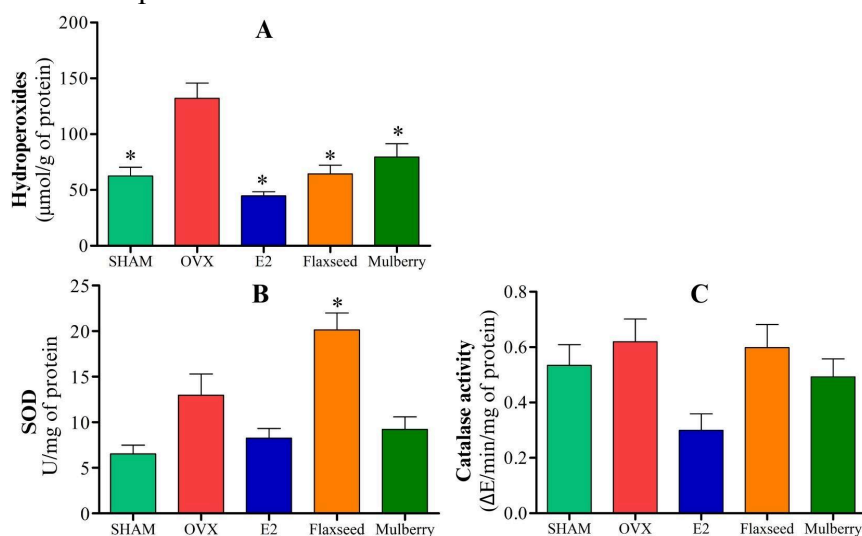
Legenda: Os resultados são expressos como médias ± SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX; (#) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM por ANOVA de *one-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024).

3.3 Estresse oxidativo

A produção de hidroperóxidos (H_2O_2) foi maior nas aortas dos animais deficientes de estrogênio, assim como a reposição de estrogênio e a suplementação com extratos estudados foram capazes de restaurar as concentrações de H_2O_2 de forma semelhante aos animais em proestro (FIGURA 8A). A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) também foi analisada, e os animais tratados com linhaça apresentaram maior ação da SOD quando comparado aos outros grupos estudados (FIGURA 8B), enquanto não houve diferenças significativas na ação da CAT entre os grupos (FIGURA 8C).

Figura 8 - Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e concentração de hidroperóxido nas artérias aorta torácicas.



Legenda: Os resultados são expressos como médias ± SEM. (*) diferença significativa para $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX por ANOVA de *one-way* seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dos autores (2024)

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a cromatografia líquida de alta eficiência revelou a presença de trigonelina, ácido gálico e ácido p-cumárico no extrato de linhaça, enquanto no extrato de amoreira foi demonstrado a presença de ácido gálico, teobromina, ácido clorogênico e ácido siríngico (FIGURA 1). Em células H9c2 derivadas do tecido cardíaco embrionário de rato, por exemplo, a trigonelina promoveu proteção contra o estresse oxidativo e apoptose induzido por H₂O₂ (ILAVENIL et al, 2015). Assim como, Omidi-Ardali e colaboradores (2019) demonstraram que o tratamento com trigonelina aumentou a capacidade antioxidante, reduziu a peroxidação lipídica, atenuou danos epiteliais e infiltração de células inflamatórias no cólon e no coração de camundongos machos com colite induzida por sulfato de dextrano sódico (OMIDI-ARDALI et al, 2019).

Em roedores fêmeas, a deficiência estrogênica promove aumento da expressão de enzimas do complexo NADPH oxidase (NOX), enzimas capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), e a redução na síntese da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (JUNIOR et al, 2017; WANG et al, 2012). Em camundongos machos tratados com angiotensina II, a suplementação com ácido gálico promoveu redução da pressão arterial e do RNA mensageiro (RNAm) para NOX4, e aumento da expressão de eNOS e liberação de óxido nítrico (NO), restaurando a vasodilatação induzida por acetilcolina (YAN et al, 2020). Assim como, foi demonstrado que a suplementação com ácido gálico reduziu a hipertrofia cardíaca e restaurou as concentrações de superóxido dismutase (SOD) nos corações de ratos machos com hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol (SHACKEBAEI et al, 2022).

