



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**EFEITO DO FITOESTRÓGENO DIOSGENINA SOBRE A FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR EM MODELO DE MENOPAUSA INDUZIDA POR
OVARIECTOMIA**

ILMARA CECÍLIA PINHEIRO DA SILVA MORAIS

**TERESINA
2015**

ILMARA CECÍLIA PINHEIRO DA SILVA MORAIS

**EFEITO DO FITOESTRÓGENO DIOSGENINA SOB A FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR EM MODELO DE MENOPAUSA INDUZIDA POR
OVARIECTOMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciência da Saúde, Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira

TERESINA - PI
2015

**EFEITO DO FITOESTRÓGENO DIOSGENINA SOB A FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR EM MODELO DE MENOPAUSA INDUZIDA POR
OVARIECTOMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciência da Saúde, Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja realizada em concordância com as normas da ética científica.

Orientadora: Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira

Data da aprovação: _____ de _____ de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo de Carvalho e Martins
(Avaliadora - UFPI)

Profa. Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito
(Avaliadora - UFPI)

REITOR:

PROF. DR. JOSÉ ARIMATÉIA DANTAS LOPES.

VICE-REITORA:

PROF. DR^a. NADIR DO NASCIMENTO NOGUEIRA.

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO:

PROF^o DR. HELDER NUNES DA CUNHA

NÚCLEO DE PLANTAS MEDICINAIS:

FERNANDA REGINA DE CASTRO ALMEIDA

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTU SENSO*
EM FARMACOLOGIA:**

RITA DE CASSIA MENESES OLIVEIRA

“É graça divina começar bem,
graça maior, persistir na caminhada certa
Mas graça das graças é não desistir nunca”.

(Dom Hélder Câmara)

A Deus, pelo amor !
A Ilmar e Perpétua, meus “PAIS”CEIRO e meu Abrigo!

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pelo seu amor! Por está presente em todas as minhas escolhas. Esse período de transição e transformação em dois anos, me fez re-aprender que precisamos de tempo pra crescer, precisamos não parar o tempo e nem antecipa-lo, é preciso acima de tudo, aproveitar cada experiência como uma lição. TUDO SERIA NADA SEM DEUS!

Aos meus pais *Ilmar e Perpétua* pelo amor incondicional. Por me ensinarem os valores que realmente importam; Por participarem de todos os projetos, cada etapa, entendendo todas as mudanças e por compreenderem minha ausência por muitas vezes.

Ao *Nilmar*, meu irmão, desde a sua felicidade com a noticia do mestrado. Ele me mostrou o quanto isso seria importante na minha vida e, de como, o meu crescimento o fez tão feliz

Ao meu amigo *Joaquim Caldas Neto* que é de uma liderança fraterna e foi um anjo que permitiu que essa etapa se iniciasse. Ele não sabe a proporção da ajuda. O coração grande a torna algo natural. Obrigada também por me proporcionar conhecer *Silvio Caldas Neto* (in memorin), um escritor, magistrado, um homem brilhante e digno. Muito Obrigada!!

À *Anna Suzane, Pollyanna Marques, Raíssa Uchôa e Sara Lima* pela amizade, por seus ouvidos incansáveis e pelas palavras animadoras nos momentos de dúvida e cansaço.

À *Universidade Federal do Piauí e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES* por dispensarem as condições para realização dessa pesquisa.

À minha orientadora Professora *Dra. Aldeidia*, pelo desafio, confiança e atenção, desde o primeiro contato. Pela compreensão das minhas limitações, destacando as qualidades, e por assumi com responsabilidade e paciência o papel de ORIENTADORA.

Ao professor *Amilton Raposa*, por ser um educador capaz de reconhecer e estimular talentos. Por sua metodologia e sensibilidade que propicia o crescimento e autocrítica.

À todos os *professores do Mestrado* pelos ensinamentos, em especial , a professora *Fernanda*, que tive o prazer de acompanha-la na Prática de Ensino.

Ao *Márcio, Emanuella e Fabiana*. Pelo companheirismo e apoio. O QUARTETO.

Ao *Daniel Arcanjo, Celyane e Benedito*, pessoas de grande generosidade que ajudaram durante toda pesquisa com solicitude e paciência.

Ao *Lucas Nicolau* e *Francisco Valmor* e os respectivos laboratórios pela grande ajuda em experimentos dessa pesquisa.

Aos amigos do *LAFCar* (Laboratório de Farmacologia Cardiovascular), *José Couras*, *Carla Kelly*, *Marcello Bezerra* e *Maysa* pelos ensinamentos, pela paciência e pelo apoio.

Aos demais da *turma de mestrado* e *amigos do NPPM*, pela amizade, os momentos divertidos e por tornarem tudo mais leve, em especial, a *Everton* e *Bruno*.

Aos acadêmicos, alunos de iniciação científica, *Iris Moura*, *Anibal* e *Pedro Simões* importantes nessa pesquisa.

Aos *funcionários* do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais – NPPM, *Gleice*, *Seu Carlos*, *Patrícia* e o *Josy*, solícitos e generosos.

À todas as pessoas que torcem em silêncio e por orações e que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Ilmara Cecília

Ilmara Cecília Pinheiro da Silva Morais. **Efeitos do fitoestrógeno diosgenina sobre a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia.** Pós-Graduação em Farmacologia. Dissertação de Mestrado, NPPM/ CCS /UFPI (2015).

RESUMO

Os fitoestrógenos, substâncias derivadas de plantas que possuem estrutura análoga ao estrógeno e surgem como uma alternativa à terapia de reposição hormonal (TRH) e menores efeitos colaterais. O presente estudo investigou o efeito do fitoestrógeno diosgenina sobre a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais (CEEAA/UFPI 069/2014). Foram utilizadas 24 ratas Wistar oriundas do Biotério Experimental Setorial do NPPM/UFPI, mantidos sob condições controle de temperatura ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12h, com livre acesso à alimentação e água. Realizou-se a ovariectomia para indução da menopausa após anestesia com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (14 mg/kg), v.i, e administração posterior de Pencivet® ppu (0,1 mL/100g) intramuscular. Após 60 dias da cirurgia os animais sham e ovariectomizados e com regressão de estrógeno foram incluídos nesse trabalho. No estudo *in vivo*, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) para procedimento cirúrgico para implantação de cateteres de polietileno (PE) na veia cava inferior e aorta abdominal. A pressão arterial e a frequência cardíaca, após administração aguda da diosgenina (25 e 50 mg/kg i.v.), foram medidas 24 h após a cirurgia através da conexão do catéter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado acoplado a um amplificador conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital. O estudo da administração oral crônica ocorreu nos grupos sham, salina, diosgenina 25 mg/kg, diosgenina 50 mg/kg e estradiol que receberam as substâncias durante 28 dias, por gavagem. A aferição da pressão arterial sistólica foi realizada por um método indireto e não-invasivo com um manguito na cauda da rata e por meio do equipamento ADInstruments ML125 NIBP, duas horas após a administração das substâncias nos intervalos de tempo 0, 7 e 28 dias após início do tratamento. Ao final de 28 dias de tratamento com as substâncias, realizou-se a coleta de sangue e eutanásia com sobredose anestésica para dissecação de órgãos. Para estudo *in vitro*, houve o isolamento, dissecação e limpeza da aorta de ratas tratadas por 7 dias com salina e diosgenina 50mg e a reatividade a FEN, ACh e NPS foram realizados. Investigou-se também o efeito vasorrelaxante da diosgenina (1 μM – 10mM) em anéis de ratas OVX não tratadas. O tratamento crônico com diosgenina não demonstrou alterações nos pesos corporal e relativo de órgãos (pulmão, coração, fígado, rins e útero) e dos parâmetros bioquímicos (FAL, ALT, AST, ureia e creatinina) foram avaliados após o tratamento crônico, sem apresentar alterações. Além disso, a diosgenina 50mg/Kg na análise de marcadores de risco cardiovasculares: Colesterol total e c-HDL demonstraram parâmetros semelhantes ao grupo não-ovariectomizado (* $p < 0,05$). A glicose sérica e triglicérides não tiveram alterações significativas em relação ao grupo sham e salina. A diosgenina promoveu redução da PAM e FC, v.i. A dose de 25mg, v.i, teve efeito hipotensor com bradicardia leve. A diosgenina 25 e 50mg/Kg, v.o, reduziu a pressão arterial sistólica durante o tratamento crônico e também a reatividade à FEN.

As concentrações cumulativas do fitoestrógeno potencializaram a resposta vasorrelaxante da ACh e NPS após. A diosgenina também teve efeito vasorrelaxante em ratas não tratadas e foi abolido na presença de um inibidor da eNOS. A diosgenina 50mg/Kg (25 e 50 mg/kg) não implicou em alterações de parâmetro da MPO, porém elevou significativamente(* $p < 0,05$). os níveis de GSHNP, SOD e NO, bem como reduziu a concentração de MDA relacionado a peroxidação lipídica. Os resultados apontam que a diosgenina tem ação hipotensora aguda e crônica, anti-hipercolesterolêmica, vasorrelaxante dependente de endotélio com atuação pela via do oxido nítrico (ACh e NPS) e antioxidante com redução de peroxidação lipídica.

Palavras – chaves: Menopausa, Diosgenina, Fitoestrógeno, Hipertensão arterial.

Ilmara Cecília Pinheiro da Silva Morais. **Phytoestrogen Effect of diosgenin in the cardiovascular function in menopausal model induced by ovariectomy**. Master in Pharmacology. NPPM /CCS/ UFPI (2015).

RESUMO

Phytoestrogens, substances derived from plants that have similar structure to estrogen, as the Diosgenin emerge as an alternative to hormone replacement therapy (HRT) and minor side effects. This study investigated the effect of diosgenin phytoestrogen on cardiovascular function in menopausal model induced by ovariectomy. The protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA / UFPI 069/2014). Thirty Wistar aged 2 months were used, coming from the Experimental Animal Facility Sector of NPPM / UFPI, kept under temperature control conditions (24 ± 1 ° C) and light-dark cycle of 12 hours, with free access to food and water. The ovariectomy Menopausal induction was do after anesthesia with ketamine (100 mg / kg) and xylazine (14 mg / kg), vi, and subsequent administration Pencivet® ppu (0.1 ml / 100 g) intramuscularly. After 60 days of surgery the animals sham and ovariectomized and estrogen regression were included in this work. In the *in vivo* study, the animals were anesthetized with sodium thiopental (45 mg / kg, ip) for surgical procedure for implantation of catheters polyethylene (PE) in the inferior vena cava and abdominal aorta. Blood pressure and heart rate after acute administration of diosgenin (25 and 50 mg /Kg i.v) were measured 24 h after the surgery via the arterial catheter connection to a pre-calibrated pressure transducer coupled to an amplifier connected to a micro-computer equipped with analog-to-digital converter board. The study of chronic oral administration occurred in the sham, saline, diosgenin 25 mg/Kg, diosgenin 50mg/Kg and estradiol receiving the substances for 28 days by oral gavage. The measurement of systolic blood pressure was performed by an indirect, non-invasive method with a cuff in the rat tail and by means of ADInstruments ML125 NIBP equipment, two hours after administration of the substance at time intervals 0, 7 and 28 days after initiation of treatment. After 28 days of treatment with the substances, there blood was collected and euthanasia with anesthetic overdose for bodies dissection. For *in vitro* study, there was the isolation, cleaning and dissection of the aorta of rats treated for 7 days with saline and diosgenin 50mg and reactivity FEN, NPS and ACh were performed. It also investigated the vasorelaxant effect of diosgenin (1 μ M - 10mM) rings in OVX rats not treated. Chronic treatment with diosgenin showed no changes in the body and relative weights of organs (lung, heart, liver, kidneys and uterus) and biochemical parameters (ALP, ALT, AST, urea and creatinine)) were evaluated after chronic treatment without deterioration. Furthermore, diosgenin 50mg / kg in the analysis of cardiovascular risk markers: Total cholesterol and HDL-c show similar parameters to the non-ovariectomized group (* p <0.05). Serum glucose and triglyceride levels have not changed significantly compared to the sham group and saline. The diosgenin promoted reduction in MAP and HR, i.v. The dose of 25mg, saw, had hypotensive effect with mild bradycardia. Diosgenin 25 and 50mg / kg, po, reduced systolic blood pressure during chronic treatment (p <0.05) and also the reactivity to FEN. The cumulative concentrations of phytoestrogen leveraging the vasorelaxant response to ACh and NPS after. Diosgenin also had vasorelaxant effect in rats untreated and was abolished in the presence of an inhibitor of eNOS. Diosgenin 50mg / kg (25 and 50 mg / kg) did not result in MPO parameter changes, but increased significantly (* p <0.05). GSH levels, SOD and NO, and reduced MDA concentration related to lipid

peroxidation. The results show that diosgenin has acute hypotensive action and chronic anti-hypercholesterolemic, endothelium-dependent vasorelaxant acting by means of nitric oxide (ACh and NPS) and antioxidant with reduced lipid peroxidation

Key - words: Menopause, Diosgenin, Phytoestrogen, hypertension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Estrutura química do 17β – Estradiol. 30
- FIGURA 2.** Estruturas químicas da Isoflavona da soja. 34
- FIGURA 3.** Estrutura química da Diosgenina – (SIGMA-ALDRICH). 36
- FIGURA 4.** Tubérculo do Inhame. 36
- FIGURA 6.** Aparato para medição de PAM após administração endovenosa da Diosgenina. 44
- FIGURA 7.** Representação esquemática de um protocolo experimental controle para o estudo do efeito da Diosgenina (25mg/Kg, 50mg/Kg, i.v.) sobre a PA ou FC em ratas OVX. 45
- FIGURA 8.** Sistema para aquisição de dados da Pressão Arterial caudal (ML125 NIBP Controller). 46
- FIGURA 9.** Sistema de aquisição de dados de Reatividade Vascular em banho de cubas (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP). 47
- FIGURA 10.** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reatividade vascular à FEN (A), Ach (B) e NPS (C) em anéis de artéria aorta com / sem endotélio funcional de rata OVX após tratamento de 7 dias de diosgenina 50mg/Kg. FEN = fenilefrina, E+/- =com endotélio/ sem endotélio, ACh = acetilcolina, NPS = Nitroprussiato de sódio; L = lavagem, min.= minuto. 48
- FIGURA 11.** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito vasorrelaxante diosgenina em anéis de artéria aorta com e sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ou KCl 80mM . FEN = fenilefrina, KCl: cloreto de potássio; E+/- =com endotélio/ sem endotélio, ACh = acetilcolina, L = lavagem, min.= minuto. 49
- FIGURA 12.** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito vasorrelaxante diosgenina em anéis de artéria aorta com e sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ou KCl 80mM . FEN = fenilefrina, KCl: cloreto de potássio; 50

E+/- =com endotélio/ sem endotélio, ACh = acetilcolina, L = lavagem, min.= minuto.

FIGURA 13. Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a fosfatase alcalina em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4-9).

55

FIGURA 14. Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre ALT (A) e AST (B) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina; c – diosgenina 25mg/Kg; d – diosgenina 50mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4-10)

56

FIGURA 15. Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a uréia (A) e a creatinina (B) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4-11).

58

FIGURA 16. Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a glicose em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4-9).

59

FIGURA 17. Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre os triglicérides em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4- 6).

60

FIGURA 18. Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre CT (A), c-LDL (B) e c-HDL (C) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina; c- diosgenina 25mg/Kg; d – diosgenina 50mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4).

62

FIGURA 19. Registros originais mostrando o efeito da diosgenina 25 e 50mg/Kg via endovenosa sobre a PAM em ratas OVX não anestesiadas 63

FIGURA 20. Efeito da diosgenina (25 e 50 mg/Kg) sobre pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M..A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – controle; b- diosgenina 25mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, $n=5$).

64

FIGURA 21. Efeito da Diosgenina durante 28 dias sobre a Pressão Arterial Sistólica (PAS) em ratas OVX. Os valores após registro da PAS, 60 dias depois da cirurgia de ovariectomia em três momentos: no dia 0, 7 e 28 de tratamento administração das substâncias. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina (ANOVA Two- Way seguido de pós-teste de Bonferroni, $n=5$).

65

FIGURA 22. Curvas concentração- resposta à FEN ($1\eta\text{M}$ a $1\mu\text{M}$) em anéis de artéria aorta de ratas OVX após administração oral de salina (●) ou de diosgenina 50mg/Kg (◆) por 7 dias.(A)), e respectivos valores de $E_{\text{máx}\%}$ (B). Teste *t-student* não-pareado entre os grupos, $n= 4$, $p < 0,05$: a – diosgenina vs salina.

66

FIGURA 23. Curvas concentração- resposta ao ACh ($1\eta\text{M}^9$ a $1\mu\text{M}$) em anéis de artéria aorta de ratas OVX após administração oral de salina (●) ou de diosgenina 50mg/Kg (◆) por 7 dias (A) e respectivos valores de $E_{\text{máx}\%}$ (B). Teste *t-student* não-pareado entre os grupos, $n= 4$, $p < 0,05$: a – diosgenina vs salina.

67

FIGURA 24. Curvas concentração- resposta ao NPS ($1\eta\text{M}^9$ a $1\mu\text{M}$) em anéis de artéria aorta de ratas OVX após administração oral de salina (●) ou de diosgenina 50mg/Kg (◆) por 7 dias (A) e respectivos valores de $E_{\text{máx}\%}$ (B).Teste *t-student* não-pareado entre os grupos, $n= 4$, $p < 0,05$: a – diosgenina vs salina.

68

FIGURA 25. Curvas concentração-resposta do efeito da diosgenina sobre as contrações tônicas induzidas por FEN $1\mu\text{M}$ em anéis de artéria aorta em ratas OVX com (◆) ou sem (●) endotélio ou por contrações induzidas com KCl $80\mu\text{M}$ () sem endotélio (A) e respectivos valores de $E_{\text{máx}\%}$ (B). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. Teste 69

t-student entre dois grupos, n=5.

FIGURA 26. Curvas concentrações-resposta do efeito da diosgenina sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em anéis de artéria aorta de ratas OVX com endotélio na ausência (◆) ou presença (●) do inibidor L-NAME 100mM (A) e respectivos valores de $E_{m\acute{a}x\%}$ (B).. (Teste *t student* entre dois grupos, $p<0,05$, n= 4).

70

FIGURA 27. Efeito da diosgenina após tratamento de 28 dias de administração oral sobre a atividade de MPO em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p<0,05$ (Teste *t- student* entre dois grupos, n= 4).

71

FIGURA 28. Efeito da diosgenina após tratamento de 28 dias de administração oral sobre a concentração de MDA em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p<0,050$: a – grupo sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4).

72

FIGURA 29. Efeito da diosgenina após tratamento de 28 dias de administração oral sobre GSH em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p<0,05$: b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4-5)

FIGURA 30. Efeito da Diosgenina (25mg/Kg e 50mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a atividade da SOD em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p<0,05$: a – grupo sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4).

74

FIGURA 31. Efeito da Diosgenina (25 e 50mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a concentração de nitrito em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p<0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina; d – diosgenina 50mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4).

75

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Composição da solução de Krebs Normal. 41
- TABELA 2:** Composição da solução de Krebs despolarizante - KCl (80 mM). 41
- TABELA 3.** Efeito do tratamento crônico de diosgenina sobre ganho ponderal de ratas OVX com a administração oral de diosgenina em T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ dias. Os valores são expressos em g/100 g de animal (n=5), a $p < 0,05$, comparados ao grupo sham. 53
- TABELA 4.** Efeito do tratamento crônico de diosgenina sobre massa relativa de órgãos coração, pulmão, rins, fígado, baço e útero em modelo de menopausa induzida por ovariectomia. Os valores são expressos em g/100 g de animal. Os dados representam a média \pm EPM. A diferença significativa $p > 0,05$ entre os grupos: a (ANOVA duas via, teste de Bonferroni). 54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentração de cálcio intracelular
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
AKt	Proteína cinase B
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AMPc	3'5' Adenosina -monofosfato ciclico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AT1	Receptor de Angiotensina do tipo 1
BKCa	canais de potássio dependente de cálcio
BRS	Resposta do Barorreflexo
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
COX)	Cicloxigenases
CRE	Creatinina
c-HDL	Colesterol- Lipoproteína de alta densidade
c-LDL	Colesterol - Lipoproteína de baixa densidade
CT	Colesterol Total
DATASUS	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde
DC	Débito Cardíaco
DCV	Doença Cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DTNB	Ácido 5,5'ditio-nitrobenzoico
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiantetrácético
Enos	Óxido nítrico sintase endotelial
E_{máx}(%)	Efeito máximo
E.P.M.	Erro padrão da média
E2	17 β -estradiol
ER	Receptor de estrogênico
Erα	Receptor Estrogênio α
ERβ	Receptor Estrogênio β
ERK 2/1	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET-1	Endotelina-1
FAL	Fosfatase Alcalina
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FRDE	Fator de relaxamento derivado do endotélio
GC	Guanilil ciclase
GDP	Difosfato de guanosina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
Gs	Proteína G estimulatória
GSHNP	Glutationa Reduzida
GSSH	Glutationa oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
GLI	Glicose
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio

H₃PO₄	Ácido Fosfórico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Inos	Óxido nítrico sintase indutiva
i.p	Intraperitoneal
IP₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
K⁺	Íon Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginina metil éster
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MLV	Músculo Liso Vascular
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NPS	Nitroprussiato de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase
NTS	Núcleo do Trato Solitário
O⁻²	Ânion Superóxido
OVX	Ovariectomia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PARP	<i>Poli(ADP-ribose)polimerase-1</i>
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PIP₂	4,5 – bisfosfato de fosfatidil inositol
PIP₃	3,4,5 – bisfosfato de fosfatidil inositol

ROCCs	Canais para cálcio operados por receptores
SERMS	Moduladores seletivos do receptor estrogênico
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRAA	Sistema Renina Angiotensiva Aldosterona
TCA	Ácido tricloroacético
TRH	Terapia de reposição hormonal
TRHE	Terapia de reposição hormonal de estrógeno
TRI	Triglicérides
UR	Uréia
i.v	Via intravenosa
v.o	Via oral

SUMÁRIO

Resumo	IX
Abstract	XI
Lista de Ilustrações	XIII
Lista de Tabelas	XVII
Lista de Siglas e Abreviaturas	XVIII
INTRODUÇÃO	26
1 REFERENCIAL TEÓRICO	27
1.1 POS-MENOPAUSA E SISTEMA CARDIOVASCULAR	27
1.2 ESTRÓGENO E A REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	29
1.3 REPOSIÇÃO HORMONAL E OS FITOESTRÓGENOS	33
1.4 DIOSGENINA	35
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específicos.	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Animais	39
3.2 Ferramentas farmacológicas	39
3.3 Soluções nutritivas	39
3.4 Indução da menopausa por ovariectomia	41
3.5 Citologia Vaginal	41
3.6 Tratamento	42
3.7 Peso corporal e peso relativo de órgãos	43
3.8 Dosagens bioquímicas	43
3.9 Registro da Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratas OVX	43
3.10 Registro da Pressão Arterial Sistólica (PAS) em ratas OVX	45
3.11.1 Preparação de anéis de artérias aorta e isoladas em ratas OVX com endotélio	46

intacto e endotélio removido.