O ácido p-cumárico é um polifenol que possui várias aplicações medicinais que são associadas a efeitos cardioprotetores (ABDEL-WAHAB et al, 2003; PRASANNA; RASOOL, 2014). A suplementação com ácido p-cumárico promoveu redução da expressão de mRNA para citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa e a interleucina 1 beta) e redução do estresse oxidativo no coração de ratos (ABDEL-WAHAB et al, 2003, PRASANNA; RASOOL, 2014).

A suplementação com ácido clorogênico em ratos tratados com dieta rica em gordura e carboidratos reduziu a ingestão alimentar e a gordura retroperitoneal, além de restaurar a pressão arterial sistólica, a deposição de colágeno e infiltração de células inflamatórias no ventrículo esquerdo (BHANDARKAR; BROWN; PANCHAL, 2019). O tratamento com ácido gálico reduziu o tamanho do infarto, a lesão e fibrose miocárdica, reduziu fatores inflamatórios (interleucinas 1 β e 6, fator de necrose tumoral alfa e interferon- γ), aumentou

citocinas anti-inflamatórias (interleucinas 10 e 4) e a atividade de enzimas antioxidantes (SOD e catalase) em ratos com infarto do miocárdio induzido (WANG et al, 2020).

Em camundongos machos, por exemplo, a suplementação com ácido siríngico reduziu a pressão arterial, a peroxidação lipídica, e aumentou expressão de NO e de enzimas antioxidantes (SOD, catalase e glutathione peroxidase) em modelo de hipertensão induzido pela administração de L-NAME (KUMAR; PRAHALATHAN; RAJA, 2012). Huang e colaboradores (2021) demonstraram que o tratamento com ácido siríngico aumenta o relaxamento de artérias aortas de ratos (HUANG et al, 2021). Portanto, os estudos sugerem que os fitoquímicos encontrados nos extratos de linhaça e amoreira possuem efeitos promissores na prevenção da disfunção endotelial desencadeada pela deficiência de estrogênio por meio da modulação da via da NOS, da inflamação e da proteção contra danos oxidativos.

Com intuito de verificar a reatividade vascular dos diferentes grupos estudados, a aorta torácica foi retirada e analisada. Os resultados deste estudo demonstraram que a deficiência estrogênica aumenta a vasoconstrição da artéria aorta torácica induzida por fenilefrina, porém não altera o relaxamento vascular induzido por acetilcolina (Ach) em artérias pré-contraídas com fenilefrina ou solução de Krebs-Henseleit de 60 mM de KCl. Além disso, a falta de estrógeno no organismo promoveu aumento da produção de radicais livres na aorta torácica desses animais.

Os estrogênios possuem ações importantes sobre o endotélio e as células musculares lisas, protegendo-os por meio do aumento da expressão de prostaciclina, da liberação de óxido nítrico (NO) e da proteção contra danos oxidativos (SHI; LEUNG, 2020; JUNIOR et al, 2017). Pesquisas pré-clínicas em modelo animal relacionam a deficiência ou a baixa ação estrogênica com o desenvolvimento de disfunção endotelial por meio da modulação da via das ciclooxigenases (COX) e da formação de espécies reativas ao oxigênio (BIANCHI et al, 2006; SHI; LEUNG, 2020). Os resultados do presente estudo corroboram com dados de Junior e colaboradores (2017) que demonstraram que o tratamento com estrogênio previne o aumento excessivo da vasoconstrição induzida por fenilefrina em ratas Wistar ovariectomizadas (JUNIOR et al, 2017). Da mesma forma, a suplementação com extrato de linhaça ou amoreira foram capazes de prevenir o aumento da resposta vascular contrátil induzida por fenilefrina nos anéis da artéria aorta torácica de ratas ovariectomizadas. Ademais, os presentes dados demonstram que os animais suplementados com extrato de linhaça demonstraram menor contração vascular em relação aos outros grupos, demonstrando

o maior efeito dessa suplementação sobre a reatividade vascular de animais com deficiência estrogênica.