3.11.2 Efeito do tratamento de diosgenina 50 mg/Kg sobre as contrações induzidas por cumulativas de fenilefrina em anéis de aorta de ratas OVX.	47
3.11.3 Efeito vasorrelaxante da diosgenina sobre contrações induzidas por fenilefrina ou KCl 80 mm em anéis de artéria aorta com sem endotélio de ratas OVX	49
3.11.4 Verificação da participação do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante induzido por diosgenina	49
3.12 Atividade Antioxidante	50
3.12.1 Determinação da concentração de MPO no tecido cardíaco em ratas OVX	50
3.12.2 Determinação MDA no tecido cardíaco em ratas OVX	50
3.12.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) tecido cardíaco de ratas OVX	51
3.12.4 Concentração de superóxido dismutase no plasma em ratas OVX	51
3.12.5 Concentração do óxido nítrico (NO) no plasma em ratas OVX	52
3.13 Análise Estatística	52
4. RESULTADOS	53
4.1 PESO CORPORAL E PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS	53
4.1.1 Avaliação do peso corporal após administração crônica de diosgenina em ratas OVX	53
4.1.2 Avaliação da massa relativa de órgãos após administração crônica de diosgenina em ratas OVX	53
4.2 FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL	54
4.2.1 Efeito da administração oral crônica de diosgenina sobre a função hepática em ratas OVX	54
4.2.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre alanina ALT e AST em ratas OVX	55
4.2.3 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a função renal em ratas OVX	57
4.3 MARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR	59
4.3.1 Efeito da administração oral crônica de diosgenina sobre glicose plasmática em ratas OVX	59
4.3.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre os triglicerídeos (TRI) em ratas OVX	60
4.3.3 Efeito da administração oral crônica de diosgenina sobre níveis séricos de Colesterol (CT), Colesterol-HDL (c-HDL) e Colesterol -LDL (c-LDL) em ratas OVX	60
4.4 PRESSÃO ARTERIAL	
4.4.1 Efeito da administração intravenosa de diosgenina sobre a pressão arterial	63

média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratas OVX	
4.4.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a pressão arterial sistólica (PAS) em ratas OVX.	64
4.5 REATIVIDADE VASCULAR	66
4.5.1 Influência do tratamento com diosgenina 50 mg/Kg sobre a reatividade vascular em anéis de artéria aorta de ratas OVX.	66
4.5.2 Efeito do tratamento de diosgenina sobre a resposta vasorrelaxante induzida por acetilcolina em anéis de artéria aorta de ratas OVX	67
4.5.3 Efeito do tratamento de diosgenina 50mg/Kg sobre concentrações cumulativas de NPS em anéis de artéria aorta de ratas OVX	68
4.5.4 Efeito vasorrelaxante da diosgenina em anéis de artéria aorta de ratas OVX pré-contráidas com FEN e KCl 80 Mm	69
4.5.5 Verificação da participação do oxido nítrico na resposta vasorrelaxante induzida pela diosgenina em anéis de aorta em ratas OVX	70
4.6 ESTRESSE OXIDATIVO.	71
4.6.1 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a mieloperoxidase (MPO) em ratas OVX	71
4.6.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a peroxidação lipídica em ratas OVX	71
4.6.3 Efeito da administração oral de diosgenina sobre os níveis de GSHNP em ratas OVX	72
4.6.4 Efeito da administração oral de diosgenina sobre os níveis de Superóxido Dismutase (SOD) em ratas OVX	73
4.6.5 Efeito da administração oral de diosgenina sobre os níveis de nitrito em ratas OVX.	74
5 DISCUSSÃO.	76
6 CONCLUSÃO	87
7 PERSPECTIVAS	88
REFERENCIAS	89

INTRODUÇÃO

A Menopausa consiste em um marco na saúde das mulheres. Ela é caracterizada pela redução dos hormônios ovarianos e várias alterações metabólicas, dentre elas está disfunção na função cardiovascular. A diminuição da produção e secreção do estrógeno, principal hormônio feminino, está relacionado a produção de Oxido Nítrico e, conseqüente, efeito na vasodilatação (PALLOS et al., 2006; CAVADAS et al., 2010).

A redução estrogênica tem sido também associada às mudanças na distribuição corporal e a prevalência do acúmulo de tecido adiposo na região abdominal. Essa condição implica em complicações metabólicas como, por exemplo, a dislipidemia, o aumento do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e diminuída da fração de colesterol de alta densidade (HDL-c) favorecendo o aumento na incidência de doenças cardiovasculares – DCV (PARK et al., 2014).

Uma das formas utilizadas para reduzir os riscos das doenças cardiovasculares na menopausa é o uso da terapia de reposição hormonal (TRH). No entanto, alguns estudos sugeriram que os riscos de câncer da mama e carcinoma do endométrio estão relacionados com a terapia prolongada da TRH de estrógeno quem podem promover metástase do carcinoma (LI, 2013).

Desse modo, os fitoestrógenos são hormônios vegetais, substâncias esteroides que ocorrem naturalmente nas plantas, e que podem exercer efeitos similares aos dos hormônios femininos (estrógenos) no organismo da mulher. A administração de fitoestrógenos tem efeito benéfico nos distúrbios da pós-menopausa atenuando o declínio da secreção de estrogênio e conseqüentes desajustes histomorfológicos e metabólicos (GRINGS et al., 2009).

A Diosgenina, que é um fitoestrógeno, tem sido estudado devido às várias aplicações práticas e potenciais no mundo oriental. Há relatos na literatura, por exemplo, que a diosgenina possui efeitos anti-inflamatórios em ratos (Yamada et al., 1997). Além disso, os glicosídeos da Diosgenina alteram as atividades mecânicas do miocárdio, provavelmente, através da modulação do fluxo de cálcio extracelular através da membrana plasmática (AU et al., 2004). No entanto, são ausentes estudos que investigam o efeito da diosgenina na função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia, bem como os mecanismos envolvidos no mesmo.

1 REFERENCIAL TEORICO

1.1 POS-MENOPAUSA E SISTEMA CARDIOVASCULAR

A Menopausa é o limite entre período reprodutivo e o não reprodutivo da vida da mulher. As modificações biológicas que ocorrem no gênero feminino nessa fase são denominadas climatério, do grego *Klimacton* que significa “crise” e engloba os períodos de pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa. Esse período é identificado por intensas alterações hormonais, caracterizada pela atrofia ovariana e regressão hormonal do estrógeno, atingindo o ápice quando a mulher encontra-se na pós-menopausa, após ausência da menstruação durante 12 meses consecutivos, o que frequentemente, ocorre entre 45 e 50 anos (BRASIL, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) até 2030 cerca de mais de 1 bilhão de mulheres estarão na menopausa. De acordo com estimativas do DATASUS, em 2007, a população feminina brasileira totalizava mais de 98 milhões de mulheres. Nesse universo, cerca de 30 milhões têm entre 35 e 65 anos, o que significa que 32% das mulheres no Brasil estão na faixa etária em que ocorre o climatério. O novo contexto mundial, com destaque para maioria dos países ocidentais, é de melhoria na atenção à saúde e aumento da expectativa de vida. Desse modo, há uma tendência que mulher passe mais de um terço de sua vida na fase pós-menopausa (OMS, 2009)

A população feminina durante o climatério vivenciam modificações hormonais e metabólicas que incorrem na qualidade de vida no aspecto físico e psicológico, são elas: alterações menstruais, ondas de calor, sudorese, calafrios; cefaleia, tonturas, parestesia, palpitações, depressão, insônia, fadiga, perda de memória a atrofia vaginal, incontinência/urgência urinária, disfunção sexual, atrofia da pele e sintomas psicológicos. Na pós-menopausa, por sua vez, é comum o comprometimento uretral e osteoporose (SHI-HUA et al, 2013).

A deficiência hormonal feminina nesta fase também desempenha um papel importante na patogênese cardiovascular. Uma evidencia dessa condição é a maior incidência de cardiopatias na população após a menopausa e em mulheres jovens com perda da função ovariana que em mulheres em idade fértil. Essa relação é análoga a relação entre as doenças que acometem o sistema cardiovascular e os gêneros masculino e feminino. Isso porque nas demais fases da vida, os homens apresentam problemas cardíacos com maior frequência que comparados as mulheres na mesma faixa etária (PARKER et al, 2014).

Estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram de maneira evidente a menor prevalência de hipertensão arterial (HÁ) em mulheres no período fértil quando comparados aos homens de mesma idade. Após a menopausa, período de queda abrupta dos níveis de hormônios sexuais femininos, ocorre um aumento no número de mulheres hipertensas. A pós-menopausa é um fator de risco para hipertensão (ZHOU et al, 2014).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) consiste em uma morbidade e também influencia no surgimento das demais doenças cardiovasculares. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC (2010), a HAS é definida pelos: valores de pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e/ou de pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg em medidas em condições ideais, em três ocasiões (SBC, 2010). Esses valores encontram-se, por vezes, alterado em mulheres após a menopausa, devido a deficiência de um potente agente vasodilatador: o estrógeno. Estudos observacionais têm mostrado que a menopausa é associada com um aumento de 4-5mmHg da PA sistólica independente de idade (HAGE, 2013).

Além do aumento pressórico patológico, outro aspecto que favorece a elevação da incidência de doenças cardiovasculares em mulheres posmenopáusicas, está associado ao dano vascular, provocado pela deficiência do organismo em ativar mecanismos protetores do tecido endotelial e do músculo liso, componentes essenciais do vaso para controle pressórico. Pacientes na perimenopausa frequentemente apresentam síndromes típicas e atípicas de dor interligadas às lesões ateroscleróticas (LIU et al , 2015).

Uma das razões também para o aumento do risco cardiovascular parece ser determinada pela síndrome metabólica, em que todos os componentes (obesidade visceral, dislipidemia, hipertensão e distúrbio do metabolismo da glicose) estão associados com maior incidência de doença arterial coronariana. Após a menopausa, a síndrome metabólica é mais prevalente do que em mulheres na pré-menopausa. Esse fato tem repercussão sobre a ocorrência de infarto do miocárdio e outras morbidades cardiovasculares (MEIRELLES, 2014).

Os mecanismos para o estabelecimento da síndrome metabólica nas mulheres pós-menopáusicas são: a elevação significativa dos níveis séricos de colesterol total (CT), triglicérides (TRI), lipoproteína de baixa densidade (LDL - c) e uma diminuição da fração lipoproteína de alta densidade (HDL-c). O perfil lipídico torna-se mais aterogênico com aumento da oxidação de LDL-c e contribuindo para o surgimento da obesidade abdominal (ZIAEI; MOHSENI, 2013).

Os hormônios femininos são muito reconhecidos como tendo influência na suscetibilidade a doenças vasculares, embora pouco se conheça sobre os mecanismos celulares pelos quais eles exercem essas funções. Sabe-se que existe uma associação paradoxal entre o estrogênio e a progesterona e a proteção contra algumas doenças vasculares e a suscetibilidade a outras (CASANOVA; SPRITZER, 2012)

Pesquisas experimentais com diferentes modelos de HA demonstram que os hormônios femininos podem proteger contra as complicações da hipertensão arterial. É importante salientar, que o início da equivalência nas taxas de eventos cardiovasculares entre os sexos coincide com o advento da menopausa e, conseqüentemente, da privação estrogênica, refletindo desse modo a importância do estrogênio para o controle pressórico sanguíneo humano (PEDRAM et al, 2013).

1.2 ESTRÓGENO E A REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

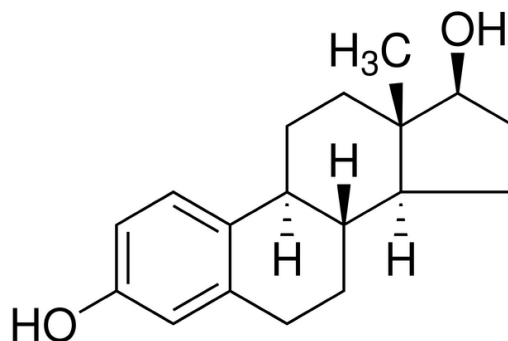
A regulação da pressão arterial é complexa e envolve mecanismos neurais e neuro-humorais em curto e longo prazo. A modulação da PA ocorre por meio de quatro sistemas do organismo: o cardiovascular, sistema nervoso autônomo, renal (renina-angiotensina-aldosterona) e o endócrino (estrógeno, renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial etc). Mudanças em curto prazo são reguladas pelo sistema nervoso simpático (SNS) e a longo prazo esse controle da PA é feito principalmente pelos rins (MONTEIRO et al., 2012).

O sistema endócrino também participa da regulação da pressão arterial através do estrogênio. Esse hormônio é secretado pelos ovários da mulher da puberdade até o climatério e, em menor quantidade, pelas adrenais (HUSS; GARBACZ; XIE, 2015). Estrogênio é um termo usado para um grupo de hormônios esteroides com 18 carbonos. O estrogênio engloba três hormônios esteroides estruturalmente semelhantes: 17β -estradiol - E2 (Figura 1); estrona - E1, e estriol - E3 (IGNACIO et al, 2014). Na menopausa, os níveis hormonais e os ciclos menstruais ficam irregulares, o número de folículos ovarianos reduz à medida que avança a idade da mulher, provocando declínio da fertilidade, esta queda repercute sobre os tecidos e órgãos, provocando alterações metabólicas e anatômicas (KHALIL, 2013).

Os receptores de estrogênio (ERs) pertencem à família dos receptores de hormônios esteroides (NRs). A estrutura primária do ER é caracterizada por três domínios funcionais principais: o domínio responsável pela ligação com o ligando (hormônio, fitoestrógeno), a

região responsável pela interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA) e a região reguladora da transcrição (MICHEL et al, 2013).

FIGURA 1. Estrutura química do 17 β – Estradiol



As funções biológicas do estrógeno são mediadas pela ligação aos ERs: receptor de estrogênio alfa (ER α) e receptor de estrogênio beta (ER β). Um terceiro receptor, o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) ou GPR30, porém existem poucos estudos a respeito desse receptor. A ação do estrogênio é seletivamente estimulada ou inibida, dependendo de um equilíbrio entre as atividades ER e possuem elevada especificidade nos tecidos-alvos (MAYRA et al, 2014).

Os ERs são expressos em células endoteliais e do músculo liso vascular, sugerindo que a sinalização desses receptores esteja em função das células musculares lisas. O ER α destaca-se na expressão em tecidos envolvidos no metabolismo da glicose e lipídios, tais como: o tecido adiposo, fígado e coração e o ER β nos demais tecidos: no epitélio da próstata, testículos, células da granulosa do ovário, da medula óssea, miocárdio e cérebro (LEE; KIM; CHOI, 2012).

A ação desse hormônio por ocorrer frequentemente através dos: efeitos genômicos, quando há participação, principalmente, pelo receptor nuclear ER α e envolvem a ligação do ligando estrógeno (E2) ao receptor; efeitos não-genômicos (rápidos) de E2 são mediadas pelos ER α e / ou ER β localizados na membrana plasmática e incluem a regulação do Ca²⁺, os efeitos anti-apoptóticos e o metabolismo mitocondrial. Os efeitos rápidos do E2 são responsáveis também por regular a transcrição do gene do ER no miocárdio (KNOWLTON; KORZICK, 2014)

Os receptores de estrogênio têm sido identificados em centros cerebrais envolvidos com a regulação cardiovascular, como por exemplo, área pré-óptica, núcleo paraventricular,

núcleo supraóptico, núcleo do trato solitário, ventrolateral da medula e área postrema. A frequência de disparo de um nervo simpático é reduzida em mulheres que fazem a terapia de reposição hormonal (TRH) na pós-menopausa, constituindo outro mecanismo de efeitos benéficos do estradiol (TAO et al, 2012).

Em alterações pressóricas, há grande dilatação da parede e ativação dos barorreceptores nas artérias, especialmente na aorta, que geram os potenciais de ação. Os sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS), via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e vago (fibras aórticas). Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando aumento da atividade vagal e redução da frequência cardíaca- FC (IRIGOYEN et al.; 2005).

Por outro lado, o tônus simpático para o coração, rins e vasos é reduzido, uma vez que, outros neurônios do NTS quando estimulados por aumento da PA, excitam o bulbo ventrolateral caudal, este inibe os neurônios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral incorrendo na redução da contratilidade cardíaca e bradicardia, tal como na redução da resistência vascular periférica e renal, que levam à redução da PA (MENDONÇA et al.; 2005)

Vários estudos apontam o papel dos esteroides sexuais femininos no equilíbrio entre as substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras no endotélio vascular e músculo liso subjacente no controle vascular. O estrogênio, por sua vez, afeta o sistema vascular diminuindo o tônus e aumentando as respostas dilatadoras endotélio-dependentes nos vasos sanguíneos (MILEWICZ et al, 2013).

Os receptores de estrogênio específicos no endotélio e célula muscular lisa tem uma ação modulatória sobre a síntese de óxido nítrico (NO), e conseqüentemente, efeito cardioprotetor (LE et al, 2013). A síntese de NO é um processo dependente de Ca^{2+} que ocorre endotélio, a partir do grupo guanidina da L-arginina por ação da enzima sintase do óxido nítrico edotelial (eNOS). O NO assim formado não é ofensivo a célula, ao contrario pode ter efeito protetor. A enzima NOS possui múltiplos sítios propícios à fosforilação, as quais podem ser fosforilados por várias proteína-quinases, incluindo Akt e ERK 2/ 1. Por estimulação de estrógeno, a PI3K fosforila rapidamente a serina / treonina-quinase Akt. As proteínas Akt ativadas, por sua vez fosforilam a serina 1177 da NOS nas células endoteliais (YI, 2012).

O NO difunde-se para as áreas adjacentes às células musculares lisas e ativa a guanilil ciclase solúvel (GCs) elevando assim os níveis celulares de guanosina-monofosfato-cíclico (GMPc), que atua como mensageiro intracelular, amplificando a resposta celular. Com o aumento da concentração de GMPc que ativa a proteína quinase G (PKG) na célula muscular, ocorre o relaxamento vascular devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, que ocorre devido à fosforilação da serina e treonina, promovendo assim a interação entre a miosina e actina. O GMPc pode, alternativamente, ativar diretamente canais iônicos, principalmente canais de potássio (K^+), contribuindo para o relaxamento muscular via hiperpolarização de membrana celulares (KUBACKA et al, 2014).

A disfunção endotelial e redução do NO ocasionada pela pós - menopausa pode também desencadear a síntese e liberação de endotelina (ET-1), substância vasoconstrictora, estimulando a liberação e atividade de fatores de crescimento, que resulta na hiperplasia da musculatura lisa e na migração para dentro da camada íntima, além do aumento das moléculas pró-inflamatórias (YUAN et al, 2013). O estradiol é capaz de reduzir a vasoconstrição dependente de ET-1 em artérias coronárias, através da expressão gênica de seus receptores. Mulheres submetidas à reposição hormonal demonstram redução dos níveis séricos de ET-1 e de seus receptores (XING et al, 2014).

Outro possível mecanismo vasodilatador do estrogênio ocorre através da regulação da entrada de cálcio (canais de cálcio) nas células do músculo liso vascular (CHENG et al, 2012). Esse efeito do estrógeno sobre $[\text{Ca}^{2+}]$ pode ser explicado pelo fato desse hormônio alterar a densidade e a permeabilidade dos canais de Ca^{2+} nas células de músculo liso vascular (MLV). Os efeitos do estrógeno sobre a produção de NO podem ser dependentes das concentrações de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). A ativação dos receptores de membrana causa aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e liberação de NO (CERAVOLO et al, 2007).

O estrógeno também participa do controle da pressão arterial mediado pelos rins e o sistema renina-angiotensina-aldosterona. O estradiol é capaz de promover aumento nos níveis de renina plasmática e propicia a elevação na expressão gênica e nos níveis séricos de angiotensinogênio. Consequentemente, há elevação da concentração de angiotensina I (Ang I) que é convertida por uma enzima produzida nos pulmões - a enzima conversora da angiotensina (ECA), em Angiotensina II (Ang II), um agente vasoconstrictor que induz a proliferação da camada vascular. Pode ainda existir alterações sobre a vasoatividade, com

aumento da atividade do sistema nervoso simpático levando a um aumento do tônus vascular e PA (O'DONNELL; FLORAS; HARVEY, 2014).

Esses efeitos do estradiol sobre os vasos poderiam resultar em elevação da pressão arterial, porém esse hormônio é capaz de inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), com isso promovendo uma significativa redução nos níveis de angiotensina tipo 2 (Ang II), além de incidir em uma maior expressão de receptores de AT1. A Ang 1-7 apresenta efeitos opostos aos da Ang II, contribuindo para uma vasodilatação dependente do NO, além de acionar o reflexo barorreceptor. Desse modo, há uma redução nos níveis de Ang II paralelamente ao aumento dos níveis de Ang 1-7 (BUNDALO et al, 2014).

Outra ação do estrogênio acarreta em proteção cardiovascular é a participação da manutenção dos níveis adequados de colesterol pela lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e da promoção de vasodilatação arterial por meio da estimulação a produção de NO. O efeito protetor do estradiol por meio do NO é atribuído à capacidade de reduzir a granulação e a liberação de mediadores dos mastócitos, reduzir as citocinas, e, por fim, de acelerar o mecanismo de reparo das lesões. Esses aspectos alicerça o uso da TRH na menopausa relacionado ao controle pressórico (DOWLING et al, 2013; YING – HUI et al, 2012; XING et al, 2014).

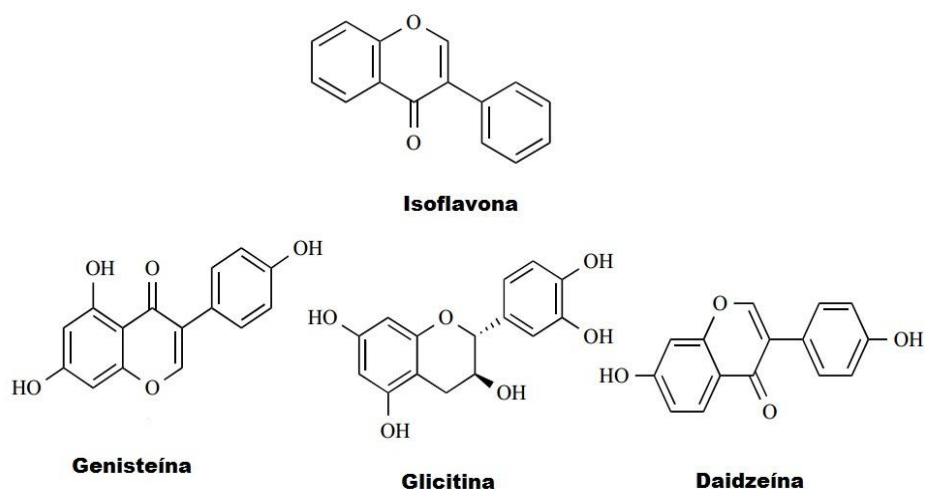
1.3 REPOSIÇÃO HORMONAL E OS FITOESTRÓGENOS

A terapia de reposição hormonal (TRH) na pós-menopausa com o estrógeno tem sido utilizada há mais de 25 anos. A terapêutica com o combinado de estrogênio-progesterona, por sua vez, adquiriu destaque nos últimos 15 anos. A TRH está associada à redução dos sintomas da menopausa, da mortalidade por doenças cardiovasculares e do risco de osteoporose. No entanto, alguns estudos sugeriram que os riscos de câncer da mama e carcinoma do endométrio podem surgir em decorrência da terapia prolongada da TRE de estrógeno e pode contribuir para metástase do carcinoma (LI, 2013).

Alguns autores sugerem diferentes terapias para substituir a reposição hormonal clássica. Com isso, há a redução do risco de câncer de mama que a terapia de reposição hormonal pode favorecer. Uma dessas terapias é a que utiliza os chamados moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERMs), que podem ser naturais (fitoestrógenos) ou sintéticos, tais como os derivados do trifeniletileno (tamoxifeno, idoxifeno, droloxifeno, toremifeno e clomifeno), entre outros compostos (JARGIN, 2014).

Os fitoestrógenos consistem em um grupo de compostos não-esteroidais derivados de plantas que têm comportamento semelhante aos estrógenos e que possuem afinidade aos receptores de estrogênio. Eles têm atraído grande atenção pelos efeitos potencialmente benéficos na saúde humana. Parte desses compostos podem não apresentar afinidade para ER e, neste caso, agem por mecanismos, tais como inibição ou ativação de enzimas específicas, implicando em uma resposta estrogênica ou alteração da quantidade total de estrógenos livre no organismo (WOCLAWEK- POTOCKA et al, 2013).

FIGURA 2. Estruturas química da Isoflavona da soja



Fonte: GARRIDO; DE LA MAZA C; VALLADARES B et al (2003).

Esses compostos foram identificados pela primeira vez no ano de 1926 por Dohrn et al., 1930 e simultaneamente por Butenandt e pela dupla de pesquisadores Jacobi e Skarzynsky. Tais experimentos, no entanto, não obtiveram um método efetivo de detecção do hormônio e, para a época, apenas tiveram um caráter de pioneirismo nas pesquisas em fitoterapia (SIMONS; GRINWICH, 1989).

Os constituintes fitoquímicos de plantas terrestres exercem efeitos cardioprotetores relacionados principalmente à eliminação de radicais livres, por reações redox. A ação desses compostos constitui na inibição de enzimas-chave envolvidas na biossíntese de lipídios, regulação do tônus vascular através da produção endotelial de óxido nítrico, supressão da adesão de leucócitos ao endotélio e inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares a partir da interferência nos fatores de crescimento celular (MESSINA, 2014).