Tarhan e colaboradores (2021) observaram que o tratamento com semente de linhaça foi capaz de prevenir o aumento da resposta vascular contrátil induzida por fenilefrina na artéria aorta torácica de ratas Wistar com diabetes, induzido por estreptozotocina, por meio de vias dependentes de prostaglandinas e óxido nítrico (TARHAN et al, 2021). Da mesma forma, a pré-incubação da artéria aorta de ratos machos com suco de amora preta por 10 minutos demonstrou um efeito protetor, prevenindo o aumento excessivo da vasoconstrição induzida por noradrenalina após a exposição a peroxinitrito por 30 minutos (SERRAINO et al, 2003). Embora estes estudos tenham evidenciado os efeitos vasoprotetores da semente de linhaça e do fruto de amoreira em modelos e/ou vias diferentes dos analisados no presente estudo, esses dados reforçam o potencial efeito benéfico dessas substâncias na função vascular de ratos.

Na busca por possíveis intermediadores das ações estrogênicas e dos extratos sobre a reatividade vascular, foram utilizados alguns inibidores com o objetivo de verificar uma possível influência daquela via específica sobre as contrações vasculares observadas nos diferentes grupos. A via das ciclooxigenases modula a contração vascular por meio da síntese de prostaglandinas, que exercem potentes efeitos sobre o tônus vascular, influenciando a contração das células musculares lisas (CRESCENTE et al, 2019). Assim, foi demonstrado que a contração vascular não depende da via das ciclooxigenases (COX) nos grupos dos animais ovariectomizados, enquanto a contração vascular dos animais em proestro aumentou na inibição não seletiva da via das COX por Indometacina (INDO). Bianchi e colaboradores (2006) observaram que a incubação de anéis aórticos com INDO não foi capaz de alterar a resposta contrátil à fenilefrina de ratas Wistar intactas e ovx. Entretanto, esse estudo não avaliou a fase do ciclo estral dos animais, diferente dos dados do presente estudo que realizou testes de reatividade vascular de animais na fase de proestro, fase essa marcada por concentrações elevadas de estrogênio (AJAYI; AKHIGBE, 2020). Os estrogênios promovem o aumento da síntese do vasodilatador prostaciclina, via receptor $ER\alpha$, de forma dependente da COX-2 (PGI₂) que, por meio do receptor prostanoide I, reduz a agregação plaquetária e o estresse oxidativo (EGAN et al, 2004). Além disso, baixas concentrações de estrogênio promovem redução da expressão de $ER\alpha$ nas células endoteliais (GAVIN et al, 2009; PINNA et al, 2008). Estes achados sugerem que a contração vascular aumentada observada nos animais em proestro após administração de INDO pode ter sido influenciada pelo bloqueio da ação de prostaciclina na presença de altas concentrações de estrogênios. Por outro lado, o fato dos animais tratados com estrogênio não demonstrarem também aumento da contração

quando administrado INDO no banho vascular, pode ser justificado pela baixa quantidade de estradiol administrada (RAMÍREZ-HERNÁNDEZ et al, 2024).

Para investigar o papel do NO na prevenção do aumento da vasoconstrição induzida por fenilefrina, as artérias foram incubadas com um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS; L-NAME). A NOS é um grupo de enzimas, formado pelas isoformas neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial (eNOS), que catalisam a síntese de NO e podem ser moduladas por ações estrogênicas (GOSHI; ZHOU; HE, 2019). O NO exerce inúmeras funções fisiológicas incluindo redução da pressão arterial por meio da modulação da vasodilatação arterial (GOSHI; ZHOU; HE, 2019; TENOPOULOU; DOULIAS, 2020). Os resultados do presente estudo demonstram que a inibição não seletiva da NOS foi capaz de aumentar a resposta contrátil induzida por fenilefrina em todos os grupos, sugerindo a participação do NO na resposta vascular contrátil dos animais independente do tratamento. Entretanto, pode ser observado que os animais suplementados com extrato de linhaça apresentam maior contração na presença de L-NAME quando comparado com os animais tratados com E₂, sugerindo uma maior participação do óxido nítrico na redução da contração induzida por fenilefrina no grupo suplementado com linhaça.