Os fitoestrógenos com maior ação estrogênica são as isoflavonas presentes no gérmen de soja. Eles são quimicamente semelhantes aos compostos não-esteróides, que se ligam com menor afinidade aos receptores estrogênicos (menos de 1% da afinidade de ligação do

estradiol). Os referidos compostos apresentam ação seletiva, isto é, exibem atividade estrogênica em alguns tecidos, especialmente adiposo e vascular, por exemplo, e antiestrogênicos como mamário e uterino, entre outros, o que favorece a redução de efeitos sistêmicos e direcionamento terapêutico (CHEN; LIN; LIU, 2014).

As isoflavonas são fitoestrógenos de plantas da família *Fabaceae*. As isoflavonas da soja ganharam importância considerável pelo papel potente na gestão dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. As principais representantes desse grupo são a genisteína, daidzeína e glicitina estão presentes sob a forma de glicosídeos, com ação protetora cardíaca por múltiplos mecanismos. Há evidências de que a isoflavona diminui a intensidade e a frequência dos sintomas vasomotores em mulheres na menopausa. O uso dos fitoestrógenos possui um embasamento epidemiológico, em sua maioria, a partir das pesquisas em regiões de alto consumo de soja (VASANTHI; SHRISHRIMAL; DAS, 2012).

Estudos demonstram também uma menor incidência de doenças arteriais coronárias e distúrbios relacionados com deficiências de estrogênio em homens e mulheres que possuem uma dieta abundante em fitoestrógenos. Pesquisas com este foco contribuem para um uso terapêutico com embasamento científico, especialmente, no que abrange os mecanismos de ação de substâncias terapêuticas e biossegurança (CHEN; LIN; LIU, 2014).

O efeito cardioprotetor dos alimentos com soja contendo isoflavonas é mediada pela eliminação de radicais livres e propriedades antioxidante, que podem ocorrer devido à configuração do grupo hidroxila no anel B. O grupo hidroxila no anel B de isoflavonas doa hidrogênio e elétrons para radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito para que ocorra a estabilização e origine um radical flavonóide relativamente estável (MESSINA, 2014).

1.4 DIOSGENINA

Diosgenina, 3 β -hidroxi-5-spirostene, (figura 3), um fitoestrógeno, estruturalmente semelhante ao estrogênio e progesterona, utilizada como precursora para produção industrial de progesterona e de noretisterona. Ela pode ser encontrada em uma variedade de plantas, mas extraída principalmente da raiz do inhame selvagem (*Dioscorea villosa*), feno-grego (*Trigonella foenum graecum*) e da soja, *Glycine max* (HUANG et al, 2011).

Dioscorea ou inhame (figura 4) é uma planta da família *Dioscoreaceae* do tipo tubércula e monocotiledônia. Nessa família, diferentes espécies são originárias de diversas partes do mundo: África, Ásia, América do Sul do Caribe e as ilhas do Pacífico Sul, e assim

por diante. A zona dominante para a produção de inhame no mundo é na África Ocidental onde cerca de 48 milhões de toneladas (cerca de 93% da produção mundial (HUANG et al, 2012)).

Estudos pré-clínicos apontam evidências farmacológicas para utilização de diosgenina em patologias como diabetes, osteoporose e câncer. A administração de diosgenina em animais diabéticos induzidos por estreptozocina promovem redução dos riscos cardiovascular e controle glicêmico, nesse caso, o efeito hipoglicemiante do fitoestrógeno pode ser atribuído ao efeito antihiperlipidêmico (NAIDU et al, 2014).

FIGURA 3. Estrutura química da Diosgenina – (SIGMA-ALDRICH)

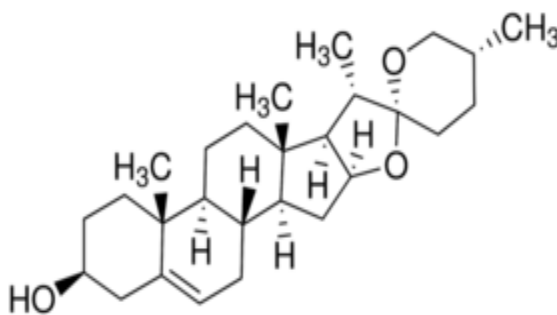


FIGURA 4. Tubérculo do Inhame



<http://dieta.blog.br/saude-e-bem-estar>

A diosgenina é também objeto de inúmeros estudos sobre a atividade antineoplásica e apoptótica. Em estudo utilizando células de carcinoma epidermóide de pele *in vitro* e tumores de sarcoma *in vivo*. A Diosgenina inibiu a proliferação celular e citotoxicidade induzida em A431 e células Hep2. A ativação de caspases, clivagem da enzima *poli (ADP-ribose) polimerase-1* (PARP-1), um importante alvo terapêutico contra o câncer, foram observadas nas células tratadas. A diosgenina pode inibir a fosforilação das vias da Akt e JNK, inibindo assim a proliferação celular enquanto induz apoptose (DAS et al, 2012).

As vias de sinalização envolvidas no crescimento muscular atuam de forma similar no músculo cardíaco e também nos vasos. A diosgenina é apontada por promover a modulação dessas cascatas e pelo papel essencial no controle da hipertrofia cardíaca (ISAYEVA, 2014). Nos vasos, a ação da diosgenina é de vasodilatação e pode está relacionada ao endotélio, especificamente, ao fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE), como o NO, as Cicloxigenases (COX) e derivados, além da ativação de canais de potássio dependente de cálcio (BKCa). Ainda não está esclarecida essa participação desse fitoestrógeno no mecanismo de vasodilatação independentes do endotélio, (DIAS et al , 2007).

Os múltiplos efeitos benéficos da diosgenina tem despertado interesse pela comunidade científica em diversas áreas. O estudo dessa substância sobre os sistema cardiovascular em um modelo de menopausa induzida por ovariectomia tem dois aspectos de grande relevância: uma terapêutica alternativa para um segmento populacional extensa, que são as mulheres, quanto pela evidencia o efeito de um fitoestrógeno pode ter em um modelo de regressão máxima de hormônios femininos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos do fitoestrógeno Diosgenina sobre a resposta cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia

2.2 Específicos

- Investigar o efeito da diosgenina sobre parâmetros bioquímicos de toxicidade: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransaminase (AST), Fosfatase alcalina (FAL), Creatinina e Ureia;
- Analisar o tecido hepático e uterino após tratamento crônico com diosgenina por 28 dias quanto a aspectos de toxicidade;
- Verificar o efeito da diosgenina sobre parâmetros bioquímicos de rastreamento de risco cardiovascular: Glicemia, TRI, CT, HDL-C e LDL-c;
- Verificar o efeito da diosgenina sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) por administração intravenosa;
- Avaliar o efeito da diosgenina administrado cronicamente por via oral sobre a pressão arterial sistólica;
- Investigar o efeito do tratamento de 7 dias com diosgenina sobre a reatividade vascular à fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta;
- Avaliar o efeito vasorrelaxante da diosgenina em anéis de aorta isolada pré-contráídos com fenilefrina ou KCl 80mM ;
- Verificar o efeito da diosgenina sobre a concentração de nitrito (óxido nítrico) plasmático;
- Avaliar o efeito da diosgenina sobre o perfil oxidativo (glutathiona reduzida, superóxido dismutase, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e mieloperoxidase) no tecido cardíaco ou no plasma;

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizadas 30 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas com idade superior a 07 semanas de vida, em que atingem a maturidade sexual segundo Sengupta (2013). Os animais provenientes do Biotério experimental do NPPM/UFPI mantidos sob condições controle de temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de 12h de claro-escuro, tendo livre acesso à alimentação e água.

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA da UFPI (N° 069/2014), em Anexo A. Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estão em conformidade com o Parágrafo Único da Resolução N° 1000, de 11 de maio de 2013, sob a responsabilidade da médica veterinária Profa. Me. Janylla Mirck Guerra de Oliveira CFMV-PI N° 1048.

3.2 Ferramentas farmacológicas

Para a realização dos experimentos foram utilizados: cloridrato de xilazina, cloridrato de cetamina e sal sódico de heparina (Roche); Pencivet® ppu (intervet), Tiopental sódico (Cristália), diosgenina, 17β - Estradiol, nitroprussiato de sódio (NPS), L-NAME (N^{G} -nitro-L-arginina-metil), o cloridrato de L-(-) fenilefrina (FEN), o cloridrato de acetilcolina (ACh), reagente de griss e Tween 80, proveniente do Sigma-aldrich St. Louis, MO, EUA.

Para a preparação das soluções-estoque, as drogas foram dissolvidas em água destilada e diluídas a concentrações adequadas. A diosgenina foi solubilizada em Tween 80 a 2% e diluído em salina ou água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações e doses, respectivamente, desejadas para cada protocolo experimental. Todas as soluções foram armazenadas a 0°C .

3.3 Solução nutritiva

A preparação das soluções nutritivas foi embasada na metodologia desenvolvida por Tanaka *et al.* (1999). Serão utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio anidro (MgCl_2), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio monoidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). A tabela 1 e 2 a seguir mostra a composição das mesmas:

TABELA 1: Composição da solução de Krebs Normal.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,7
NaHCO ₃	25,0
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,1
Glicose	11,0

Fonte: RIBEIRO et al., 2007.

TABELA 2: Composição da solução de Krebs despolarizante - KCl (80 mM).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	78,3
KCl	80,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,7
NaHCO ₃	25,0
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,1
Glicose	11,0

Fonte: RIBEIRO et al., 2007.

3.4 Indução da menopausa por ovariectomia

A regressão hormonal característica da pós-menopausa foi induzida pelo procedimento cirúrgico de ovariectomia. O preparo cirúrgico ocorreu pela realização de tricotomia e a assepsia na região dorsal bilateralmente para incisões superiores nas regiões da fossa ilíaca esquerda e direita. A incisão de caráter transversa e as tubas uterinas e os ovários identificados. Os últimos foram isolados por fio de sutura e logo em seguida retirados (AYDIN et al, 2013; RIBEIRO et al, 2011). A fim de minimizar risco de infecções relacionado ao procedimento invasivo foram adotados todos os métodos de prevenção e exposição mínima de submissão do animal ao estresse. Os anestésicos cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (14 mg/kg) por via intraperitoneal e o antibiótico 0,1 mL/100g i.m. de Pencivet® ppu, IM, como ação profilática foram administrados.

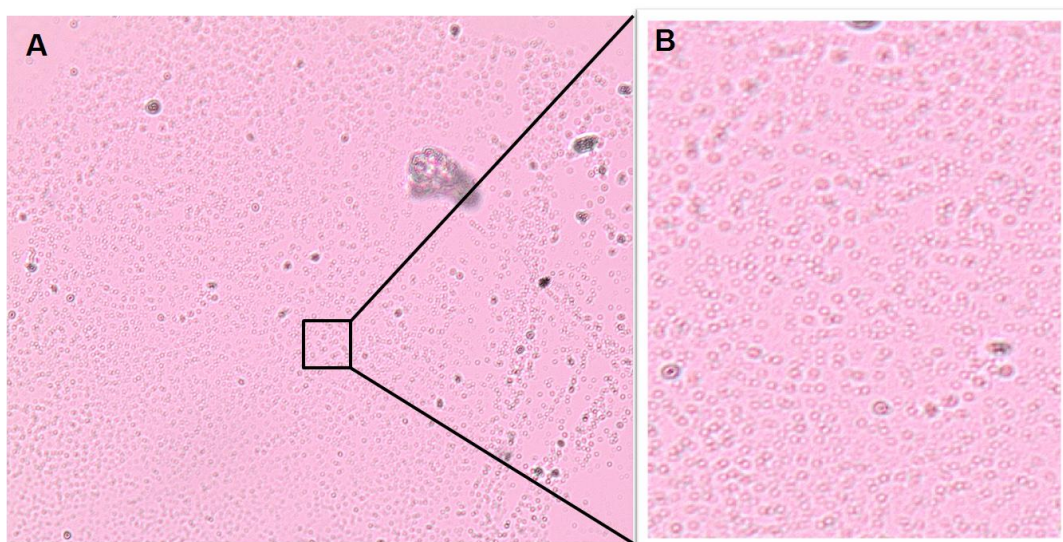
3.5 Citologia Vaginal

Para a padronização do parâmetro hormonal, realizou-se o esfregaço vaginal após 15 dias da ovariectomia. Segundo Ribeiro et al (2011), a citologia vaginal é um método indireto para avaliação das funções endócrinas referentes ao sistema reprodutivo feminino. Isso porque conforme o ciclo estral há um conjunto peculiar da proporção dos tipos celulares: células epiteliais nucleadas, células cornificadas e leucócitos. As ratas que apresentaram função hormonal preservada com as fases proestro, metaestro e estro foram incluídas para a realização da cirurgia.

O material para a citologia vaginal foi colhido com uma micropipeta confeccionada, a ser introduzido até o fundo vaginal, fazendo-se a injeção de água destilada no orifício e retirando a quantidade do líquido para captura da descamação das células epiteliais e em seguida colocadas em lâminas de vidro para análise *in loco* (DINIZ et al , 2011).

Ao final de 28 dias da ovariectomia, foi coletado novamente o esfregaço vaginal para constatação de hipostrogenismo (Diestro I e II) ou fase anestra, permanecendo apenas as ratas nessas condições (figura 6).

FIGURA 5. Fotomicrografia das laminas de lavado vaginal de rata fixado com álcool 95%, não - corado (aumento de 10x com seu correspondente em 40x), após 28 dias da retirada dos ovários. Período diestro II, representada pela presença majoritária de leucócitos e ausência de células cornificadas. Lavado vaginal (A) corte visual aleatório da lâmina (B).



3.6 Tratamento

O início do tratamento deu-se na 9^o semana após ovariectomia, período no qual a regressão hormonal contribui para o estabelecimento da sintomatologia da pos-menopausa, inclusive, alterações no controle pressórico. Dois tipos de avaliação foram realizados: aguda e crônica. A primeira em dose e dia único de administração por via endovenosa e a segunda ocorreu através da administração das substâncias por via oral durante 28 dias. As doses da diosgenina foram estabelecidas a partir do estudo de Okawara et al (2013) no qual há correlação entre a substância isolada, a diosgenina, e o consumo de inhame pela população para uso terapêutico. Para avaliação da atividade da diosgenina cronicamente, os animais deste estudo foram divididos em:

Animais após cirurgia	Substância administradas	Padronização do nome de cada grupo neste estudo
Sham (com ovários)	Salina	Sham
OVX (sem ovários)	Salina	Salina
	Diosgenina 25mg/Kg	Diosgenina 25mg/Kg
	Diosgenina 50mg/Kg	Diosgenina 50mg/Kg
	Estradiol 2,5µg/kg	Estradiol

3.7 Peso corporal e peso relativo de órgãos

As alterações na massa corporal foram observadas após o início tratamento. A mensuração na massa ocorreu nos dias 0, 7^o, 14^o e no 28^o. No último dia, os animais foram pesados antes do jejum e posteriormente, coletado sangue venoso. Em seguida, os órgãos fígado, os rins, coração, pulmão, baço e útero foram isolados para pesagem em balança de alta precisão. Na sequência, foi feita a correção dos pesos pelos respectivos pesos corporais dos animais.

3.8 Dosagens bioquímicas

Após os 28 dias da administração oral de salina, diosgenina (25 e 50 mg/kg, v.o.) e estradiol, os animais, após jejum de 12h, foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) e submetidos à coleta de sangue pela punção da veia cava. O sangue de cada animal foi colocado em tubos a vácuo com gel separador e centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm para a obtenção do soro e seguiu-se as determinações bioquímicas. Os parâmetros bioquímicos Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransaminase (AST), Fosfatase alcalina (FAL), uréia, creatinina, glicose, triglicérides, colesterol total e HDL foram realizadas em aparelho automático LABMAX PLENNO (LABTEST), com reagentes Labtest, conforme recomendação do fabricante.

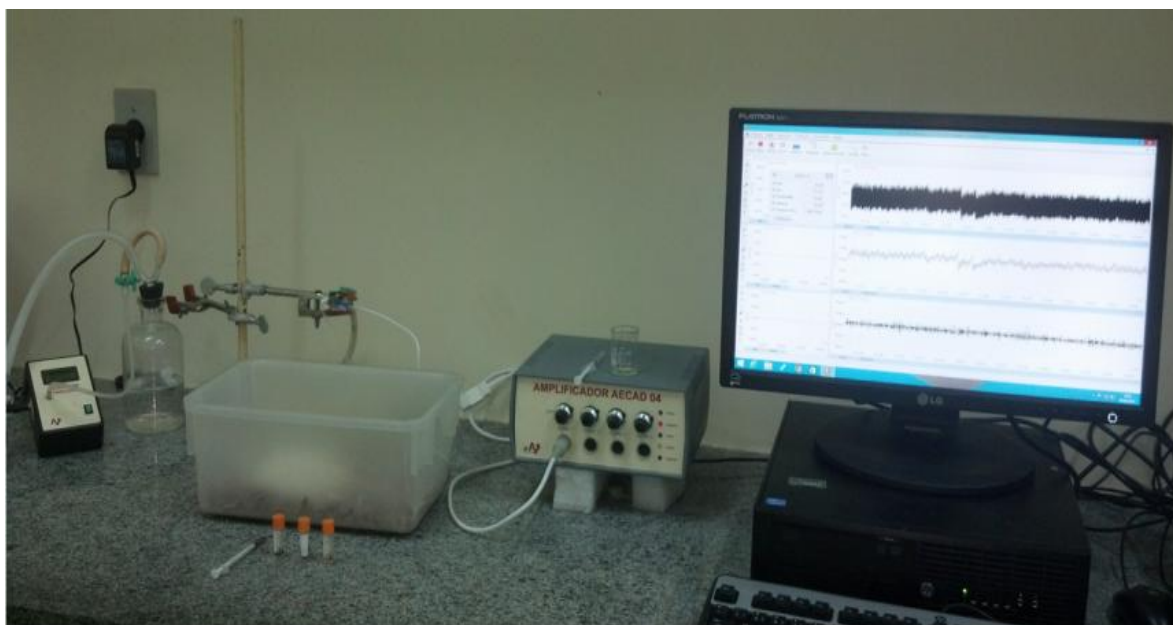
3.9 Registro da Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca(FC) em ratas OVX

Para realização do processo cirúrgico, utilizou-se o tiopental sódico na dose de 45 mg/kg, i.p. em indução de anestesia e realizou-se canulação das artéria e veia femurais esquerdas utilizando catéteres de polietileno: um segmento de PE-10 (4 cm - diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), conectado a um segmento de PE-50 (20 cm - diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente). Em seguida, à inserção e fixação, os catéteres foram colocados por via subcutânea e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*). Para manutenção do lúmen das cânulas pérvias, adicionou-se solução salina heparinizada (100 U/mL) imediatamente após a colocação e anteriormente ao registro do sinal da PA (OLIVEIRA et al., 1996).

A PA e FC foram medida 24 h após a cirurgia pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (AVS projetos – SP/Brasil) conectado a um microcomputador equipado com placa conversora analógico-digital e com o programa AQCAD (AVS projetos –

SP/Brasil) conforme figura 7. A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz.

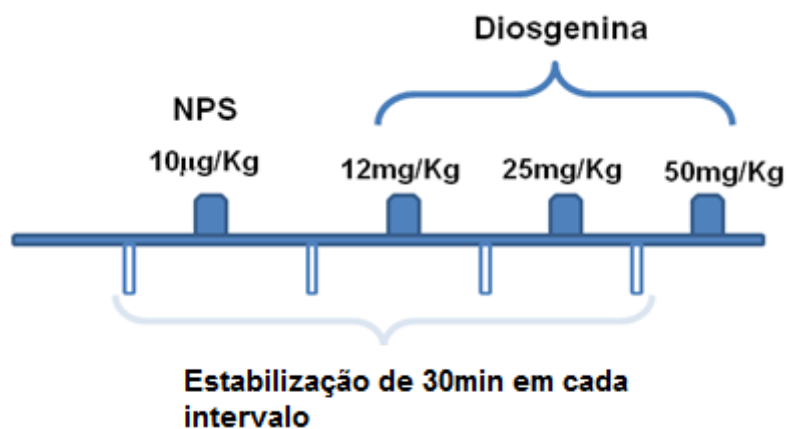
FIGURA 6. Aparato para medição de pressão arterial média após administração endovenosa da Diosgenina



Fonte: Arquivo do Laboratório de Cardiovascular - NPPM – UFPI

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, as medições foram realizadas conforme a descrição de Lahlou (2002). Os animais foram mantidos em aclimação por um período de no mínimo 30 minutos para estabilização dos parâmetros cardiovasculares (PA e FC) e em seguida administrou-se nitroprussiato de sódio –NPS (10 µg/Kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter. Após 30 minutos, doses crescentes diosgenina foram administradas com intervalos de tempo suficiente (± 30 min) para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Para controle, foi utilizado um grupo de animais ovariectomizados que receberam NPS (10 µg/Kg i.v.). Os valores de PA, FC máxima foram captados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração das substâncias, e suas variações foram expressas como diferença da pressão arterial final menos a inicial: $\Delta PA = PA_f - PA_i$, onde PA_f : pressão arterial final, PA_i : pressão arterial inicial (figura 8).

FIGURA 7. Representação esquemática de um protocolo experimental controle para o estudo do efeito da Diosgenina (12,5; 25mg/Kg, 50mg/Kg, i.v.) sobre a PA ou FC em ratas OVX.



3.10 Registro da Pressão Arterial Sistólica (PAS) em ratas OVX

O método adotado para a captação do sinal e registro da pressão arterial é similar ao modo mais frequente de aferição de pressão arterial sistêmica em humanos, através do esfigmomanômetro. Por essa técnica, é possível a verificação da pressão arterial de forma periódica, sem a necessidade de procedimento cirúrgico e para acompanhamento de tratamento crônico. A pressão arterial das ratas ovariectomizadas foi verificada no período compreendido entre 9 a 13 semanas após a ovariectomia. A técnica utilizada é um método indireto e não-invasivo de medir a pressão arterial sistólica - PAS em ratos. A captação do sinal foi feito através da colocação do manguito na cauda para obtenção de sinal da artéria caudal (WANG et al, 2013).

O registro da pressão arterial é bastante susceptível a alterações ambientais. Para minimizar os fatores externos que possam afetar o experimento, os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias no qual foi simulada todas as etapas do método de plestimografia de cauda. Após a aclimatização, as ratas ovariectomizadas foram colocadas em uma caixa de madeira 15cm x 30 cm x 45 cm, confeccionada para tal fim. Na caixa há uma lâmpada para aquecimento dos animais em uma temperatura em torno de 35°C durante 20min que proporciona a dilatação da artéria caudal e facilita a identificação mais fidedigna da pressão arterial. O animal foi colocado em uma segunda caixa com o contensor e o manguito na cauda é insuflado para ocluir o fluxo de sangue no vaso. Após alguns segundos, ocorreram a deflação automática do manguito acoplado a cauda do animal. Os sinais registrados foram enviados para o transdutor (ML125 NIBP Controller) acoplado ao manguito, gerando os

valores de pressão arterial que ao ser amplificado, foi visualizado através do software Labchart 7, na Figura 9, (ZHAO, 2011).

Pelo menos três ciclos consecutivos (inflação/deflação) foram realizados em cada rata para obter a média das PAS. Durante o registro dos sinais, a primeira aparição da onda de pressão durante a deflação será tida como a pressão sistólica. A pressão sanguínea foi mensurada após 60 dias da ovariectomia constituindo o T₀, T₇ e T₂₈ dias após o início do tratamento.

FIGURA 8. Sistema para aquisição de dados da Pressão Arterial caudal (ML125 NIBP Controller/ Labchart 7). Caixa de madeira com lâmpada para aquecimento dos animais em uma temperatura em torno de 35°C (Figura 7A). Contensor e o manguito na cauda (Figura 7B). Transdutor (ML125 NIBP Controller), amplificado e visualizado através do software Labchart 7 (Figura 7C).



Fonte: Arquivo do Laboratório de Cardiovascular - NPPM – UFPI

3.11- Estudo da Reatividade Vascular

3.11.1 Preparação de anéis de artérias aorta e isoladas em ratas OVX com endotélio intacto e endotélio removido.

Após eutanásia com tiopental sódico (100 mg/kg), foi realizada uma incisão no abdome do animal, e a aorta torácica foi retirada e livre de tecidos conectivos e adiposo, posteriormente seccionadas em anéis de 3 a 4 mm. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis foram suspensos individualmente por alças de aço inoxidável, em cubas de vidro (6 mL) contendo solução de Krebs Normal mantidos a 37° C, aeradas com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor

de força acoplado a um sistema de aquisição (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP), figura 10. As preparações foram estabilizadas por um período de 60 minutos, durante o qual foram mantidas sob uma tensão de repouso de 1g. Durante esse período, renovou-se a solução nutritiva a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, foram induzidas duas contrações com fenilefrina 10^{-6} M de magnitudes similares, e durante o componente tônico da segunda resposta foi adicionado 10^{-6} M de acetilcolina a todas as preparações para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADKI, 1980). O endotélio vascular foi considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento igual ou superior a 50% da pré-contração com fenilefrina $1\mu\text{M}$ (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). Quando o relaxamento foi inferior a 10% os anéis foram considerados sem endotélio funcional. Anéis que apresentaram relaxamentos entre 10 e 50% não foram utilizados (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

FIGURA 9. Sistema de aquisição de dados do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do NPPM - UFPI (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP).



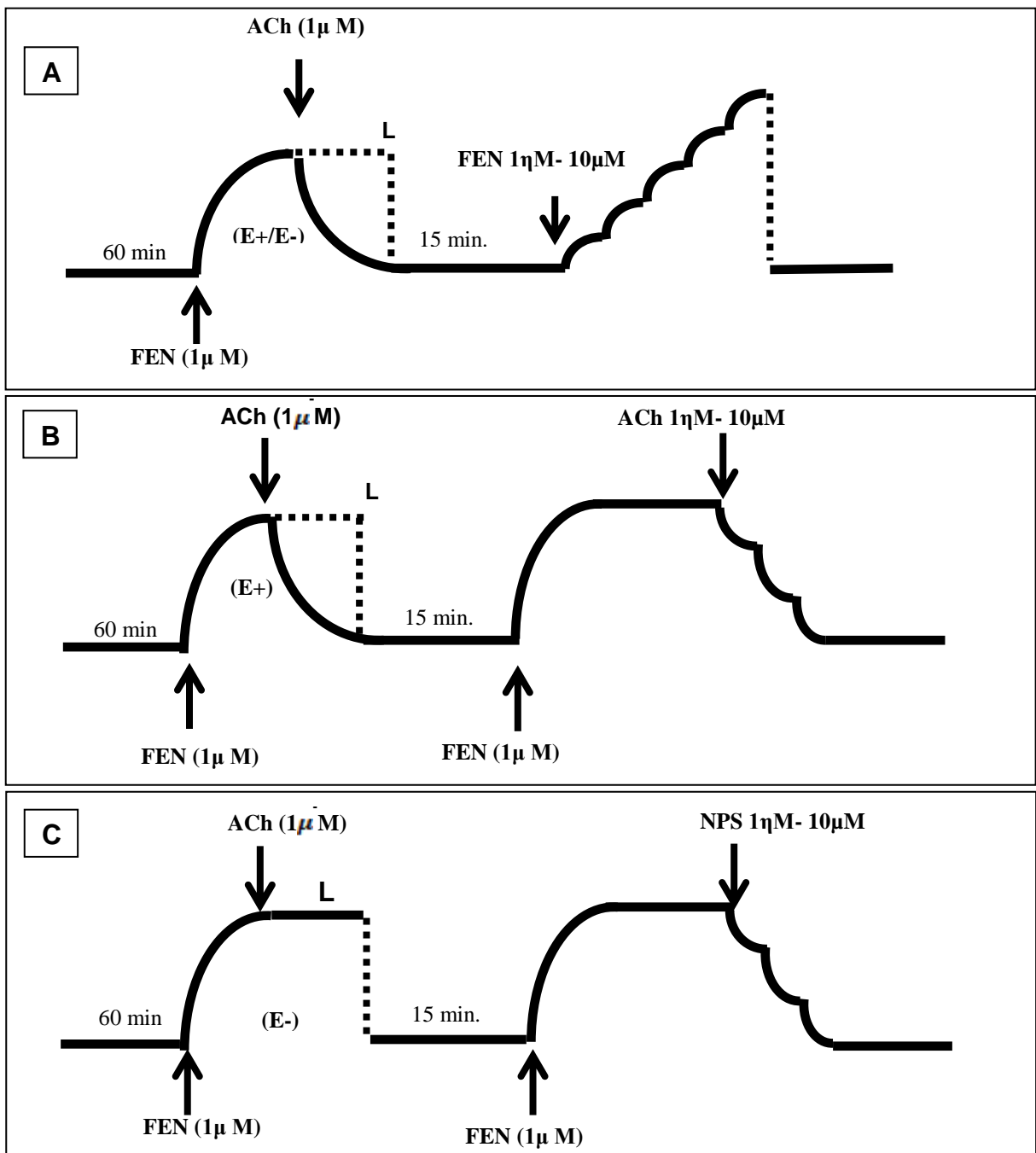
Fonte: Arquivo do Laboratório de Cardiovascular - NPPM – UFPI

3.11.2 Efeito do tratamento com a diosgenina 50 mg/Kg sobre as contrações induzidas por cumulativas de fenilefrina em anéis de aorta de ratas OVX.

Após 7 dias de tratamento com diosgenina 50mg/Kg e período de estabilização de 60min, foi obtida curva concentração-resposta com a adição de concentrações cumulativa de fenilefrina (1nM - $10\mu\text{M}$), figura 11.A. Em relação a reatividade a agentes vasorrelaxantes, os anéis de ratas OVX também tratadas pelo mesmo período foram pré-contraídas com

fenilefrina ($1\mu\text{M}$) e posteriormente colocada cumulativamente acetilcolina ($1\eta\text{M} - 10\mu\text{M}$), na presença de endotélio conforme 15.B e nos segmentos arteriais com endotélio removido NPS ($1\eta\text{M} - 10\mu\text{M}$). Após a obtenção das curvas concentração-respostas foram analisadas os valores de $E_{\text{máx}}$ das curvas individuais em ratas OVX.

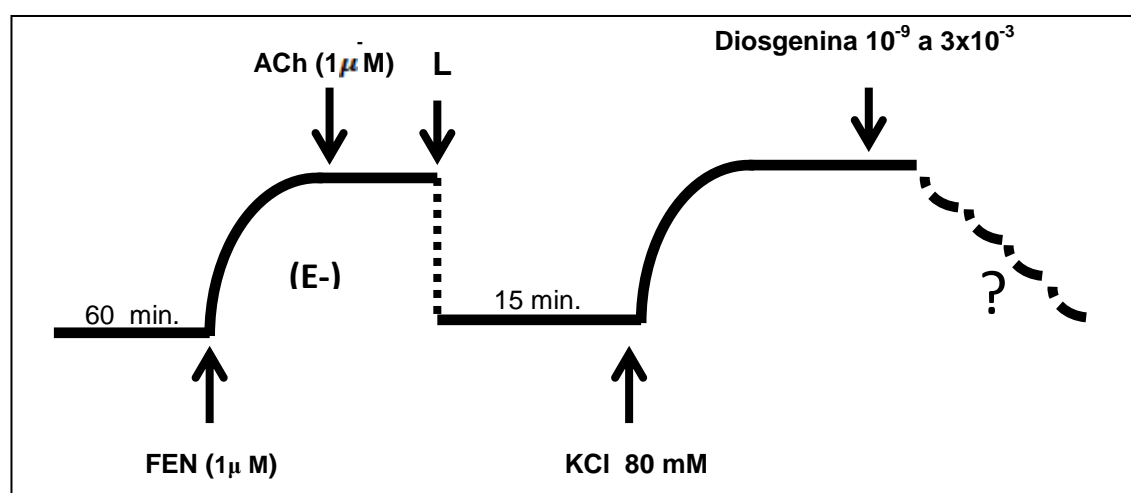
FIGURA 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reatividade vascular à FEN (A), Ach (B) e NPS (C) em anéis de artéria aorta com / sem endotélio funcional de rata OVX após tratamento de 7 dias de diosgenina 50mg/Kg. FEN = fenilefrina, E- = endotélio removido, ACh = acetilcolina, NPS = Nitroprussiato de sódio; L = lavagem, min.= minuto.



3.11.3 Efeito vasorrelaxante de diosgenina sobre contrações induzidas por fenilefrina ou KCl 80 mm em anéis de artéria aorta com sem endotélio de ratas ovx

Os anéis de artéria aorta com e sem endotélio vascular após foram pré-contraídos com fenilefrina ou uma solução de krebs modificado KCl 80 mm e na fase tônica da contração adicionou-se concentrações cumulativas de diosgenina (10^{-9} a 10^{-3}) para obtenção de uma curva concentração-resposta (figura 12).

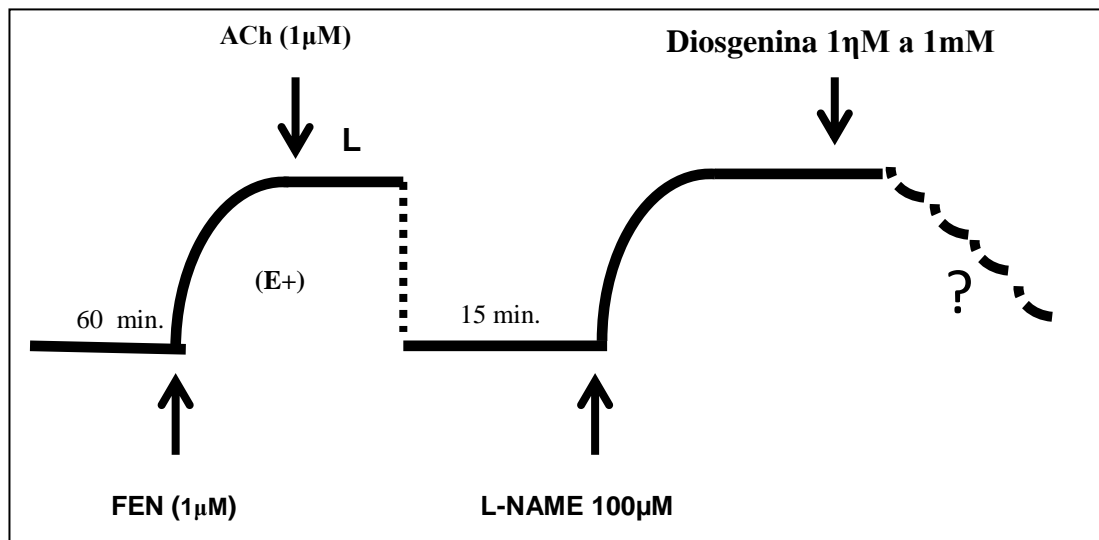
FIGURA 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reatividade vascular para a FEN em anéis de artéria aorta com e sem endotélio funcional de rata OVX após tratamento de 7 dias de diosgenina 50mg/Kg. FEN = fenilefrina, E- = endotélio removido, ACh = acetilcolina, L = lavagem, min.= minuto.



3.13.4 Verificação da participação do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante induzido por diosgenina

Após a verificação da presença de endotélio vascular as preparações foram pré-incubadas com N^G-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) por 40 min, procedimento realizado para inibir a eNOS, e conseqüente, produção de óxido nítrico. Em seguida na fase tônica de uma segunda contração com fenilefrina administrou-se diosgenina (1η a 1mM) cumulativamente. Em outra série de experimentos realizou-se uma curva concentração-reposta para a acetilcolina na presença de diosgenina (figura 13).

FIGURA 12: Representação esquemática do protocolo experimental para verificação da participação do óxido nítrico no efeito valorrelaxante induzido pela diosgenina em ratas OVX. FEN = fenilefrina, E- = endotélio removido, ACh = acetilcolina, L=NAME = N^G-Nitro-L-arginina metil éster; L = lavagem, min.= minuto.



3. 12 Atividade Antioxidante

3.12.1 Determinação de MPO no tecido cardíaco de ratas ovariectomizadas

O ensaio de MPO foi baseado no método de Bradley et al. (1982), onde 200 mg homogeneizados do tecido cardíaco foram centrifugados a 4000G durante 7 minutos a 4° C. Do sobrenadante, 100 µl foram recolhidos e adicionados a 1 mL de tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% e pH 6,0 seguida de centrifugação a 4500 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e adicionado à placa de 96 poços com posterior acréscimo de 50 µL da solução de leitura (H₂O destilada, tampão fosfato pH 6,0, H₂O₂ a 1% e O-dianisidina 0,167mg/mL). A atividade de MPO foi determinada por medição da alteração da absorbância a 450 nm em leitor de placa durante 5 minutos.

3.12. 2 Determinação de MDA no tecido cardíaco de ratas ovariectomizadas

O nível de MDA em tecidos homogeneizados de animais tratados foi determinado a partir do método de Mihara Uchiyama, que se baseia na reação com ácido tiobarbitúrico. Inicialmente, os fragmentos de tecido cardíaco com massa de 100 e 150mg foram homogeneizados com KCl frio (1,15%) a fim de obter o homogenato a 10%. Posteriormente,

250 µL desse homogenato foi adicionado a 1,5 mL de 1% de H₃PO₄ e 0,5 mL de 0,6% de ácido tiobarbitúrico (solução aquosa). Essa mistura foi agitada e aquecida em um banho de água a ferver durante 45 min e imediatamente resfriada em um banho de água gelada, seguido pela adição de 4 mL de n-butanol. A amostra após 1 min e da centrifugação a 1200 × g durante 10 min. evidenciou a camada de butanol. A densidade óptica foi determinada a 535 e 520 nm, e a diferença de densidade óptica entre as duas determinações foi calculada e considerada como valor ácido tiobarbitúrico. As concentrações de MDA foram expressas em nanomoles por grama de tecido.

3.12.3 Determinação da concentração de grupos sulfidrila não proteicos no tecido cardíaco de ratas ovariectomizadas

Conforme os procedimentos de Sedlak e Lindsay (1968). Da amostra, 100 µL sofreram precipitação pela adição de 200 µL de TCA 5% (ácido tricloroacético) e foram agitados em seguida. A mistura então foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi removido 75 µL do sobrenadante e adicionados 150 µL de Tris 0,4M EDTA 0,2 M pH 8,9 e 40 µL de ácido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de luz visível a 412 nm. A concentração de glutatona reduzida foi dada em mg/dL.

3.12.4 Concentração de superóxido dismutase (SOD) no soro de ratas ovariectomizadas

Para determinação da atividade da enzima superóxido dismutase foi utilizado o método descrito por Das, Samanta e Chayne (2000) no qual 100 µL da amostra é adicionada a 1110 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), 75 µL de L-metionina (20 mM), 40 µL de Triton X-100 (1% v/v), 75 µL de cloreto de hidroxilamina (10 mM) e 100 µL de EDTA (50 µM) seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 80 µL de riboflavina (50 µM) e as amostras ficaram expostas a luz durante 10 minutos. Ao fim, 100 µL do ensaio adicionou-se aos poços acrescidos de 100 µL do reagente de Griess e após 10 minutos em temperatura ambiente densidade óptica (absorbância) realizou-se a medida por espectrofotometria em leitor de ELISA (BioTek EL800), com um filtro de 550 nm (GREEN et al, 1982).

A curva de calibração adquirida pelo padrão o NaNO₂ (nitrito de sódio) nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0 µMol diluídos em água destilada. Uma unidade da atividade da enzima é definida como a quantidade de SOD capaz

de inibir em 50 % a formação de nitrito. O cálculo foi feito através da fórmula: $SOD = v_0/v_1$; onde v_0 é a absorbância do controle e v_1 é a absorbância do teste. Neste método, 36 ng de SOD inibem 50% da formação do nitrito. As concentrações de SOD foram expressas em nanograma por minuto.

3.12.5 Concentração do óxido nítrico no soro de ratas ovariectomizadas

Para quantificação da concentração do óxido nítrico no plasma, 200 μ L do plasma foram diluídos em água destilada (1:4 v.v.) para posterior deproteinização pela adição de 1/20 do volume de uma solução de sulfato de zinco na concentração de 300 g/L para atingir uma concentração final de 15 g/L. Em seguida, as amostras foram centrifugadas 1000 g por 15 min a temperatura ambiente (MOSHAGE et al 2005; ROMITELLI et al, 2007). Para determinação do óxido nítrico, 100 μ L do sobrenadante foi pipetado em cada poço da placa, seguido da aplicação de 100 μ L do reagente de Griess e após 10 minutos em temperatura ambiente a densidade óptica (absorbância) foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA (BioTek EL800), utilizando um filtro de 550 nm (GREEN; WAGNER; GLOGOWSKI et al, 1982). A curva de calibração foi adquirida tendo por padrão o NaNO_2 (nitrito de sódio) nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0 μ M diluídos em água destilada.

3.13 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Para os testes *in vivo* foram utilizados, quando necessário: ANOVA “one-way” com medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. Teste-t de *Student* não pareado para avaliar se há significância nas diferenças entre as médias. Foram analisados também, os parâmetros farmacológicos de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$). Os valores foram considerados significativamente diferentes quando o valor fosse $p < 0,05$. Em todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL E PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS

4.1.1 Avaliação do peso corporal após administração crônica de diosgenina em ratas OVX

Na Tabela 3 é apresentado o ganho ponderal da administração oral de salina, de diosgenina (25 e 50mg/Kg) e estradiol durante o período de 28 dias, onde verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no grupo salina em relação ao início do tratamento. Os grupos sham, salina, diosgenina 25mg/Kg e diosgenina 50mg não obtiveram alterações significativas durante a administração oral das substâncias utilizadas.

TABELA 3. Efeito do tratamento crônico de diosgenina sobre ganho ponderal de ratas OVX durante administração oral de diosgenina em T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ dias. Os valores são expressos em g/100 g de animal (n=5), a $p < 0,05$, comparados ao grupo sham.

Tempo (dias)	SHAM	OVX			
	Salina	Salina	25mg	50mg	Estradiol
7	-2,61±1,00	5,94±0,60	-1,81±0,15	-1,10±0,71	-3,61±0,23
14	1,00±0,03	3,32±1,40	0,51±0,02	0,00±0,00	2,04±0,12
21	4,3±0,06	5,61±0,71	1,00±0,04	3,11±0,33	2,00±0,70
28	4,5±1,20	9,25±1,32	2,23±0,71	4,12±0,51	-1,0±0,02

4.1.2 Avaliação da massa relativa de órgãos após administração crônica de diosgenina em ratas OVX

A Tabela 2 mostra a massa relativa dos órgãos pulmão, coração fígado, rins e útero das ratas adultas sham e ovariectomizadas. Nos dois primeiros órgãos citados não observou-se alteração significativa ($p < 0,05$) desse parâmetro entre os grupos. O fígado ($4,04 \pm 0,19$, n=5) e os rins ($0,77 \pm 0,03$, n=5) por sua vez, apresentaram aumento de peso no grupo estradiol em relação aos demais. A massa do útero obteve variações expressivas entre os grupos. No grupo salina houve redução de massa uterina e no grupo estradiol ($0,42 \pm 0,06$, n=5), contrariamente, mostrou uma elevação do peso relativo desse órgão. Os animais que

receberam diosgenina 25mg/Kg e 50mg/Kg durante 28 dias não demonstraram alterações significativas da massa dos órgãos.

TABELA 4. Efeito do tratamento crônico de diosgenina sobre massa relativa de órgãos coração, pulmão, rins, fígado, baço e útero em modelo de menopausa induzida por ovariectomia. Os valores são expressos em g/100 g de animal. Os dados representam a média \pm EPM. A diferença significativa $p > 0,05$ entre os grupos: a (ANOVA duas via, teste de Bonferroni).

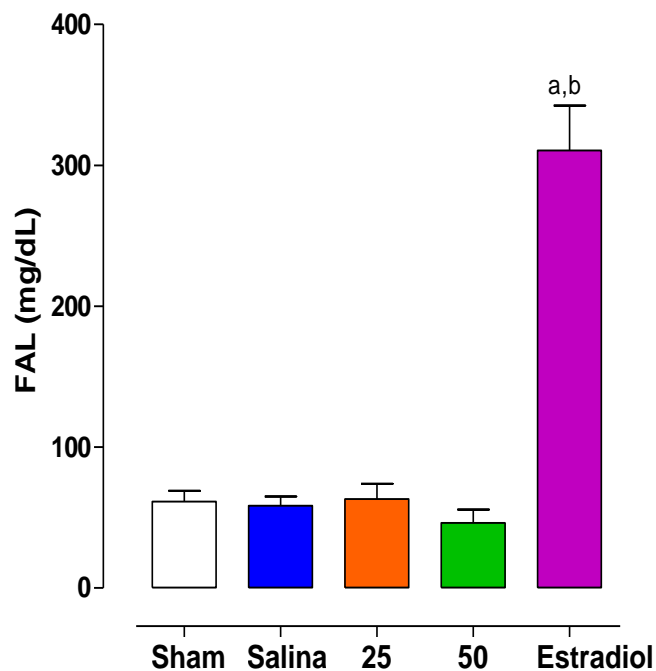
Órgãos	SHAM	OVX			
	Salina	Salina	25mg	50mg	Estradiol
Pulmões	0,69 \pm 0,09	0,66 \pm 0,03	0,65 \pm 0,05	0,55 \pm 0,14	0,60 \pm 0,04
Coração	0,40 \pm 0,05	0,33 \pm 0,01	0,34 \pm 0,08	0,30 \pm 0,07	0,4 \pm 0,04
Fígado	2,73 \pm 0,06	2,41 \pm 0,11	2,35 \pm 0,07	2,30 \pm 0,09	4,04 \pm 0,19 ^a
Rins	0,60 \pm 0,2	0,55 \pm 0,10	0,55 \pm 0,03	0,53 \pm 0,126	0,77 \pm 0,03 ^a
Útero	0,30 \pm 0,08	0,05 \pm 0,01	2,98 \pm 0,07	0,38 \pm 0,03	0,41 \pm 0,06

4.2 FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL

4.2.1 Efeito da administração oral crônica de diosgenina sobre a função hepática em ratas OVX

Para avaliar o efeito da diosgenina sobre a função hepática após 28 dias de tratamento, realizou-se a dosagem de fosfatase alcalina. Nos grupos sham (61,3 \pm 7,7mg/dL, n=9), salina (58,4 \pm 6,7mg/dL, n=8), diosgenina 25 mg/Kg (63,2 \pm 10,7mg/dL, n=6) e 50 mg/Kg (46,25 \pm 9,5mg/dL, n=4) não houve alterações significativas entre eles. O grupo OVX estradiol (300,66 \pm 31,7, n=4), porém, demonstrou elevação de 19,7% dos níveis de fosfatase alcalina em relação ao grupo sham e 18,8 %, quando comparado ao grupo salina (figura 14).

FIGURA 13 - Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a fosfatase alcalina em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, $n = 4-9$).