As espécies reativas de oxigênio (como por exemplo, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), embora sejam importantes moléculas sinalizadoras, em excesso podem promover danos oxidativos nas células musculares lisas, comprometendo a biodisponibilidade de NO e promovendo a vasoconstrição (SABBATINI; KARARIGAS, 2020; WANI; KHAN; BASIR, 2020). A participação de espécies reativas ao oxigênio na contração vascular induzida por fenilefrina foi verificada após a incubação dos anéis aórticos com Tiron. San Wong; Roberts e Randall (2015) observaram que a administração de Tiron na solução de Krebs-Henseleit com 95% de oxigênio promove a conversão do ânion superóxido (O₂⁻) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (PARK et al, 2019). O uso de H₂O₂ no teste de reatividade vascular é associado com o aumento da resposta vascular contrátil induzida por fenilefrina em ratos (PARK et al, 2019). No presente estudo, foi observado que a contração vascular induzida por fenilefrina aumentou nos animais em proestro, ou tratados com E₂ ou com linhaça. Assim como, foi observado uma resposta máxima (R_{máx}) de contração menor na aorta torácica dos animais tratados com E₂, amoreira ou linhaça quando comparados ao grupo OVX. Estes achados sugerem que a ação antioxidantes, assim como a presença de fitoquímicos no extrato de linhaça, foram capazes de reduzir a contração da aorta torácica de animais com deficiência estrogênica, possivelmente modulando respostas vasculares desencadeadas pelo H₂O₂, semelhante ao observado nos

animais em proestro. A administração de Tiron na câmara de órgãos não promoveu alterações significativas na resposta vascular dos animais tratados com estradiol ou amoreira.

As enzimas antioxidantes, como por exemplo superóxido dismutase (SOD) e catalase, atuam impedindo danos oxidativos às células (HALLIWELL, 2011; SABBATINI; KARARIGAS, 2020). A SOD atua convertendo o ânion superóxido em H_2O_2 e oxigênio, enquanto a catalase quebra o H_2O_2 em oxigênio e água (SULLIVAN; SASSER; POLLOCK, 2007). A desregulação da atividade das enzimas antioxidantes ou a produção de espécies reativas ao oxigênio acima da capacidade antioxidante do organismo pode levar ao estresse oxidativo e a disfunção endotelial (HALLIWELL, 2011). Assim, com intuito de verificar uma possível influência da modulação dessas enzimas e de produção de espécies reativas ao oxigênio nas artérias aorta torácica dos animais estudados, foi investigado a concentração de SOD, catalase e peróxido de hidrogênio nessas artérias. Os resultados corroboram com achados anteriores que associam a deficiência estrogênica com o aumento da produção de H_2O_2 em ratas (SULLIVAN; SASSER; POLLOCK, 2007). Além disso, foi observado que a suplementação com extrato de linhaça ou amoreira reduz o aumento da produção de H_2O_2 desencadeado pela deficiência estrogênica. Outro dado importante observado foi o aumento da atividade da SOD na aorta torácica dos animais suplementados com extrato de linhaça, o que pode ter sido um fator potencializador dos efeitos observados na resposta da reatividade vascular desses animais. Embora não exista literatura sobre os efeitos dos extratos de linhaça ou amoreira nas concentrações de H_2O_2 , SOD e Catalase na aorta de roedores, pesquisas anteriores demonstram que esses extratos podem aumentar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e Catalase no fígado de ratos com diabetes (ABOUZED et al 2020; AL ZA'ABI; ALI; ALI, 2021; REN et al, 2015), reforçando os efeitos benéficos dos extratos na redução do estresse oxidativo.

5 Conclusão

Os resultados sugerem que os extratos estudados possuem compostos fenólicos com potencial de promover modulações sobre o sistema vascular. A suplementação com esses extratos em animais com deficiência estrogênica demonstrou redução na contração vascular induzida por fenilefrina, sendo a suplementação com extrato de linhaça com maior efeito. Essa maior ação da linhaça possivelmente está relacionada à modulação da via da NOS, redução da concentração de H_2O_2 e maior atividade da SOD, sugerindo um mecanismo antioxidante e vasodilatador. Já os benefícios da amoreira provavelmente são atribuídos à sua