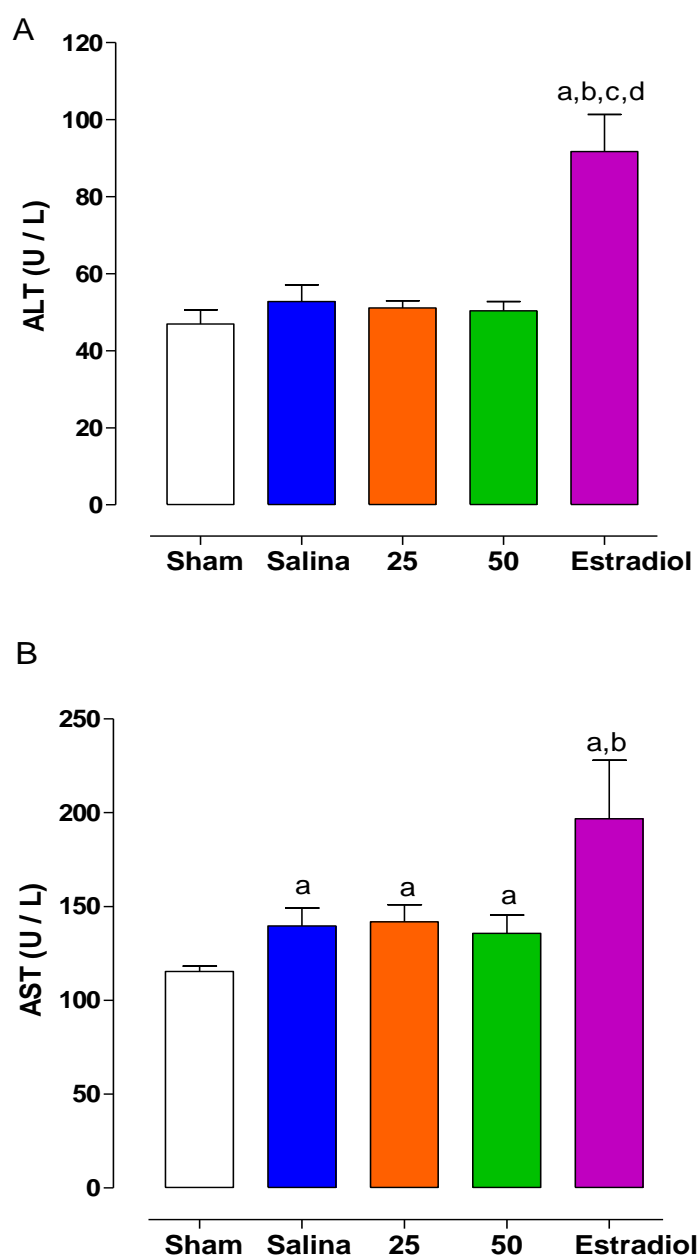


4.2.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre alanina ALT e AST em ratas OVX

A análise bioquímica da enzima hepática ALT a partir do soro dos animais, apresentada na figura 11, foi obtida a partir das médias das concentrações de ALT obtidos nos diferentes grupos sham ($47,0 \pm 3,7$ U/L, $n = 10$) e OVX tratados com salina ($51,0 \pm 4,3$ U/L, $n = 9$), diosgenina 25 mg/Kg ($51,1 \pm 1,8$ U/L, $n = 7$), diosgenina 50 mg/Kg ($50,4 \pm 2,4$ U/L, $n = 6$) e estradiol ($91,7 \pm 9,6$ U/L, $n = 5$), na qual constatou-se que houve diferença significativa em torno de 80 % desse parâmetro em relação aos grupos sham e salina (figura 15.A). De forma diferente do marcador de alteração hepática anterior, observa-se que houve alterações significativas ($p < 0,05$) em todos os grupos na qual houve a indução da menopausa, constatado pela elevação de 18% nos níveis de AST do grupo sham em relação ao grupo salina. Os níveis de AST nos grupos foram: $115,4 \pm 2,8$ U/L, $n = 9$ (sham); $139,7 \pm 9,5$ (salina); $141,8 \pm 9,2$ U/L, $n = 7$ (diosgenina 25 mg/Kg); $135,8 \pm 9,7$ (diosgenina 50mg/Kg), $196,7 \pm 31,2$ U/L, $n = 5$ (estradiol) em relação ao grupo e entre o grupo sham ($115,4 \pm 2,81$ U/L, $n = 9$). No grupo

estradiol, além da elevação desse parâmetro em relação ao grupo sham, há um aumento dos níveis de AST entre os demais grupos de cerca de 40%, como mostrada na figura 15.B.

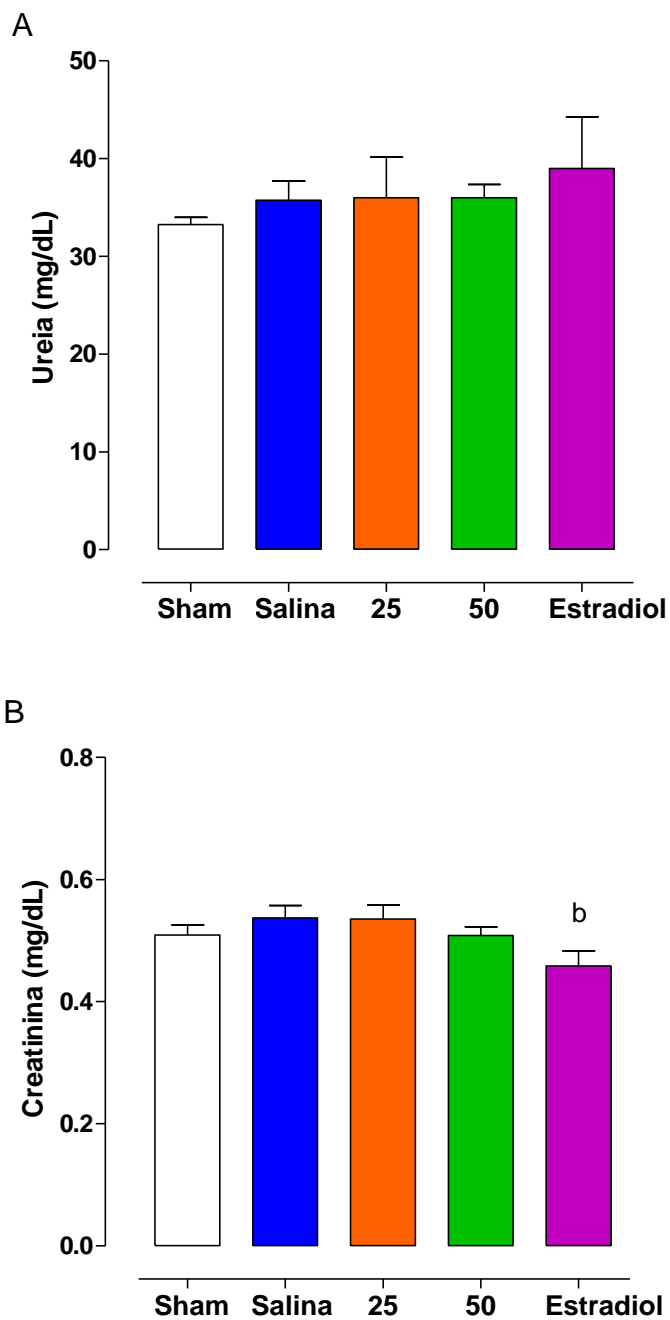
FIGURA 14. Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a ALT (A) e AST (B) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina; c diosgenina 25mg/Kg; d – diosgenina 50mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, $n = 4-10$).



4.2.3 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a função renal ratas OVX

Os níveis séricos de ureia dosados em animais submetidos ao jejum de 12h não foram significativamente diferentes entre os grupos analisados sham ($33,2 \pm 0,7$ mg/dL, n=4), salina ($35,7 \pm 1,9$ mg/dL, n=4), diosgenina 25mg/Kg ($36,0 \pm 4,1$ mg/dL, n=4) e diosgenina 50mg/Kg ($36,0 \pm 1,35$ mg/dL, n=4) e estradiol ($39 \pm 5,30$ mg/dL, n=4), resultado apresentado figura 16. A. Em relação aos níveis de creatinina não houve elevação dessa taxa do grupo sham ($0,51 \pm 0,01$ mg/dL, n=10) em relação aos demais. Em relação ao grupo salina ($0,54 \pm 0,02$ mg/dL, n=11) também não houve diferença significativa entre os grupos, exceto no grupo que recebeu estradiol durante os 28 dias promoveu a redução de 11,8% dos níveis de creatinina em relação ao grupo salina . O tratamento com diosgenina 25mg/Kg ($0,51 \pm 0,01$, n=6) e 50mg/Kg ($0,50 \pm 0,01$,n=5) não alterou as taxas de creatinina (Figura 16. B).

FIGURA 15 - Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a uréia (A) e creatinina (B) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, $n = 4-11$).

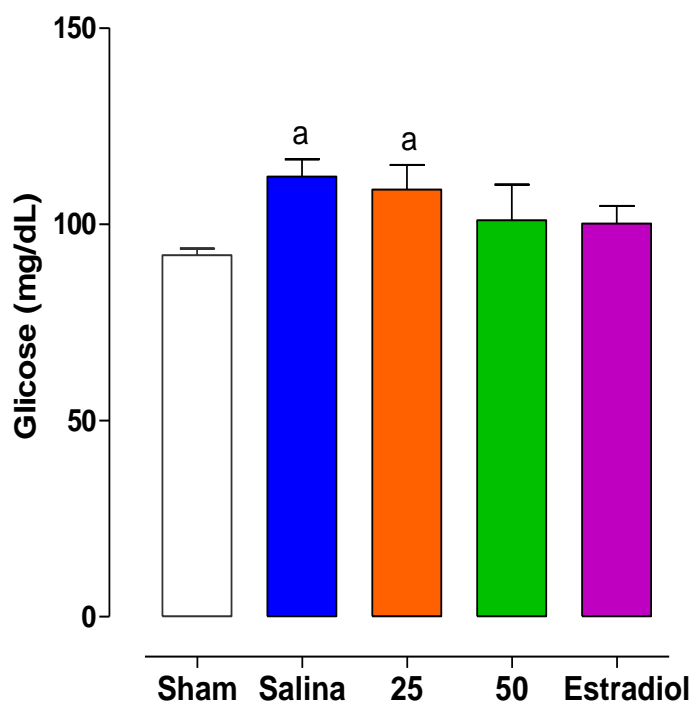


4.3 MARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

4.3.1 Efeito da administração oral crônica de diosgenina sobre glicose plasmática em ratas OVX

Um parâmetro de grande importante da avaliação metabólica é glicemia após jejum de 12h dos animais. Como isso, pode-se observar que a indução da menopausa por ovariectomia promoveu o aumento dos níveis de glicose sérica, uma vez que o grupo salina ($112,1 \pm 4,4$ mg/dL, n=9) apresentou uma elevação de 17,9% em relação ao grupo sham ($92,1 \pm 1,7$, n=9), comportamento semelhante ocorreu no grupo diosgenina 25mg/Kg. A administração oral crônica de diosgenina 50 mg/Kg ($101,0 \pm 9,1$ mg/dL) e estradiol ($100,2 \pm 4,4$ mg/dl) não promoveu alteração significativa da glicemia em relação ao sham e não obtiveram aumento glicêmico dos demais grupos OVX, como referenciados na figura 17.

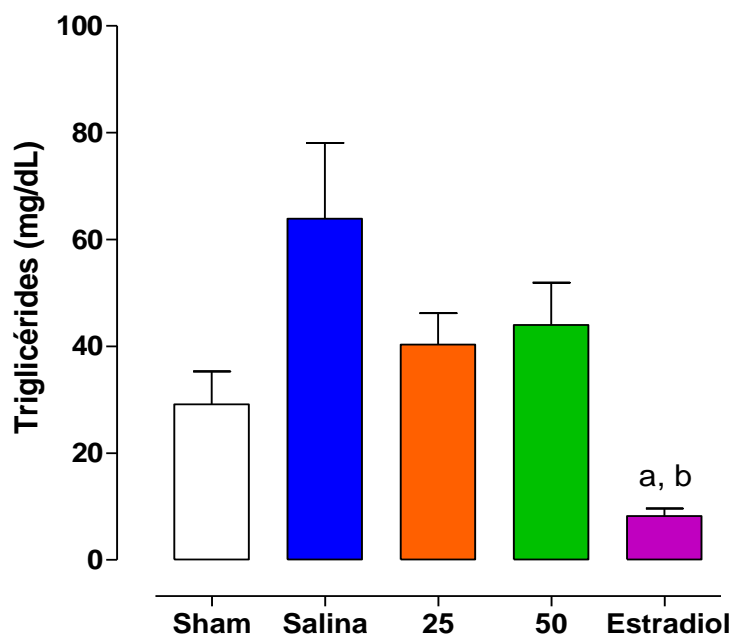
FIGURA 16: Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre glicose sérica em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 6).



4.3.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre o triglicérides em ratas OVX

Os níveis de triglicérides dosados em ratas após jejum de 12h foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre o grupo sham ($29,2 \pm 6,2 \text{ mg/dL}$, $n=6$) e o grupo OVX tratados com salina ($63,9 \pm 14,2 \text{ mg/dL}$, $n=10$). Os grupos ovariectomizados tratados com diosgenina 25 ($40 \pm 5,87 \text{ mg/dL}$, $n=7$) e 50 mg/Kg ($44,0 \pm 7,94 \text{ mg/dL}$, $n=5$) não obtiveram alterações nas taxas de triglicérides. O grupo de ratas OVX tratadas com estradiol ($8,25 \pm 1,37 \text{ mg/dL}$, $n=4$) apresentou redução desse parâmetro em relação ao grupo sham e ao grupo salina (Figura 18).

FIGURA 17: Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre os triglicérides em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, $n= 6$).



4.3.3 Efeito da administração oral crônica de diosgenina sobre níveis séricos de Colesterol (CT) em ratas OVX

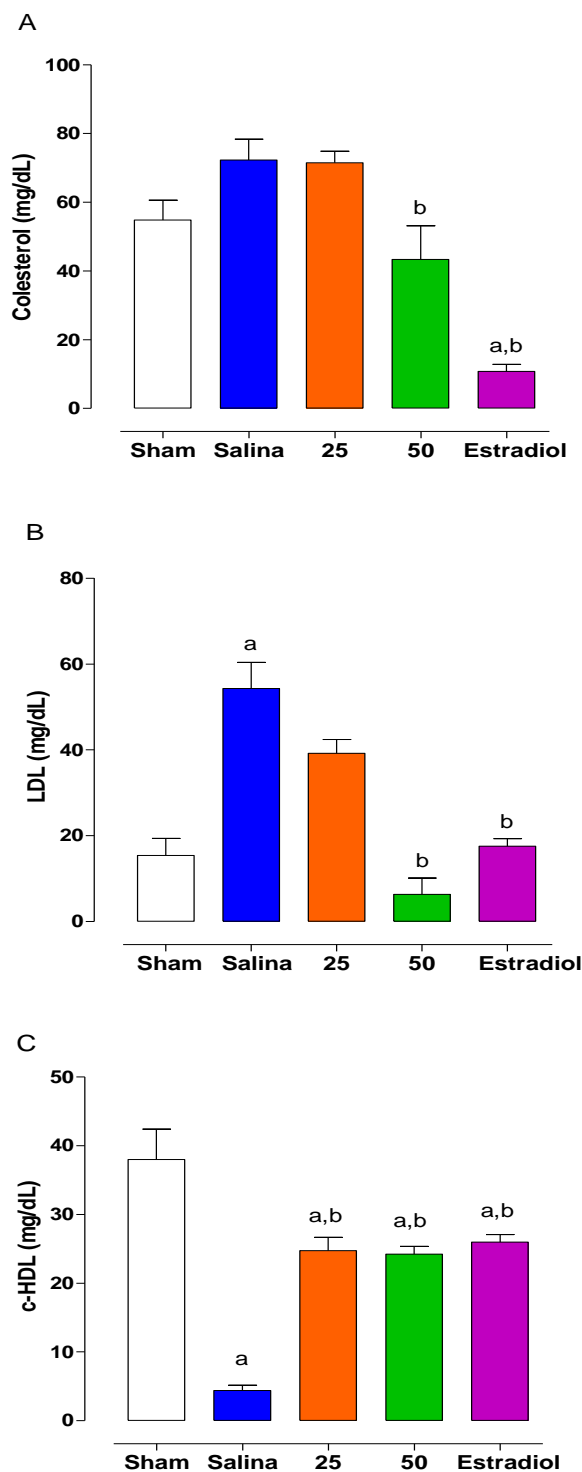
A análise dos níveis séricos de colesterol não mostrou diferença significativa entre os grupos sham ($54,8 \pm 5,7 \text{ mg/dL}$, $n=7$), salina ($72,2 \pm 6,1 \text{ mg/dL}$, $n=4$) e diosgenina 25 mg/Kg ($71,5 \pm 3,37 \text{ mg/dL}$, $n=4$). Observou-se, porém que a taxa de colesterol de animais tratados

com a dose de diosgenina 50 mg/Kg foi reduzida ($43,3 \pm 9,8$ mg/dL) significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina. Quanto ao grupo de ratas OVX que receberam estradiol ($10,75 \pm 2,05$), a diminuição da taxa de colesterol foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo sham e salina, já citados (Figura 19. A)

Para continuidade da avaliação de risco cardiovascular foi observada que a privação hormonal do grupo salina ($54,3 \pm 6,1$ mg/dL, n=4) contribuiu para elevação em relação ao grupo sham ($15,4 \pm 3,9$ mg/dL, n=6). O grupo OVX tratadas com diosgenina 25 ($39,3 \pm 3,2$ mg/dL, n=6) não apresentou alterações em relação aos demais grupos. O grupo OVX tratado com diosgenina 50mg/Kg ($6,3 \pm 3,8$ mg/dL, n=6) e OVX que receberam estradiol ($17,5 \pm 1,7$ mg/dL, n=6) demonstraram redução significativa ($p < 0,005$) em do c-LDL relação ao grupo salina representada na figura 19.B.

Em relação aos níveis séricos de c-HDL, houve uma redução significativa desse parâmetro no grupo salina ($4,4 \pm 0,74$, n=5) em relação ao grupo sham ($38,0 \pm 4,40$). Os demais grupos que receberam diosgenina 25 mg/Kg ($24,75 \pm 1,93$ mg/dL, n=4) e 50 mg/kg ($24,25 \pm 1,1$ mg/dL, n=4) e grupo estradiol ($26,00 \pm 1,09$ mg/dL, n=4), conforme visualizado na Figura 19.C.

FIGURA 18: Efeito da Diosgenina (25 e 50 mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre CT (A), c-LDL (B) e c-HDL (C) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina; c- diosgenina 25mg/Kg; d – diosgenina 50mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, $n = 4$).



4.4 PRESSÃO ARTERIAL

4.4.1 Efeito da administração intravenosa de diosgenina sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratas OVX

A administração de diosgenina nas doses (25 e 50 mg/kg) por via intravenosa em ratas OVX resultou na redução da PAM em ambas as doses. O grupo controle no qual foi administrado apenas NPS obteve uma redução da PAM de $22,0 \pm 6,9$ mmHg (n=5) e os animais OVX que receberam diosgenina 25mg/Kg, $15,61 \pm 3,5$ mmHg (n=5), e 50mg/Kg, $25,07 \pm 2,19$ mmHg, (n=5). Nota-se que a maior dose de diosgenina utilizada teve um efeito hipotensor 12,3% superior ao NPS, um vasodilatador potente. A FC teve resposta contrária a do grupo controle. Neste caso, o NPS apresentou taquicardia ($13,9 \pm 6,8$ bpm), enquanto a diosgenina de 25mg/Kg ($20,8 \pm 2,0$ bpm, n=5) e 50mg/Kg promoveu bradicardia (figura 20/figura 21)

FIGURA 19 – Registros originais mostrando o efeito da diosgenina 25 e 50mg/Kg via endovenosa sobre a PAM em ratas OVX não anestesiadas

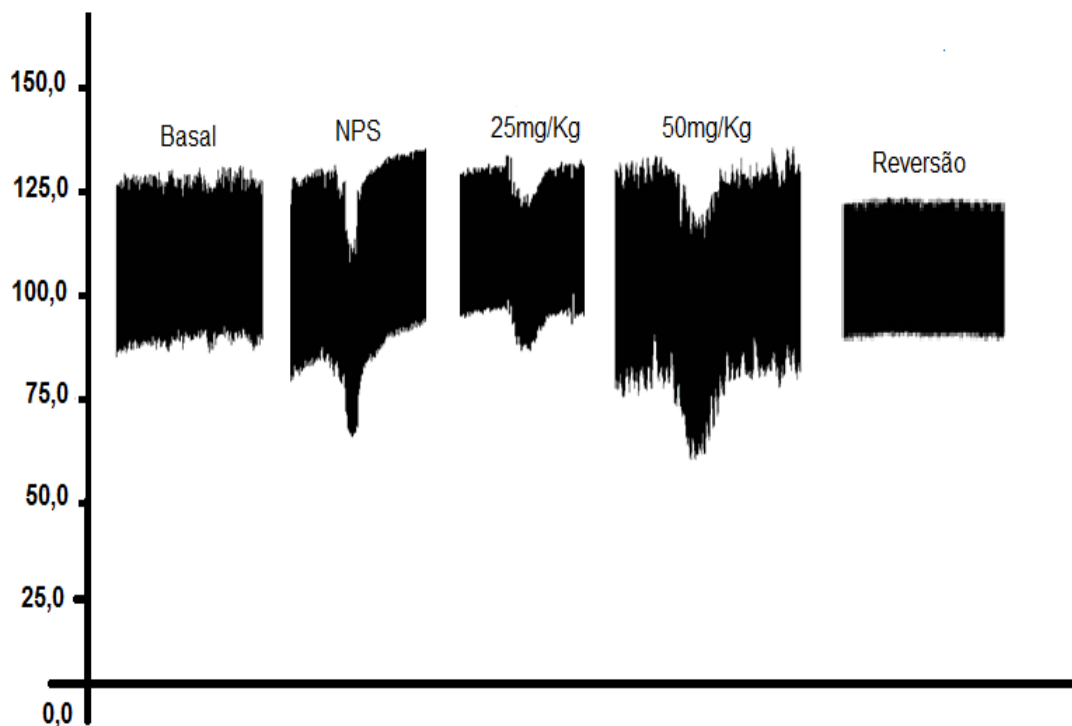
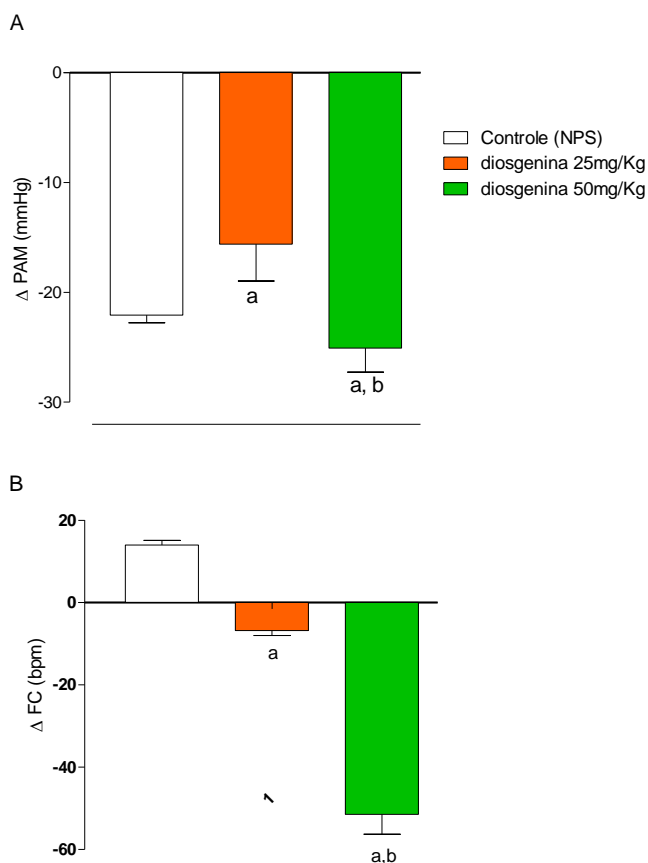


FIGURA 20: Efeito da diosgenina (25 e 50 mg/Kg) sobre pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em ratas OVX. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M.. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – controle; b- diosgenina 25mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, $n=5$).



4.4.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a pressão arterial sistólica em ratas OVX

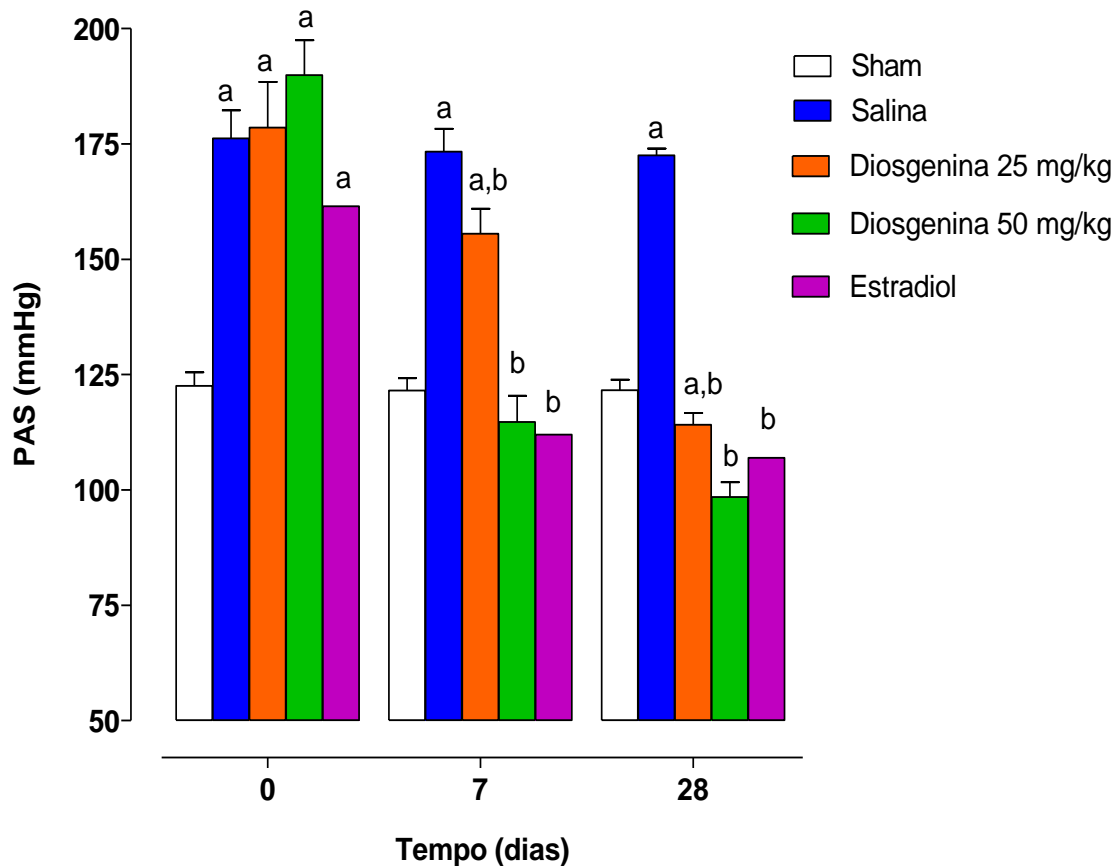
A deficiência dos hormônios femininos promoveu um aumento da pressão arterial sistólica em ratas OVX em torno de 30,5% em relação ao grupo não ovariectomizado, o sham. Essa elevação evidente em todos os grupos em que foi induzida a menopausa com a ovariectomia constatado entre os grupos salina ($176,20 \pm 6,1$ mmHg, $n=5$), diosgenina 25 mg/Kg ($178,6 \pm 9,9$ mmHg, $n=5$), diosgenina 50 mg/Kg ($189,9 \pm 7,5$ mmHg, $n=5$) e estradiol ($161,47 \pm 3,85$ mmHg, $n=5$) em relação ao grupo sham ($122,56 \pm 2,9$ mmHg, $n=6$). Esses valores foram obtidos antes do início dos tratamentos.

Observa-se também que a elevação pressórica decorrente da ovariectomia permanecem durante os 28 dias no grupo salina em T0 ($176,2 \pm 6,1$ mmHg, $n=5$), T7 ($173,4 \pm 4,9$ mmHg, $n=5$) e T28 ($172,55 \pm 1,5$ mmHg, $n=5$). Nos animais que receberam tratamento

com diosgenina, por sua vez, é constatado que em 7 dias de administração diária de uma dose de 25mg/Kg e também na dose de 50 mg/kg há redução significativa da PAS em relação ao grupo salina, cerca de, 22,6% e 40,13 %, respectivamente. A redução da PAS pela diosgenina persistiu após 28 dias em ambas as doses. A dose de 50mg/kg apresentou maior redução ($98,50 \pm 3,2$ mmHg, n=5) em torno de 42,9% em relação ao grupo salina ($172,55 \pm 1,2$ mmHg, n=5). A atenuação dos parâmetros pressóricos da diosgenina é superior em 8% ao efeito hipotensor do estradiol em relação ao grupo estradiol.

O estradiol (controle positivo) nos tempo T0, T7 e T28 apresentou redução da pressão arterial em relação ao grupo sham e grupo salina nos tempos T0, T7 e T28 dias, efeito em conformidade com a literatura (Figura 22).

FIGURA 21 - Efeito da Diosgenina durante 28 dias sobre a Pressão Arterial Sistólica em ratas OVX. Os valores após registro da PAS que ocorreu após 60 dias da cirurgia de ovariectomia em três momentos: no dia 0, 7 e 28 de tratamento administração das substâncias. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina; c- diosgenina 25mg/Kg; d – diosgenina 50mg/Kg (ANOVA Two- Way seguido de pós-teste de Bonferroni, n=5).

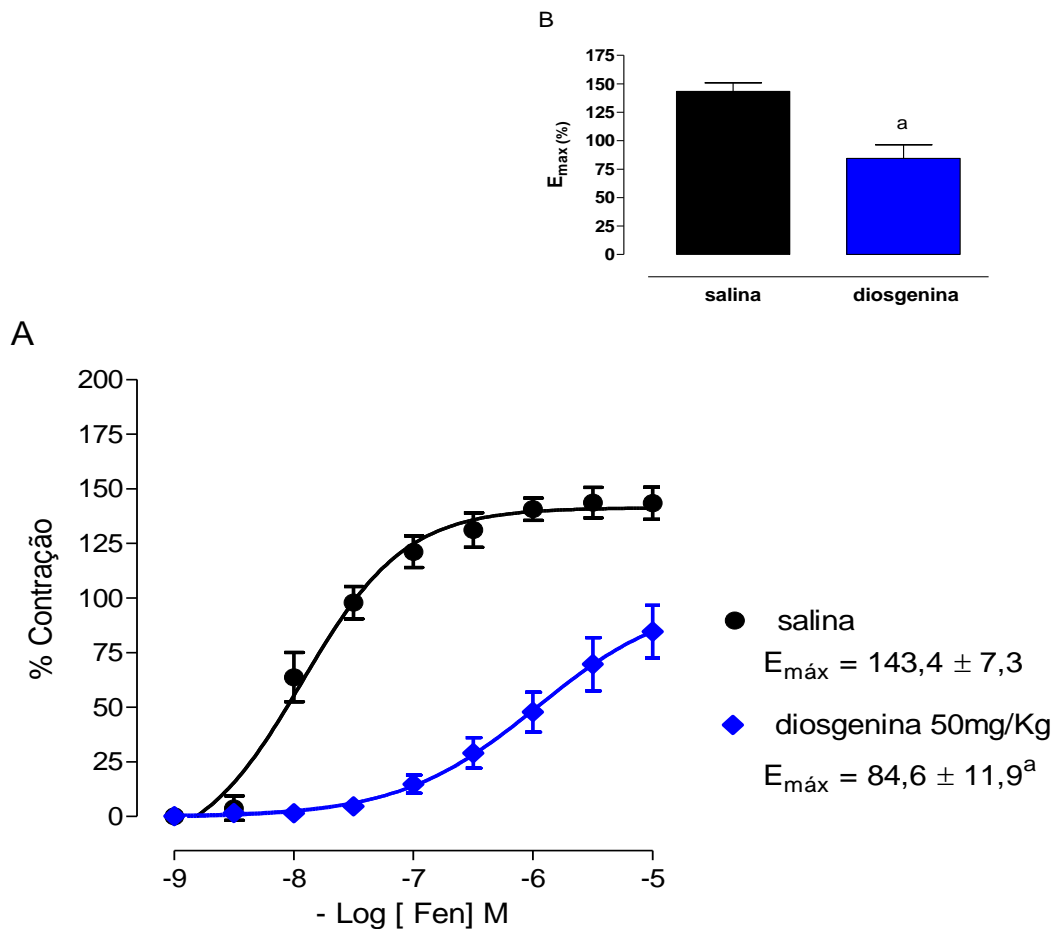


4.5 REATIVIDADE VASCULAR

4.5.1 Influencia do tratamento com diosgenina 50 mg/Kg sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratas OVX.

Após o tratamento por 7 dias com diosgenina 50 mg/Kg observou-se que contração induzida por adição cumulativa de fenilefrina foi superior nos segmentos arteriais dos animais do grupo salina ($143,4 \pm 7,3$ %). Ao passo que, em artéria de ratas OVX que receberam diosgenina 50mg/kg, observou-se que o nível de contração vascular foi reduzido em ($84,6 \pm 11,9\%$) com relação a ambos os grupos. Os resultados apresentados demonstraram que a o tratamento com diosgenina 50 mg/Kg inibiu a resposta contráctil da fenilefrina em anéis de aorta de ratas OVX em relação ao grupo salina (Figura 23 A.B).

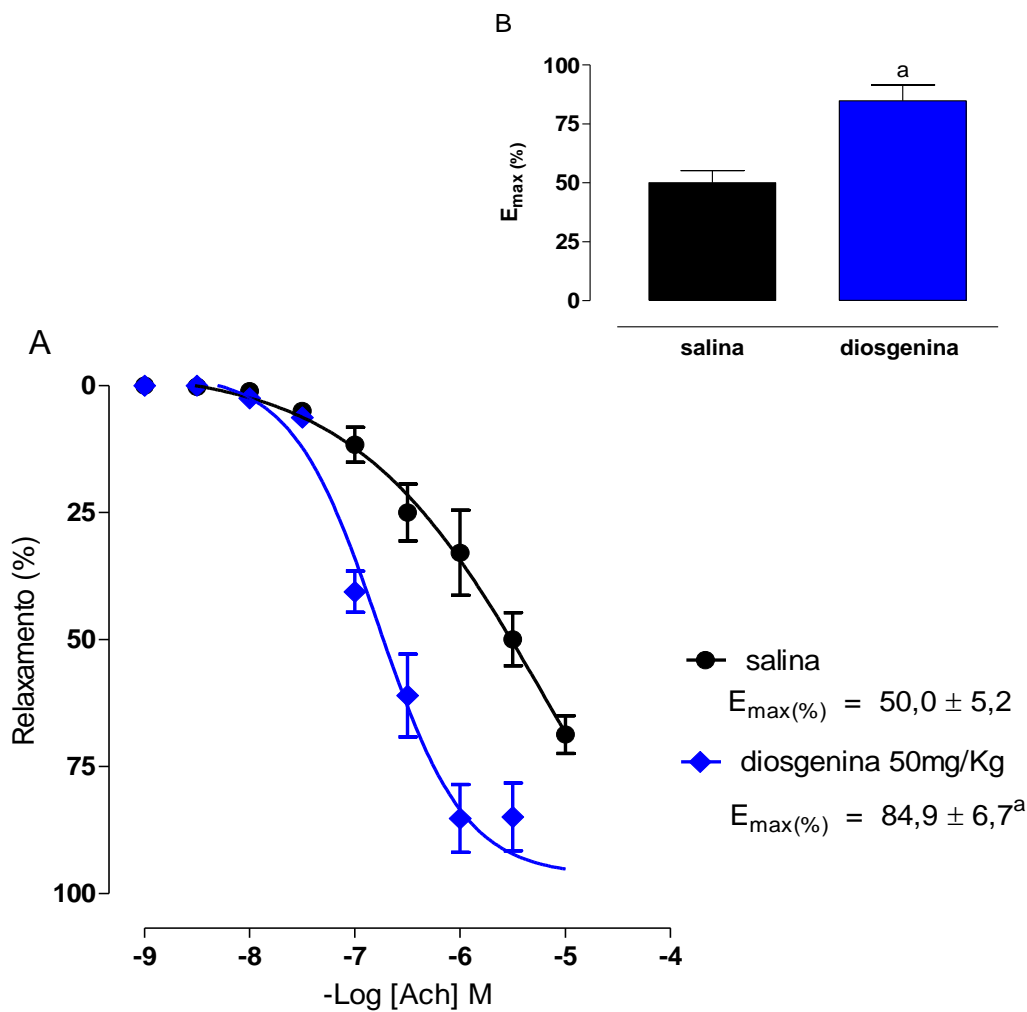
FIGURA 22: Curvas concentração- resposta à FEN ($1\eta\text{M}$ a $1\mu\text{M}$) em anéis de artéria aorta de ratas OVX após administração oral de salina (●) ou de diosgenina 50mg/Kg (◆) por 7 dias. Teste *t-student* não-pareado entre os grupos, $n= 4$, $p<0,05$: a – diosgenina vs OVX



4.5.2 Efeito do tratamento de diosgenina sobre a resposta vasorrelaxante induzida por acetilcolina em anéis de artéria aorta de ratas ovx.

Para avaliar o efeito da administração oral de diosgenina sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina ($1\eta\text{M}^9$ a $1\mu\text{M}$). Observa-se que os segmentos arteriais de ratas OVX possuíram um efeito vasorrelaxante de $E_{\text{máx}(\%)}: 50,0 \pm 5,2$ e que o tratamento por 7 dias com diosgenina 50 mg/kg aumentou essa resposta vascular relaxante atribuída à acetilcolina para $E_{\text{máx}(\%)}: 84,9 \pm 6,7$ (Figura 24 A.B).

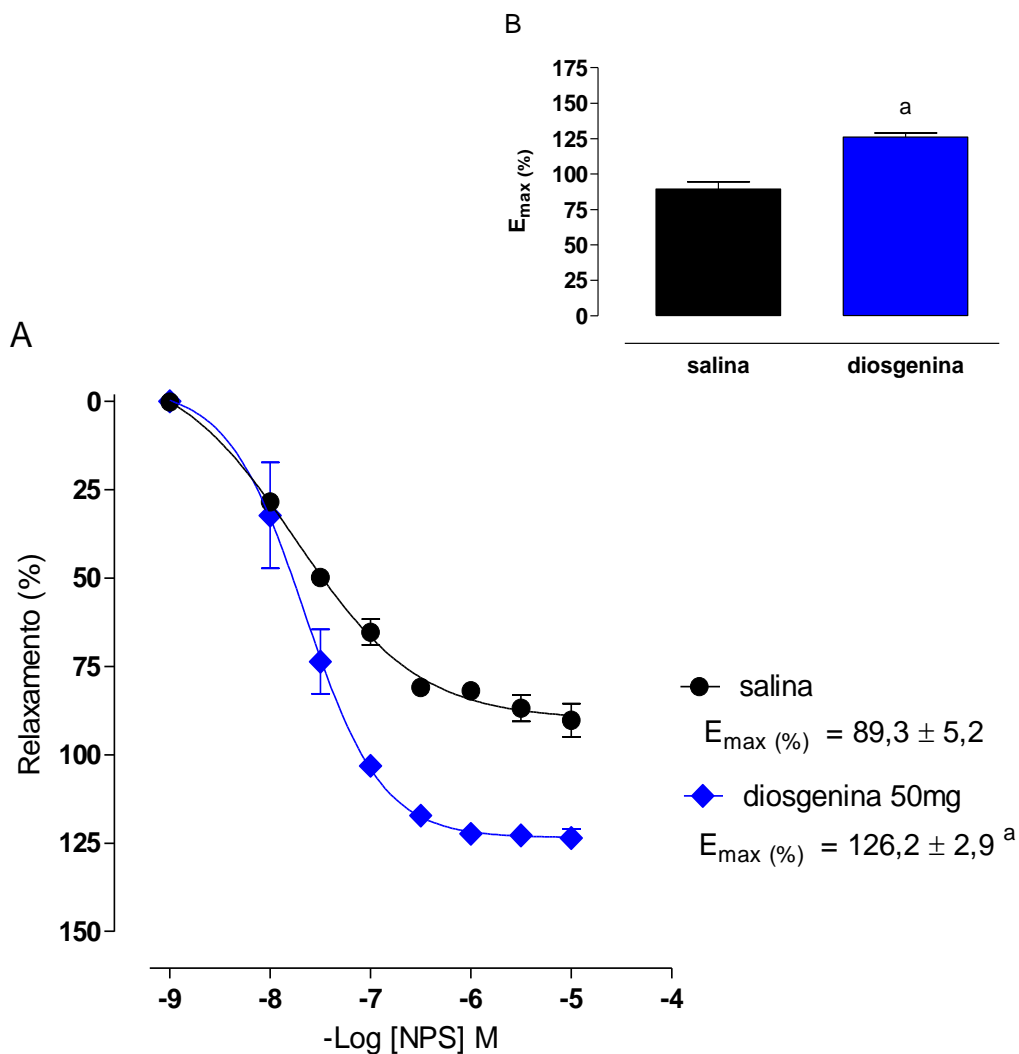
FIGURA 23: Curvas concentração- resposta ao ACh ($1\eta\text{M}^9$ a $1\mu\text{M}$) em anéis de artéria aorta de ratas OVX após administração oral de salina (●) ou de diosgenina 50mg/Kg (◆) por 7 dias. Teste *t-student* não-pareado entre os grupos, $n= 4$, $p<0,05$: a – diosgenina vs salina.



4.5.3 Efeito do tratamento de diosgenina 50mg/Kg sobre concentrações cumulativas de NPS em anéis de artéria aorta de ratas OVX.

Para verificar a resposta vasodilatadora do músculo liso vascular ao NPS, após a estabilização da resposta contrátil à fenilefrina foi realizada a curva concentração resposta ao NPS. Observa-se que o tratamento por 7 dias com diosgenina 50mg/kg ($126,2 \pm 2,9$) promoveu uma resposta vasorrelaxante ao NPS significante superior ($p < 0,05$) ao apresentado pelos segmentos arteriais do salina ($89,3 \pm 5,2$), visualizado na Figura 25 A.B.

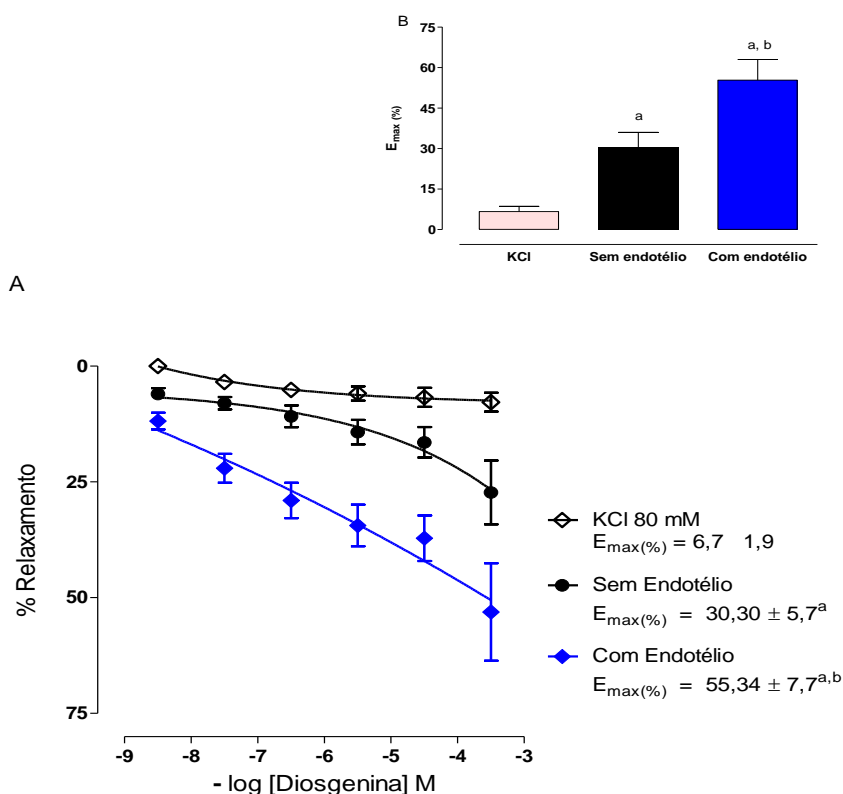
FIGURA 24: Curvas concentração- resposta ao NPS ($1\eta\text{M}^9$ a $1\mu\text{M}$) em anéis de artéria aorta de ratas OVX após administração oral de salina (●) ou de diosgenina 50mg/Kg (◆) por 7 dias. Teste *t-student* não-pareado entre os grupos, $n = 4$, $p < 0,05$: a – diosgenina vs salina.



4.5.4 Efeito vasorrelaxante da diosgenina em anéis de artéria aorta de ratas OVX pré-contraiadas com FEN e KCl 80 mM

A diosgenina induziu efeito vasorrelaxante em anéis de artéria aorta pré-contraiada com fenilefrina, apresentando os valores dos efeitos relaxantes máximos: $E_{m\acute{a}x} = 55,34 \pm 7,7\%$, na presença (E^+) e: $E_{m\acute{a}x} = 30,30 \pm 5,7\%$ ausência (E^-) de endotélio. O efeito contrátil máximo ($E_{m\acute{a}x}$) da fenilefrina foi restaurado após 60 min da retirada do fitoestrógeno, após serem realizadas lavagens a cada 15 min. Esses resultados demonstraram que o efeito vasorrelaxante da diosgenina é dependente do endotélio. As concentrações cumulativas de diosgenina não promoveram efeito vasorrelaxante em anéis pré-contraiados por KCl 80 mM em anéis sem endotélio ($E_{m\acute{a}x} = 6,7 \pm 1,9$), figura 26 A.B.

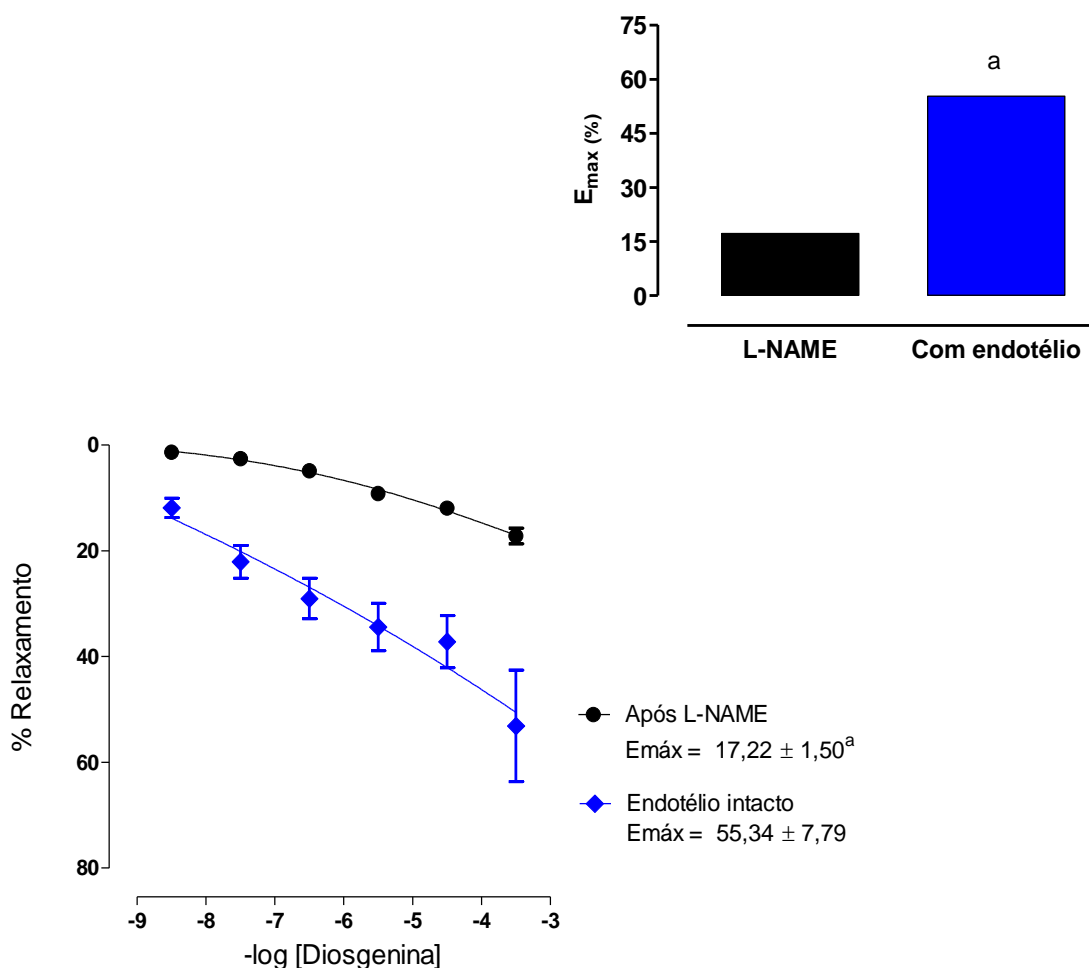
FIGURA 25: Curvas concentração-resposta do efeito da diosgenina sobre as contrações tônicas induzidas por FEN $1\mu\text{M}$ em anéis de artéria aorta em ratas OVX com (\blacklozenge) ou sem (\bullet) endotélio ou por contrações induzidas com KCl 80mM (\diamond) sem endotélio. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. Teste *t-student* entre dois grupos, $n=5$.