ação antioxidante, demonstrado pela redução da resposta máxima após a incubação com Tiron e pela redução da concentração de H_2O_2 na artéria aorta, sugerindo a ação desse extrato potencializando enzimas antioxidantes que neutralizam esse radical livre. Assim, os dados sugerem que a suplementação com extratos de linhaça ou amoreira apresentam efeitos promissores na prevenção de alterações vasculares associadas à deficiência estrogênica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, M. H. et al. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 5, p. 461-465, 2003.
- ABOUZED, Tarek Kamal et al. Black mulberry fruit extract alleviates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: targeting TNF- α inflammatory pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1615-1628, 2020.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.
- AJAYI, Ayodeji Folorunsho; AKHIGBE, Roland Eghoghosoa. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. **Fertility research and practice**, v. 6, n. 1, p. 1 - 15, 2020.
- AL ZA'ABI, Mohammed; ALI, Haytham; ALI, Badreldin H. Effect of flaxseed on systemic inflammation and oxidative stress in diabetic rats with or without chronic kidney disease. **Plos one**, v. 16, n. 10, p. e0258800, 2021.
- BANERJEE, Dibyajyoti et al. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. **Current Science**, v. 83, n. 10, p. 1193-1194, 2002.
- BIANCHI, Patrícia Rocon et al. Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. **Life sciences**, v. 78, n. 8, p. 875-881, 2006.
- BLASZCZUK, Agata et al. Role of phytoestrogen-rich bioactive substances (*Linum usitatissimum* L., *Glycine max* L., *Trifolium pratense* L.) in cardiovascular disease prevention in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 14, n. 12, p. 2467, 2022.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, Viviane AVN et al. Aerobic exercise training prevents the onset of endothelial dysfunction via increased nitric oxide bioavailability and reduced reactive oxygen species in an experimental model of menopause. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0125388, 2015.
- BHANDARKAR, Nikhil S.; BROWN, Lindsay; PANCHAL, Sunil K. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. **Nutrition research**, v. 62, p. 78-88, 2019.
- CARTER, Andrea E.; MERRIAM, Sarah. Menopause. **Medical Clinics of North American**, v. 107, n. 2, p. 199-212, 2023.
- COSTA, Joyce PL et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of *Morus nigra* L.(black mulberry) leaf powder on symptoms and quality of life among climacteric women. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 148, n. 2, p. 243-252, 2020.

CRESCENTE, Marilena et al. Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 8, p. 988-999, 2019.

DIETERICH, Daniela C. et al. Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. **Nature protocols**, v. 2, n. 3, p. 532-540, 2007.

DO, Sun Hee et al. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. **Menopausa**, v. 15, n. 4, p. 676-683, 2008.

EGAN, Karine M. et al. COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. **Science**, v. 306, n. 5703, p. 1954-1957, 2004.

EL KHOUDARY, Samar R.; NASR, Alexis. Cardiovascular disease in women: does menopause matter?. **Current opinion in endocrine and metabolic research**, v. 27, p. 100419, 2022.

FAUBION, Stephanie S. et al. The 2022 hormone therapy position statement of the North American Menopause Society. **Menopause**, v. 29, n. 7, p. 767-794, 2022.

FULTON, Clifford T.; STALLONE, John N. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium and ovarian steroids. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 5, p. H2062-H2073, 2002.

GALVÃO, Elisângela Lopes et al. Evaluation of the antioxidant potential and sub-critical extraction of linseed oil. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 551-557, 2008.

GAVIN, Kathleen M. et al. Vascular endothelial estrogen receptor α is modulated by estrogen status and related to endothelial function and endothelial nitric oxide synthase in healthy women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3513-3520, 2009.

GHAZANFARPOUR, Masumeh et al. Effects of flaxseed and *Hypericum perforatum* on hot flash, vaginal atrophy and estrogen-dependent cancers in menopausal women: a systematic review and meta-analysis. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 6, n. 3, p. 273, 2016.

GOSHI, Ekta; ZHOU, Gaoxin; HE, Qianjun. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. **Medical gas research**, v. 9, n. 4, p. 192, 2019.

GEORGIEVA, Antoaneta et al. Behavioral effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in a rat model of ovariectomy-induced estrogen deficit. **Folia Medica**, v. 64, n. 6, p. 975-981, 2022.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants—quo vadis?. **Trends in pharmacological sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HUANG, Yunke et al. Ex vivo to in vivo extrapolation of syringic acid and ferulic acid as grape juice proxies for endothelium-dependent vasodilation: Redefining vasoprotective resveratrol of the French paradox. **Food Chemistry**, v. 363, p. 130323, 2021.

ILAVENIL, Soundharrajan et al. Trigonelline protects the cardiocyte from hydrogen peroxide induced apoptosis in H9c2 cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 4, p. 263-268, 2015.

JAIMES, Luisauris et al. A review of the actions of endogenous and exogenous vasoactive substances during the estrous cycle and pregnancy in rats. **Animals**, v. 9, n. 6, p. 288, 2019.