4.5.5 Verificação da participação do óxido nítrico na resposta vasorrelaxante induzida pela diosgenina em anéis de aorta de ratas OVX

Em relação à modulação endotelial, para verificar a participação da produção de óxido nítrico para o relaxamento promovido pela diosgenina, utilizou-se um inibidor competitivo da eNOS, o L-NAME. Os resultados apresentados demonstram que na presença do L-NAME a resposta vasorrelaxante da diosgenina foi abolida. O $E_{\text{máx}\%}$ passou de $55,34 \pm 7,7$ para $17,22 \pm 1,5$ quando o fitoestrógeno foi utilizado com o inibidor citado (Figura 27 A.B).

FIGURA 26: Curvas concentrações-resposta do efeito da diosgenina sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em anéis de artéria aorta de ratas OVX com endotélio na ausência (♦) ou presença (●) do inibidor L-NAME 100mM. (Teste *t student* entre dois grupos, $p < 0,05$, $n = 4$).

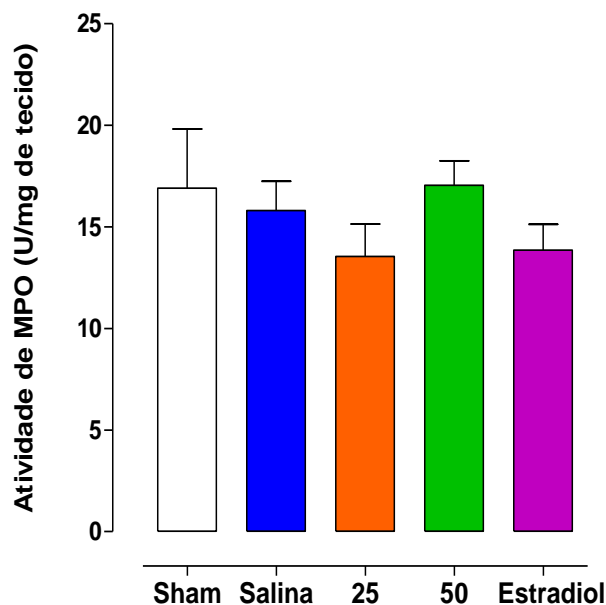


4.6 ESTRESSE OXIDATIVO

4.6.1 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a mieloperoxidase em ratas OVX

A Figura 28 mostra que a análise quantitativa da mieloperoxidase (MPO) no tecido cardíaco não demonstrou alterações significativas entre os grupos analisados sham ($16,90 \pm 2,92$ U/mg, n=4) e aos grupos OVX tratados com salina ($15,81 \pm 1,43$ U/mg, n=4), diosgenina 25 mg/Kg ($13,55 \pm 1,59$ U/mg, n=4) e 50 mg/Kg ($17,05 \pm 1,19$ U/mg, n=4) e estradiol ($13,85 \pm 1,27$ U/mg, n=4).

FIGURA 27: Efeito da diosgenina após tratamento de 28 dias de administração oral sobre a atividade de MPO em ratas OVX no tecido cardíaco. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4).

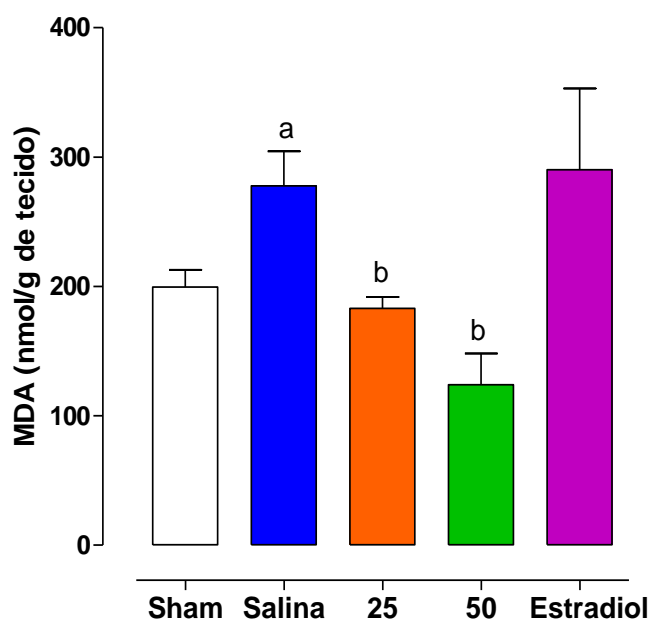


4.6.2 Efeito da administração oral de diosgenina sobre a peroxidação lipídica em ratas OVX

Em relação à peroxidação lipídica, segue os resultados da análise das concentrações do malondialdeído plasmático (MDA). Os níveis de MDA do grupo OVX salina ($277,77 \pm 26,65$ n]mol/g, n=4) mostraram-se elevados em relação ao grupo sham ($199,48 \pm 13,30$ nmol/g, n=4) com significância estatística $p < 0,05$. No tratamento com a diosgenina 25 mg/ Kg ($183,04 \pm 8,88$ nmol/g, n=4) houve diferença significativa entre os valores das concentrações de MDA no grupo de animais OVX. Na dose maior de diosgenina 50 mg/Kg ($124,05 \pm$

24,09nmol/g, n=4) essa redução em relação ao OVX salina permaneceu ($p < 0,05$). No grupo OVX que recebeu estradiol ($290,29 \pm 56,16$ nmol/g, n=4) não houve diferença (Figura 29).

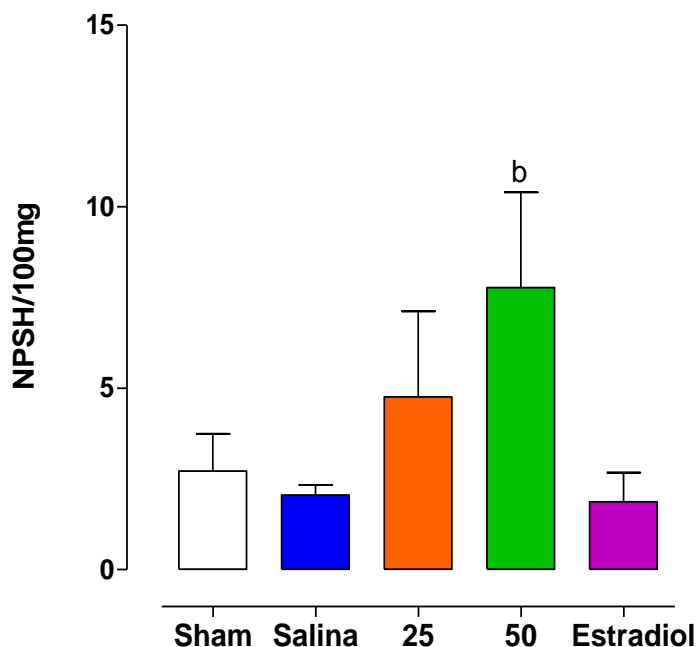
FIGURA 28: Efeito da diosgenina após tratamento de 28 dias de administração oral sobre a concentração de MDA em ratos OVX no tecido cardiaco. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,050$: a – grupo sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, n= 4).



4.6.3 Efeito da administração oral de diosgenina sobre os níveis de Glutamina reduzida (GSH) em ratos OVX

Em relação à GSH, o grupo OVX que recebeu tratamento com diosgenina 50 mg/Kg durante 28 dias promoveu aumento significativo da glutatona reduzida ($p < 0,05$) de $7,77 \pm 2,7$ mg/dL (n=4) quando comparado ao grupo salina com níveis de GSH de $2,05 \pm 0,3$ mg/dL (n=4). Os demais grupos não demonstraram diferenças significativas nas concentrações de GSH entre si: sham ($2,7 \pm 1,0$ mg/dL, n=4), diosgenina 25 mg/Kg ($4,8 \pm 2,3$ mg/dL, n=4) e estradiol ($1,9 \pm 0,8$ mg/dL, n=4), mostrado na figura 31.

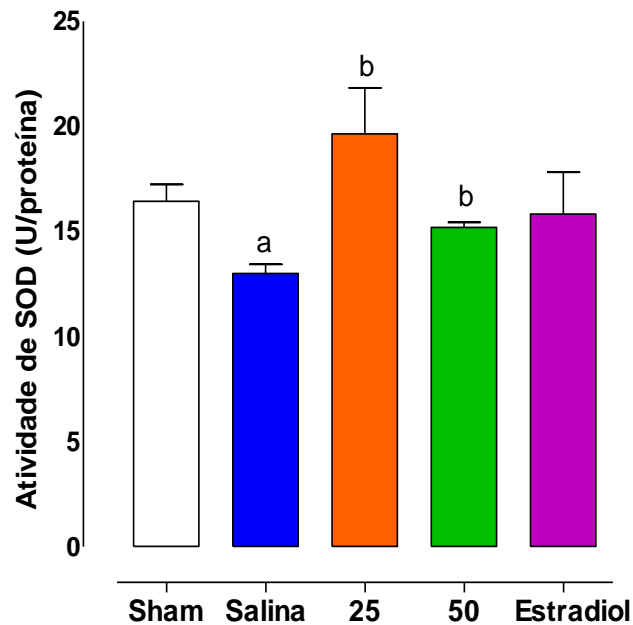
FIGURA 29: Efeito da diosgenina após tratamento de 28 dias de administração oral sobre GSH em ratas OVX no tecido cardíaco. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$: b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, $n = 4-5$)



4.6.4 Efeito da administração oral de diosgenina sobre os níveis de Superóxido Dismutase (SOD) em ratas OVX

A redução da atividade da enzima superóxido dismutase no plasma foi inferior no grupo o qual foi induzida menopausa tratado com salina ($13,01 \pm 0,4$ U/proteína, $n=4$) em relação ao grupo sham ($16,4 \pm 0,80$ U/proteína, $n=4$) com diferença significativa $p < 0,05$. A atividade da enzima SOD no plasma não foi diferente entre os grupos diosgenina 25mg/Kg ($19,6 \pm 2,2$ U/proteína, $n=4$) e estradiol ($15,8 \pm 2,080$ U/proteína, $n=4$). No grupo de animais que receberam a diosgenina 50 mg/Kg ($19,64 \pm 0,2$ U/proteína, $n=4$), administrada por via oral durante 28 dias, houve aumento na atividade da SOD em ratas OVX quando comparado ao grupo salina ($13,01 \pm 0,4$ U/proteína, $n=4$), demonstrada na figura 32.

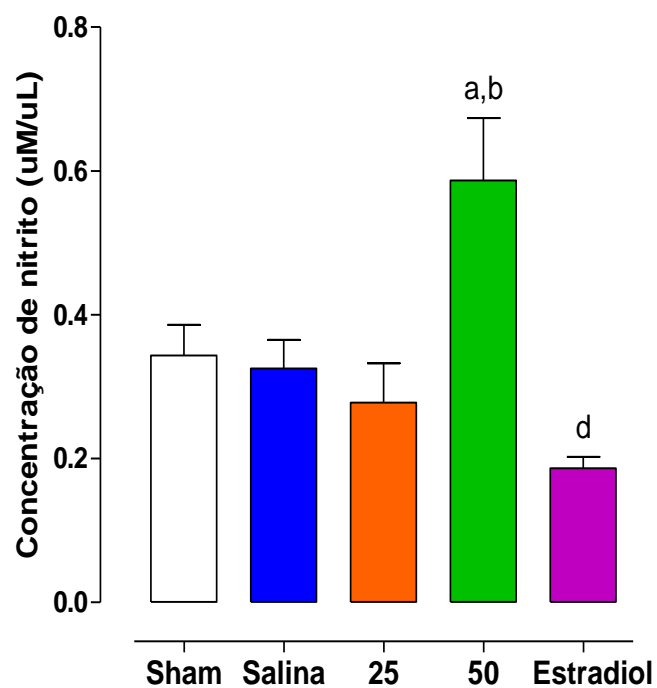
FIGURA 30: Efeito da Diosgenina (25mg/Kg e 50mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a atividade da SOD em ratas OVX no soro. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$: a – grupo sham; b – salina (Teste *t-student* entre dois grupos, $n = 4$).



4.6.5 Efeito da administração oral de diosgenina sobre os níveis de nitrito em ratas OVX

A dosagem de nitrito é utilizada com forma de quantificação da concentração de óxido nítrico. O nível de nitrito no soro apresentou-se elevado após administração por via oral de diosgenina na dose de 50mg/Kg ($0,6 \pm 0,1\mu\text{M}/\text{uL}$, $n=4$) em relação ao grupo sham ($0,3 \pm 0,04\mu\text{M}/\text{uL}$, $n=4$) e salina ($0,3 \pm 0,04\mu\text{M}/\text{uL}$, $n=4$) com diferença significativa ($p < 0,05$). Em relação aos demais grupos ovariectomizados, os que receberam estradiol e o grupo diosgenina 25 mg/Kg ($0,11 \pm 0,05\mu\text{M}/\text{uL}$, $n=4$) e ao estradiol ($0,18 \pm 0,02\mu\text{M}/\text{uL}$, $n=4$) não identificou-se modificações nesse parâmetro (Figura 32).

FIGURA 31: Efeito da Diosgenina (25 e 50mg/Kg) após 28 dias de administração via oral sobre a concentração de nitrito em ratas OVX no soro. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao grupo: a – sham; b – salina; d – diosgenina 50mg/Kg (Teste *t-student* entre dois grupos, $n = 4$).



5 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se o efeito do fitoestrógeno diosgenina sobre a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia em ratas tratadas por 28 dias. O modelo de indução da menopausa através da ovariectomia escolhido perfaz o quadro clínico clássico de privação hormonal, com aumento de substâncias deletérias no organismo e redução da capacidade de eliminá-las, assemelhando-se a síndrome metabólica (BARP et al, 2012). Dentre os efeitos negativos da deficiência de estrógeno destacam-se os relacionados ao perfil hemodinâmico: peso corporal, com alterações no perfil lipídico e das defesas antioxidantes.

Inicialmente, avaliou-se o parâmetro de peso corporal e observou-se uma elevação do peso corporal, característica da privação hormonal. Isso ocorre, porque ovariectomia é um procedimento que induz aumento de massa corporal devido à remoção abrupta e permanente dos hormônios femininos (SHEN, 2014). O estrógeno tem influência sobre o metabolismo, especialmente o de lipídios e carboidratos, favorecendo o acúmulo de gordura (CAMARA et al, 2014).

Neste estudo observou-se que, em relação ao desenvolvimento ponderal houve o aumento da massa corporal encontrado no grupo OVX salina devido a própria idade dos animais (60 dias) e a condição de deficiência hormonal. Os grupos sham e ovariectomizados tratados com estradiol e com diosgenina 25 e 50 mg/Kg mantiveram o aumento de massa corporal esperado para fase de vida (60 dias), provavelmente em decorrência da suplementação hormonal e regulação metabólica (Tabela 3).

As alterações relacionadas ao peso ocorrem de forma expressiva em alguns órgãos isoladamente na ausência de hormônios femininos. Uma delas é a redução da massa do útero, caracterizando atrofia do tecido uterino (SIMÕES et al, 2012). O inverso ocorre na reposição hormonal com estradiol e substâncias similares. Os efeitos estrogênicos podem ser confirmados pelo aumento na massa relativa do útero e pelos sinais de Estro (alterações no tecido vaginal e comportamental, como irritabilidade (KNOWLTON; KORZICK, 2014). Neste trabalho, a avaliação do estro ocorreu pela massa uterina, não sendo evidenciado nos grupos sham, salina e o grupo de animais ovariectomizados que receberam diosgenina (25 e 50 mg/Kg). Apenas o grupo de ratas ovariectomizadas tratados com estradiol apresentou aumento no peso do útero (Tabela 4).

Os efeitos estrogênicos também são identificados nas isoflavonas, onde as afinidades específicas em relação aos receptores estrogênicos alfas e betas justificam respostas parciais

em órgãos alvo (JIANG et al, 2015). A interação entre o estradiol e os receptores estrogênicos, além da hipertrofia do tecido uterino pode resultar em proliferação e anormalidades de caráter cancerígeno, fator que limita o uso do hormônio para TRH (HVIDTFELDT et al, 2015). Esses aspectos tornam fundamental no estudo da toxicidade da substância relativa à proliferação celular e, conseqüentemente, ao câncer. O teste uterotrófico tem grande importância para avaliação da diferenciação e crescimento anormal no útero (EPA, 2011).

O estudo uterotrófico de Medigović et al (2014) aponta que a Diosgenina não possui uma afinidade por receptor estrogênico α , receptor de progesterona (PR), e a expressão da lactoferrina (LF) e, desse modo, não tem ação no peso uterino, espessura do epitélio, número de glândulas endometriais ou anormalidades no epitélio vaginal. Contrariamente ao 17α -etinilestradiol, agonista de alta afinidade pelo ER, que induziu um aumento significativo em todos os parâmetros medidos. Isso sugere que a atividade da diosgenina não ocorre por via de ligação ao receptor, mas devido a estrutura química, ela pode induzir a esteroidogênese e estimular a síntese de estradiol (MEDIGOVIĆ et al., 2014).

O caráter de não promover proliferação celular acentuada implica em uma vantagem da diosgenina em relação ao estradiol. Além disso, a diosgenina tem sido apontada por promover a inibição do crescimento de câncer mediado pelo bloqueio da sinalização de Akt e indução de apoptose em vários sistemas *in vitro* de cultura. O que a torna uma substância potencial para reposição hormonal natural sem o efeito colateral de risco cancerígeno do estradiol e derivados (MOHAMMAD et al, 2013).

Em relação à toxicidade por dosagem, por sua vez, estudos com as saponinas esteroidais, na qual a diosgenina se enquadra, não apresentaram qualquer sinal de toxicidade até dose oral de 562.5mg/kg em ratos. Não há mudanças significativas dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos (exceto a 510 mg/kg/dia), inferindo que as saponinas esteroidais, e no caso, a diosgenina não possuem toxicidade significativa nos seus usos tradicionais (QUIN et al, 2009). Desse modo as dosagens de 25 e 50 mg/Kg são consideradas seguras. Para reiterar está afirmação, nesse trabalho, a avaliação dos parâmetros de massa de órgãos relativa ao peso corporal, parâmetros hepáticos e renais foram realizados.

A avaliação de alterações de massa que também podem ocorrer em órgãos que recebem sobrecarga de atividade (aumento) ou degradam o tecido (redução), constituem sinais de toxicidade principalmente, em tratamento de longa duração (POURBAKHS et al, 2014). A presença de um agente exógeno de caráter lipossolúvel para metabolização e eliminação favorecem o aumento da atividade desse órgão (MUTHUMANI;

MILTONPRABU, 2015). Nesse estudo, observou-se que a massa relativa dos pulmões e coração não teve alteração ao final do experimento. Em contradição, a massa do fígado e dos rins encontraram-se aumentadas no grupo de ratas OVX tratadas com estradiol via oral durante 28 dias (tabela 4).

Essa hipertrofia hepática demonstra a necessidade da análise dos parâmetros hepáticos. A FAL, ALT e AST foram dosados. A primeira é um parâmetro de avaliação hepática inespecífica, pois além do fígado, é produzida também por outros órgãos, tais como ossos, intestino, pulmões, placenta, neutrófilos e linfócitos T ativados. A fosfatase alcalina é uma hidrolase que remove grupos fosfato em múltiplas moléculas diferentes, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides (AL-RASHIDA; IQBAL, 2015).

Neste estudo, há um aumento da concentração da fosfatase alcalina em todos os grupos de animais OVX em relação ao grupo sham, com evidencia maior de significância o grupo estradiol. Esse parâmetro pode apontar um aumento do metabolismo realizado pelo fígado. Para avaliar se o aumento da fosfatase foi decorrente de lesão hepática, realizou-se a dosagem das enzimas hepáticas específicas: Alanina Transaminase e Aspartato Aminotransferase (figura 14).

A ALT também conhecida como Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) é um indicador de lesão no fígado e está relacionado com a administração crônica de medicamento e/ou alterações no metabolismo (JANIČKO et al, 2015). Os resultados mostraram que apenas o grupo OVX tratado com estradiol durante 28 dias apresentou uma elevação significativa em relação aos demais (figura 15.A). Há relatos na literatura que o estradiol, via oral, possui uma hepatotoxicidade, causa da limitação desse hormônio. Na verificação da concentração de AST, anteriormente denominada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO). Esse parâmetro está relacionado a processos de caráter crônico e, desse modo, encontra-se alterada em todos os grupos de animais ovariectomizados, exceto nos grupos que receberam o tratamento com diosgenina 25mg/Kg e 50 mg/kg, demonstrando que a sobrecarga hepática relacionada ao estado posmenopáusico e a reposição hormonal foi amenizada com a administração do fitoestrógeno (Figura 15. B)

A diosgenina tem um potencial quimiomodulatório em relação à desintoxicação por xenobióticos e atividade de eliminação de radicais livres. Aspecto de segurança do modulador foi identificado a partir dos níveis de dose de ALT e AST em ratos tratados. A administração oral de diosgenina (30 e 50 mg/kg de peso corporal) demonstrou benefício nos níveis de enzimas hepáticas de fase-I e fase-II que fornecem o equilíbrio na desintoxicação de

xenobióticos, caracterizando esse fitoestrógeno com indutor bi-funcional (KUMAR; BHARALI, 2014).

Outro parâmetro avaliado para identificação de toxicidade e cujo aumento da massa dos rins pelo grupo estradiol desperta a necessidade de avaliação, são taxas relacionadas a excreção renal: a ureia, que sofre alterações facilmente quando há descompensação metabólica, e a creatinina que remete a análise da função renal. As mulheres após a menopausa e com a utilização de medicamentos que são metabolizados e/ou excretados pelos rins apresentam com frequência tais parâmetros alterados (VITOLLO et al, 2014). No resultado obtido, não houve alteração na concentração de ureia entre os grupos (Figura 16.A). A creatinina, por sua vez, apresentou-se reduzida após o tratamento com estradiol em relação ao em 28 dias em relação ao grupo salina (Figura 16.B).

Em uma pesquisa sobre a ação diosgenina e a função renal em ratas ovariectomizadas de Tucci e Benghuzzi (2003) em análise mais detalhada dos rins identificou-se alterações significativas, tanto no comprimento glomerular e quanto do peso dos rins em animais ovariectomizados e que a diosgenina 500mg/kg durante 47 dias foi capaz de proteger o rim de alterações morfológicas associadas à ovariectomia em tratamento (TUCCI; BENGHUZZI, 2003).

O aumento na incidência de DCV em mulheres ocorre com frequência após a menopausa e está relacionado a alterações metabólicas. A síndrome metabólica inclui a presença de pelo menos três das seguintes características: obesidade abdominal, elevação de triglicérides, redução dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) colesterol, pressão arterial elevada, e aumento da glicose em jejum (OLSZANECKA et al, 2014). Neste estudo, observou-se que as ratas ovariectomizadas, a partir de 8 semanas apresentaram: aumento da glicemia, redução do c- HDL e aumento da pressão arterial, constituindo condições similares aos indivíduos com a síndrome metabólica .

Essas alterações metabólicas tem grande repercussão no sistema cardiovascular. O nível de glicose sérica, por exemplo, está associado a inflamação vascular e aterosclerose. Na investigação da glicemia em ratas OVX tratadas com diosgenina, identificou-se o aumento da glicemia de jejum no grupo salina em relação ao grupo sham (figura 17), reforçando importância dos hormônios femininos no metabolismo glicêmico. A dose de diosgenina 50mg/kg promoveu um restabelecimento desse parâmetro para valores normais de ratas com a produção de estrogênio preservada. Esses resultados implicam no efeito importante sobre a regulação da glicose sérica pela diosgenina em animais ovariectomizados.

O tratamento com estradiol, por sua vez, não produziu efeito hipoglicemiante, apesar de alguns relatos dessa resposta na literatura. Um aspecto que condiz com esse resultado do estradiol pode ser atribuído à administração oral do hormônio e a possível lesão no fígado apontada pelas enzimas hepáticas. Essa alteração reduz a capacidade desse órgão em regular o metabolismo dos carboidratos (LINDGREN; OLSSON,1993)

O efeito hipoglicemiante da diosgenina pode ter como principal razão o efeito antihiperlipidêmico observado (NAIDU et al, 2014). Estudo com a administração de diosgenina em ratos diabéticos diminuiu significativamente os níveis de glicose no sangue, entre outros parâmetros. Além disso, o nível de insulina no plasma foi elevado em ratos diabéticos tratados com diosgenina (HAO et al, 2015). A glicemia possui estreita relação com uma intensa alteração no perfil de lipídios no plasma e frequentemente é acompanhada por um aumento da deposição de colesterol (SANKAR et al, 2015).