JUNIOR, Rogério Faustino Ribeiro et al. Vascular activation of K⁺ channels and Na⁺-K⁺ ATPase activity of estrogen-deficient female rats. **Vascular pharmacology**, v. 99, p. 23-33, 2017.

KUMAR, Subramanian; PRAHALATHAN, Pichavaram; RAJA, Boobalan. Syringic acid ameliorates L-NAME-induced hypertension by reducing oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, p. 1175-1184, 2012.

LEE, Emma et al. Vasomotor symptoms of menopause, autonomic dysfunction, and cardiovascular disease. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 323, n. 6, p. H1270-H1280, 2022.

LEI, Zili et al. Ovariectomy impaired hepatic glucose and lipid homeostasis and altered the gut microbiota in mice with different diets. *Frontiers in endocrinology*, v. 12, p. 708838, 2021.

MENG, F. U. et al. Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts in vitro. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 2, p. 129-134, 2012.

MORAIS, Ilmara Cecilia Pinheiro de Silva et al. Cardiovascular effect of diosgenin in ovariectomized rats. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 3, p. 248-256, 2019.

NELSON, Dennis P.; KIESOW, Lutz A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

O'NEILL, Sheila; EDEN, John. The pathophysiology of menopausal symptoms. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 22, n. 3, p. 63-69, 2012.

OLIVEIRA, Phablo Wendell C. et al. Effects of drugs, phytoestrogens, nutrients and probiotics on endothelial dysfunction in the estrogen-deficient state. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 30, p. 3711-3722, 2020a.

OLIVEIRA, Priscila Ramos de et al. Exercise training attenuates angiotensin II-induced vasoconstriction in the aorta of normotensive but not hypertensive rats. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 4, p. 732-742, 2020b.

OMIDI-ARDALI, Hossein et al. Inflammatory responses bridge comorbid cardiac disorder in experimental model of IBD induced by DSS: protective effect of the trigonelline. **Inflammopharmacology**, v. 27, p. 1265-1273, 2019.

PAKDEL, Farzad. The Role of Estrogen Receptors in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11354, 2023.

PARK, Hyun Ji et al. Hydrogen peroxide constricts rat arteries by activating Na⁺-permeable and Ca²⁺-permeable cation channels. **Free Radical Research**, v. 53, n. 1, p. 94-103, 2019.

PETRINE, Jéssica Castro et al. Beneficial Effects of Flaxseed and/or Mulberry Extracts Supplementation in Ovariectomized Wistar Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 15, p. 3238, 2022.

PINNA, Christian et al. Prolonged ovarian hormone deprivation impairs the protective vascular actions of estrogen receptor α agonists. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 1210-1217, 2008.

PRASANNA, Nagalakshmi; RASOOL, Mahaboobkhan. Modulation of gene-expression profiles associated with sodium arsenite-induced cardiotoxicity by p-coumaric acid, a common dietary polyphenol. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 174-180, 2014.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, Diana et al. Timing matters: Effects of early and late estrogen replacement therapy on glucose metabolism and vascular reactivity in ovariectomized aged wistar rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 2023, p. 6683989, 2023.

REN, Chunjiu et al. A polysaccharide extract of mulberry leaf ameliorates hepatic glucose metabolism and insulin signaling in rats with type 2 diabetes induced by high fat-diet and streptozotocin. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 951-959, 2015.

ROSSI, Rosario et al. Prognostic role of flow-mediated dilation and cardiac risk factors in post-menopausal women. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 10, p. 997-1002, 2008.

ROSSOUW, Jacques E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **Jama**, v. 288, n. 3, p. 321-333, 2002.

SABBATINI, Andrea Rodrigues; KARARIGAS, Georgios. Estrogen-related mechanisms in sex differences of hypertension and target organ damage. **Biology of sex differences**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2020

SALPETER, Shelley R. et al. Bayesian meta-analysis of hormone therapy and mortality in younger postmenopausal women. **The American journal of medicine**, v. 122, n. 11, p. 1016-1022. e1, 2009.

SAN WONG, Pui; ROBERTS, Richard E.; RANDALL, Michael D. Hyperoxic gassing with Tiron enhances bradykinin-induced endothelium-dependent and EDH-type relaxation through generation of hydrogen peroxide. **Pharmacological Research**, v. 91, p. 29-35, 2015.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, Lorena et al. A systematic review of the cardiometabolic benefits of plant products containing mixed phenolics and polyphenols in postmenopausal women: insufficient evidence for recommendations to this specific population. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4276, 2021.

- SANTORO, Nanette et al. The menopause transition: signs, symptoms, and management options. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 106, n. 1, p. 1-15, 2021.
- SAWANT, Sameer H.; BODHANKAR, Subhash L. Flax lignan concentrate reverses alterations in blood pressure, left ventricular functions, lipid profile and antioxidant status in DOCA-salt induced renal hypertension in rats. **Renal Failure**, v. 38, n. 3, p. 411-423, 2016.
- SERRAINO, Ivana et al. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **Life sciences**, v. 73, n. 9, p. 1097-1114, 2003.
- SHACKEBAEI, Dareuosh et al. Gallic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 41, 2022.
- SHAITO, Abdullah et al. Herbal medicine for cardiovascular diseases: efficacy, mechanisms, and safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 422, 2020.
- SHI, Yi; LEUNG, Susan Wai Sum. Long-term nitric oxide synthase inhibition prevents 17 β -estradiol-induced suppression of cyclooxygenase-dependent contractions and enhancement of endothelium-dependent hyperpolarization-like relaxation in mesenteric arteries of ovariectomized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 882, 2020.
- SMITH, Carolyn L.; O'MALLEY, Bert W. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 1, p. 45-71, 2004.
- SULLIVAN, Jennifer C.; SASSER, Jennifer M.; POLLOCK, Jennifer S. Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 2, p. R764-R768, 2007.
- TENOPOULOU, Margarita; DOULIAS, Paschalis-Thomas. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Research**, v. 9, 2020.
- TARHAN, Nilay et al. Effects of flaxseed intake on vascular contractile function in diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)**, v. 59, n. 06, p. 398-405, 2021.
- VIDAL-GÓMEZ, Xavier et al. Decreased bioavailability of nitric oxide in aorta from ovariectomized senescent mice. Role of cyclooxygenase. **Experimental Gerontology**, v. 76, p. 1-8, 2016.
- VILELA, Márcio Gomes; JÚNIOR, J. L. S.; SILVA, JG de C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.
- WANG, Di et al. Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, p. 110773, 2020.

WANG, Hao et al. Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodelling in oophorectomized mRen2. Lewis rats. **Cardiovascular research**, v. 94, n. 1, p. 96-104, 2012.

WANI, Shahnawaz Ahmad; KHAN, Luqman Ahmad; BASIR, Seemi Farhat. Cobalt-Induced Hypercontraction is Mediated by Generation of Reactive Oxygen Species and Influx of Calcium in Isolated Rat Aorta. **Biological trace element research**, v. 196, p. 110-118, 2020.

YAN, Xiao et al. Gallic acid attenuates angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction by inhibiting the degradation of endothelial nitric oxide synthase. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1121, 2020.

YU, Zhuo et al. Level of Estrogen in Females—The Different Impacts at Different Life Stages. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1995, 2022.

ZHU, Jing et al. Role of estrogen in the regulation of central and peripheral energy homeostasis: from a menopausal perspective. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, p. 20420188231199359, 2023.

ANEXO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras – MG – 37200-000 – (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

ATESTADO DE APROVAÇÃO PROVISÓRIO

(o certificado definitivo será concedido após o cumprimento de todos os critérios exigidos pela Orientação Técnica nº 5, de 27 de abril de 2015, do CONCEA/MCTI)

Atestamos que a proposta intitulada "Possíveis efeitos estrogênicos da suplementação com linhaça e/ou extrato da folha de amora sobre o organismo de ratas ovariectomizadas", protocolo nº 071/19, sob a responsabilidade de Bruno Del Bianco Borges, Larissa Sampaio Jacques, Tayná Márcia da Cruz Santos e Weuller Aisler Moreira Teixeira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 20/08/2020, podendo ser iniciada a realização da sua parte experimental.

Vigência da autorização: de 01/10/2020 a 01/10/2025

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Rato heterogênico / Wistar

Número de animais aprovados: 100

Peso/idade: 180 g / 60 dias

Sexo: fêmea

Origem dos animais: aguardando documentação

Lavras, 21 de agosto de 2020.



Prof. Rafael Neodine Remedio

Presidente Interina da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 – Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br