A deficiência estrogênica promove desequilíbrio metabólico, com conseqüente elevação dos valores séricos de CT, TRI, c-LDL e uma redução nos níveis de HDL -c, tornando assim um perfil lipídico aterogênico (MATURANA et al, 2015). Nossos resultados mostram que em as ratas ovariectomizadas ocorreu uma significativa elevação nas concentrações séricas de Triglicérides e c-LDL em relação ao grupo de animais não-ovariectomizados, caracterizando a síndrome metabólica e o risco cardiovascular aumentado.

Neste contexto, os resultados obtidos com a administração de diosgenina contribuem para afirmar o papel de reestabelecimento metabólico após a menopausa. Neste estudo, a dose de 50mg/Kg de diosgenina em ratas OVX promoveu a redução dos níveis do colesterol total (figura 19.A) e do c-LDL (Figura 19.B). Tais parâmetros são primordiais para formação de ateromas e de lesão cardiovascular e reduzi-los são os objetivos das terapias atuais para minimização de complicações. Além disso, os níveis de c-HDL que regrediram demasiadamente com a ovariectomia, retornaram aos padrões anteriores à privação hormonal com o tratamento com diosgenina (25 e 50 mg/Kg) e estradiol (figura 19.C).

Muitas pesquisas demonstram que a terapia de reposição hormonal pode reduzir os efeitos da ausência estrogênica sobre os lipídeos plasmáticos, promovendo redução de c-LDL, triglicérides e elevando os níveis de HDL reduzindo o risco de doença cardiovascular (CHOI et al., 2015). A ação da diosgenina e a regulação do perfil lipídico apontam que esse fitoestrógeno possui uma estrutura esteróide semelhante ao colesterol que desempenha um papel importante na regulação de vários fatores de transcrição envolvidos no metabolismo hepático dos lipídios (UEMURA et al, 2015).

A hipercolesterolemia identificada nas ratas ovariectomizadas sem tratamento e frequentemente presente em mulheres após a menopausa, tem como consequência o aumento do estresse oxidativo. Nos últimos anos, o papel da disfunção endotelial (ED) e o estresse oxidativo excessivo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares têm sido destacados (PERROTA; AQUILA, 2015)

O aumento da PA também tem sido observado após a inibição da produção hormonal pelos ovários em mulheres jovens por meio de intervenções medicamentosas ou cirúrgicas, o que indica não ser o fator idade o único determinante para o aumento da incidência de DCV em mulheres menopausadas (KIM et al, 2014). Estudos sobre a pressão arterial e menopausa explicitam que a menopausa contribui significativamente para a elevação da pressão arterial. Essa alteração é perceptível após 8 semanas da retirada de ovários. Por outro lado, não é possível observar o aumento na PA em ratas ovariectomizadas em avaliações hemodinâmicas realizadas anterior a cinco semanas após a OVX contra as oito semanas (ROUTLEDGE et al, 2015).

Diante disso, buscou-se investigar o efeito da diosgenina sobre os parâmetros cardiovasculares de pressão arterial e frequência cardíaca em ratas OVX. O efeito agudo da substância foi avaliado pela administração de diosgenina por via endovenosa que produziu hipotensão arterial. Essa resposta foi acompanhada por bradicardia em ambas as doses, porém na dose de 25mg/Kg, a diosgenina apresentou efeito hipotensor com bradicardia leve, tornando uma dose de possível utilização terapêutica (figura 21). Esse resultado pode ser atribuído a estimulação de receptores muscarínicos, predominantemente do subtipo M₂, por um agonista como acetilcolina que promove a redução da taxa e força dos batimentos cardíacos resultante da ação parassimpática (PETERSON et al. , 1984; CAULFIELD, 1993; MONCAD, HIGGS, 1993).

No presente estudo, em uma avaliação dos parâmetros cardiovasculares de forma crônica por meio da pressão arterial sistólica, identificou-se que a privação dos hormônios femininos promoveu aumento da pressão arterial sistólica evidente em todos os grupos em que foi induzida a menopausa, os níveis pressóricos da PAS após a ovariectomia ficaram em torno de 161,5 a 189,9mmHg (Figura 22). Esse aumento da PAS em ratas OVX pode estar associado com prejuízo BRS, ao aumento de tônus simpático cardíaco e diminuição de tônus vagal cardíaco (SANCHES, 2012).

Estudos em mulheres pré-menopausa apresentam resultados concorrentes em relação à influência do ciclo menstrual e da ação dos hormônios ovarianos na sensibilidade

barorreflexa, demonstrando inalteração da sensibilidade barorreflexa nas diferentes fases do ciclo menstrual de mulheres, aumento da sensibilidade deste reflexo em mulheres na fase luteína quando comparada à fase folicular e maior resposta do barorreflexo em mulheres na fase folicular quando comparada à fase luteína (CONTI, 2014). Já em mulheres pós-menopausa foi evidenciada redução da sensibilidade barorreflexa, associada à elevação PA e ao aumento da incidência de DCV (BROOKS et al, 2012).

A elevação da PA em ratas com privação hormonal incide também no componente renal e humoral de regulação da pressão arterial (MANIVANNAN et al, 2013). A partir de 8 semanas (2 meses de vida) de OVX, ratas Sprague-Dawley já apresentavam elevação de PA em comparação com ratas saudáveis, e esse resultado estava associado com aumento da densidade de receptores AT1 no córtex e medula adrenal, sugerindo aumento da atividade do SRAA (MERCIER et al,2002). A ANG II estimula o aumento da produção de O_2^- nas células endoteliais de aorta, através do aumento da expressão da enzima NADPH oxidase. Desse modo, O SRAA tem um importante papel na modulação do estresse oxidativo (XUE et al, 2014).

De modo contrario aos mecanismos de elevação da PA, em animais com menopausa induzidas por ovariectomia, a utilização do fitoestrógeno diosgenina parece reduzir ou cessar essas alterações. O potencial anti-hipertensivo da diosgenina já relatado demonstrado na pesquisa de Ahmed et al. (2014), na qual o modelo experimental utilizado é a de hipertensão pulmonar. Após a indução da hipertensão pulmonar induzida e tratamento com o fitoestrógeno uma diminuição significativa na frequência cardíaca e pressão arterial média.

O presente estudo, com modelo de menopausa induzida, o grupo de ratas OVX tratadas com diosgenina 25 e 50 mg/Kg apresentou redução significativa da PAS. Esse efeito já é percebido após a administração do fitoestrógeno por via oral em 7 dias e permanece ao final das quatro semanas (Figura 22). A redução da PAS após utilização de diosgenina pode estar relacionada com a melhora da complacência arterial associada à redução do estresse oxidativo. Uma vez que estudos abordam a redução de estresse oxidativo como forma de alteração benéfica da sensibilidade barorreflexa, atuando no aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, que em mulheres pós-menopausa pode estar comprometido devido à privação dos hormônios ovarianos (SILVA et al, 2009).

Os fitoestrógenos também possuem ações de proteção que dependem de relaxamento de muitos leitos vasculares convergindo com o efeito do estradiol no sistema cardiovascular (ACHARJEE et al, 2014). O tônus vascular do leito arterial forma a base de manutenção da

resistência periférica na circulação, sendo o maior contribuinte para o controle da pressão arterial (WHITE et al., 1996). Artérias OVX possuem uma redução da reatividade devido ao enrijecimento da parede vascular (HASSAN; ABDEL-WAHHAB, 2012). Tal condição foi identificada neste estudo. Em virtude da semelhança na resposta hipotensora do 7º e do 28º dia de administração oral da diosgenina 50mg., avaliou-se a reatividade vascular à fenilefrina e constatou-se que o fitoestrógeno possui relevante diminuição na resposta vasoconstrictora em relação aos animais OVX, aspecto que reforça o efeito cardioprotetor dessa substância (figura 23).

Estudos apontam que as isoflavonas possuem efeito cardioprotetor através da melhoria da reatividade vascular, aumento da resistência à oxidação de c-LDL e por inibição da formação de trombo. Esses fitoestrógenos promovem o aumento da expressão de NO-sintase e consequente produção de do óxido nítrico (VASANTHI; SHRISHRIMAL; DAS, 2012).

Para analisar se esse fitoestrógeno atua mediante a via óxido nítrico no sistema cardiovascular, foi testada a resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio após o administração oral de diosgenina por 7 dias. Os resultados demonstraram que o tratamento com diosgenina potencializou o efeito vasorrelaxante promovido pela acetilcolina (figura 24), a partir da produção de óxido nítrico no endotélio vascular e pelo NPS induzido pela doação direta de NO em relação às ratas OVX (figura 25).

Apesar dos dados apontarem o efeito do tratamento com diosgenina sobre a resistência arterial, cabe averiguar se a resposta direta a administração desse fitoestrógeno no vaso sanguíneo de ratas OVX, para isso, utilizou-se dois agentes contracturantes: a fenilefrina e o KCL (figura 26). O primeiro é um agonista dos receptores α_1 -adrenérgicos, que induz liberação de cálcio operados por receptor (ROCCs), gerando um processo contrátil e o KCL promove a despolarização da membrana plasmática, favorecendo o influxo de cálcio para o citosol (KARAKI; WEISS, 1988).

Neste estudo, o fitoestrógeno induziu um efeito vasorrelaxante dependente de concentração e dependente do endotélio vascular em contrações produzidas por fenilefrina. Nas preparações pré-contraídas com KCl 80 mM, no entanto, a diosgenina não foi capaz de promover vasodilatação. Tais resultados permitem sugerir que a diosgenina induz vasorrelaxamento de modo específico relacionado ao receptor, uma vez que atua sobre contrações induzidas por fenilefrina, porém não produz o mesmo efeito quando foi utilizado KCl 80mM.

O efeito protetor de estradiol que pode se estender aos fitoestrógenos pode envolver o aumento da e NOS nas células musculares lisas vasculares, levando ao aumento do GMPc ou reduzida a endotelina-1 (KITADA et al, 2014). Para avaliar a influência da NO-sintase (NOS) no efeito relaxante induzido pela diosgenina, utilizou-se L-NAME 100 μ M, um inibidor competitivo da NO-sintase (MONCADA; HIGGS, 1993). Nesse caso, o relaxamento da musculatura lisa vascular induzida por diosgenina em ratas OVX foi significativamente abolido, sugerindo a participação da enzima NOS no efeito vasorrelaxante induzido pelo fitoestrógeno. Esse efeito sobre o sistema cardiovascular da diosgenina pode ocorrer por estimulação da expressão da enzima eNOS que é apontado por reduzir o estresse oxidativo (figura 27).

O estresse oxidativo é o termo designado para se referir à situação orgânica, na qual, existe um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, podendo ocorrer pelos aumentos de fatores pró-oxidantes, pela diminuição das defesas antioxidantes ou pela combinação de ambos, geralmente associado às doenças crônicas degenerativas (YAVARI et al, 2015). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROS (espécies reativas de oxigênio), porém, é a membrana plasmática um dos mais atingidos, acarretando modificações nas estruturas, nos sistemas de transporte, na manutenção dos íons e metabólitos, na transdução de sinal celular, entre outras (WEIDINGER; KOZLOV, 2015).

Tais moléculas apresentam alta reatividade para outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares e, até mesmo, o DNA. O estresse oxidativo pode ocorrer por mecanismos distintos resultam em danos no tecido: citocinas pró-inflamatórias, peroxidação lipídica e as Espécies Reativas de Oxigênio - EROS (COOKE et al., 2003)

Estudos têm demonstrado que a inflamação e o estresse oxidativo estão frequentemente associados e têm uma importante participação no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. A fim de investigar o papel do estresse oxidativo correlacionada com inflamação, realizou-se a dosagem da mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma enzima encontrada predominante em neutrófilos e monócitos e que ao reagir com peróxido de hidrogênio, forma substâncias pró-oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana. Esse mecanismo também promove dano oxidativo do tecido do hospedeiro, por exercer efeitos pleiotrópicos na vasculatura (ARNHOLD, 2004).

Estudos de dosagem dessa enzima em vasos de ratas ovariectomizadas demonstram o aumento, em grupos não tratados (AKSAKAL et al, 2010). Nos resultados obtidos no presente estudo, porém, não houve diferença significativa de MPO no tecido cardíaco entre os

grupos, sugerindo ausência de processo inflamatório por essa via e de ação da diosgenina (Figura 28).

Outro mecanismo bem estabelecido de estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (WOTHERSPOON et al., 2005). Esse processo ocorre através da reação de um radical livre com um ácido graxo poli-insaturado e propagado por radicais peroxilas e com formação de outros compostos, o Malondialdeído (MDA), por exemplo, prejudicando assim as funções celulares e agredindo, principalmente a membrana plasmática. A dosagem de MDA no tecido é um indicativo de dano celular (LIMA et al., 2006; KUMAR; BHARALI, 2014).

Na dosagem dos níveis de MDA, os resultados obtidos nos grupos de ratas ovariectomizadas apresentaram concentrações similares entre 124 a 300 nmol/g. O grupo OVX que foi tratado apenas com salina apresentou a maior quantificação de MDA no tecido cardíaco, convergindo com a condição de aumento do estresse oxidativo na menopausa. Identificou-se ainda a redução da concentração de MDA no grupo de ratas ovariectomizadas que receberam diosgenina 25 e 50 mg/Kg durante o tratamento de 28 dias até mesmo em relação ao grupo sham (Figura 29). O que nos leva a cogitar que além de combater o estresse oxidativo na privação hormonal, esse fitoestrógeno atua potencializando as defesas antioxidantes em condição de normalidade.

A diminuição da peroxidação lipídica ocorre com o aumento concomitante dos mecanismos de eliminação de radicais livres (KUMAR; BHARALI, 2014). A eliminação de EROS, por sua vez, inicia-se com a elevação da glutathiona (GSH). A glutathiona (GSH, L-g-glutamil-L-cistienilglicina) é um tripeptídeo sintetizado principalmente no fígado, rins, baço, eritrócitos e leucócitos e no organismo há a forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Especificamente, no tecido cardíaco, a glutathiona encontra-se predominantemente (>95%) na forma GSH (SARAVANAKUMAR; RAJA, 2011).

Experimentos para quantificação da glutathiona, demonstraram que a elevação da concentração de GSH no grupo tratado com diosgenina 50 mg/Kg reforça a hipótese de que esse fitoestrógeno apresenta atividade antioxidante em células do tecido cardíaco e consiste um dos primeiros sinais de ativação do sistema antioxidante (Figura 30). Em contraste, ao grupo de ratas ovariectomizadas que recebeu salina, corroborando com a literatura.

Em relação às defesas antioxidantes enzimáticas, a principal enzima é a SOD (BRZOZOWSKI et al., 2001), que se apresenta nas formas citoplasmática, mitocondrial e extracelular. A avaliação da participação da SOD na ação da diosgenina foi realizada no plasma, indicando seu papel a nível intra e extracelular. As ratas OVX obtiveram uma

redução significativa da enzima SOD. Ao final de 28 dias de tratamento em ratas OVX, o grupo que recebeu diosgenina 50mg/Kg via oral apresentou aumento significativo da concentração de SOD (Figura 31).

Estes resultados são consistentes com um estudo de Manivannan et al., (2014), no qual relata que a diosgenina apresenta benefícios em relação ao estresse oxidativo com o aumento da concentração de SOD em modelo de calcificação vascular induzida por insuficiência renal e reforçam o potencial antioxidante desse fitoestrógeno (MANIVANNAN et al., 2014).

A SOD possui também um papel fundamental na biodisponibilidade de óxido nítrico. Essa enzima impede a ligação de espécie reativas de oxigênio ao óxido nítrico, implicando na maior quantificação desse agente vasodilatador (QIN et al , 2014). Os resultados mostram que a concentração de NO plasmático em ratas OVX apresentou-se elevada no grupo tratados com diosgenina 50mg/Kg durante 28 dias em relação aos demais grupos, evidenciando o potencial vasodilatador desse fitoestrógeno. Os demais grupos não apresentaram diferenças entre si da concentração do NO (Figura 32).

O aumento da concentração de oxido nítrico inicialmente pode denotar o aumento de estresse oxidativo, via reações de nitração que geram peroxinitritos, os quais são responsáveis pela nitração de resíduos de tirosina nas proteínas, causando quebras nas fitas de DNA e depleção de reserva energética nas mitocôndrias (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Porém, a dosagem de malondialdeído reduzida no grupo diosgenina 50 mg/Kg demonstra que a substância tem o perfil antioxidante e aumento do oxido nítrico sem efeito deletério. Esse caráter é de grande relevância para o sistema cardiovascular, uma vez que o NO tem um papel fundamental no vasorrelaxamento (FURCHGOTT; ZAVADZKI, 1980) e as alterações pressóricas são frequentes em mulheres na pós-menopausa.

Os resultados relacionados à redução de fatores bioquímicos de risco cardiovascular e ao efeito antioxidante da diosgenina podem contribuir para uma ação hipotensora desse fitoestrógeno. A administração da diosgenina em ratas ovariectomizadas constitui uma alternativa terapêutica para uma condição natural da mulher que é a menopausa, reduzindo patologias cardiovasculares associadas.

6 CONCLUSÃO

Com o estudo é possível concluir que a diosgenina:

- A diosgenina não apresentou efeito tóxico sobre o peso, marcadores hepáticos e de função renal nas doses testadas em modelo de menopausa induzida por ovariectomia tratadas por 28 dias;
- A diosgenina reduziu a taxa glicêmica em modelo de menopausa induzida por ovariectomia tratadas por 28 dias;
- A diosgenina na dose de 50mg/Kg testadas apresenta cardioproteção em relação a fatores de risco Colesterol e HLD, em modelo de menopausa induzida por ovariectomia tratadas por 28 dias;
- A diosgenina apresentou redução da pressão arterial média e da frequência cardíaca;
- A diosgenina reduziu a pressão arterial sistólica em modelo de menopausa induzida por ovariectomia após tratamento de 28 dias;
- A diosgenina 50mg/Kg promoveu redução da resistência vascular e pontencialização da resposta vasorrelaxante a acetilcolina e NPS;
- Efeito cardioprotetor da diosgenina está relacionado com o efeito antioxidante no tratamento crônico por 28 dias relacionado a redução da peroxidação lipídica e elevação do mecanismos antioxidante GSH e SOD;
- A diosgenina na dose de 50mg/Kg promove aumento da concentração de nitrito;

7 PERSPECTIVAS

- A administração de diosgenina complexada com ciclodextrinas por via oral em ratas ovariectomizadas pode favorecer o aumento da biodisponibilidade desse fitoestrógeno proporcionando um efeito maior com uma menor dose
- O estudo do efeito da diosgenina sobre o tecido cardíaco na remodelação cardíaca e infarto agudo do miocárdio em ratas ovariectomizadas, alterações cardiovasculares frequentes na senilidade em mulheres;

REFERENCIAS

ACHARJEE, S; ZHOU, J.R; ELAJAMI, T.K ; WELTY, F.K, Effect of soy nuts and equol status on blood pressure, lipids and inflammation in postmenopausal women stratified by metabolic syndrome status. **Metabolismo**. 2015 Feb;64(2):236-43. doi: 10.1016/j.metabol.2014.09.005. Epub 2014 Oct 5.

AHMED, L.A ; OBAID ,A. A; ZAKI, H. F; AGHA, A. M, Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **European Journal of Pharmacology** 740 (2014) 379–387.

AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, 603–612, 2003.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, 219: 1698 - 1705, 1970.

AL-RASHIDA, M; IQBAL, J; Inhibition of Alkaline Phosphatase: An Emerging New Drug Target. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 2015 Feb 18.

AYDIN, A; KENAR, H; ATMACA, H; ALICI, T; GACAR, G; MÜEZZINOĞLU, Ü.S; KARAÖZ, E. The Short – and Long- term Effects of Estrogen Deficiency on Apoptosis in Musculoskeletal Tissues: An Experimental Animal Model Study **Archives of Iranian Medicine**, V. 16, N. 5, May 2013.

BRASIL. ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas.** – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2008.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.** v. 78, p. 206-209, 1982.

BUFFET, N.C; BOUCHARD, P.The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. **Chronobiology International**. 2001 Nov;18(6):893-919.

BUNDALO, M; ZIVKOVIC, M; TEPAVCEVIC, S; CULAFIC, T; KORICANAC, G ; STANKOVIC, A. Fructose-Rich Diet-Induced Changes in the Expression of the Renin Angiotensin System Molecules in the Heart of Ovariectomized Female Rats Could be Reversed by Estradiol **Hormone and Metabolic Research**.2015 Jun;47(7):521-7.

BROOKS, V.L ; CASSAGLIA, P.A; ZHAO, D; GOLDMAN, R.K..Baroreflex function in females: changes with the reproductive cycle and pregnancy . **Gender Medicine**. 2012 April; 9(2): 61–67. doi: 10.1016/j.genm.2012.02.004.

CAMARA C, ZHOU LY, MA Y, ZHU L, YU D, ZHAO YW, YANG NH. Effect of ovariectomy on serum adiponectin levels and visceral fat in rats. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**. 2014 Dec; 34(6):825-9. doi: 10.1007/s11596-014-1360-7. Epub 2014 Dec 6.

CASANOVA, G; SPRITZER, P. M. Effects of micronized progesterone added to non-oral estradiol on lipids and cardiovascular risk factors in early postmenopause: a clinical trial. **Lipids Health Disease**. Oct 9;11:133. doi: 10.1186/1476-511X-11-133, 2012.

CASTANHO, V. S; NAKAMURA, R. T; PINTO-NETO, A. M; FARIA, E.C et al .A terapia pós-menopausa reduz a atividade da catalase e atenua o risco cardiovascular. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia** Nov; 99 (5): 1008-14. 2012.

CAVADAS, L. F.; NUNES, A.; PINHEIRO, M.; SILVA, P.T. *Abordagem da Menopausa Nos Cuidados de Saúde Primários*. **Revista Acta Médica Portuguesa**, v.7,n.23, p.227-36, 2010.

CERAVOLO, G.S; FERNANDES, L; MUNHOZ, C.D; FERNANDES, D.C; TOSTES, R.C; LAURINDO, F.R; SCAVONE, C; FORTES, Z.B; CARVALHO, M.H. **Hypertension**. 2007 Oct;50(4):756-61. Epub 2007 Jul 30.

CHEN, M. N; LIN, C.C; LIU, C.F. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. **Climacteric**. 2015 Apr;18(2):260-9.

CHENG, J; ZENG, X.R; L.I, P.Y; LU ,T.T, TAN, X.Q; WEN, J; YANG, Y. [β -estradiol activates BK(Ca) in mesenteric artery smooth muscle cells of post-menopause women]. **Sheng Li Xue Bao**. Apr 25;64(2):121-8, 2012.

CHOI, Y; CHANG, Y; KIM, B.K; KANG, D; KWON, M. J; KIM, C.W ; JEONG, C; AHN. Y; PARK, H.Y; RYU, S; CHO, J. Menopausal stages and serum lipid and lipoprotein abnormalities in middle-aged women. *Maturitas*. 2015 Apr;80(4):399-405. doi: 10.1016/j.Maturitas.2014.12.016. Epub 2015 Jan 10.

CONTI , F.F; BRITO, J DE O; BERNARDES, N; DIAS, D.DA S; SANCHES, I.C; MALFITANO, C; LLESUY, S.F; IRIGOYEN, M.C; DE ANGELIS, K Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause **BMC Cardiovascular Disorders**. 2014 Dec

DAS, S;DEY, K. K; DEY, G;PAL ,I; MAJUMDER, A ; MAITICHOUDHURY, S; KUNDU,S.C; MANDAL, M. Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma. **PLoS One**. 2012;7(10):e46641.

DIAS, K. L. G.. Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric. **European Journal of Pharmacology**. 574, 172–178, 2007.

DINIZ, G. V. et al. Avaliação funcional do transplante autólogo heterotópico de ovários: estudo experimental em ratas. **Revista Medicina Minas Gerais** 21(4): 377-383, 2011;

DOWLING, Maritiza et al. Characterization of vascular disease risk in postmenopausal women and its association with cognitive performance. **PLoS One**. 2013 Jul. 17; 8 (7):

DUBLAND, J.A; FRANCIS, G.A.Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. 2015 Feb 2;3:3. doi: 10.3389/fcell.2015.00003. eCollection 2015.

EPA (Environmental Protection Agency). ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING PROGRAM. Uterotrophic Assay OCSPP Guideline 890.1600. Washington, DC **20460**. September 2011.

FANG, S.H; YAN, H; DANG, S.N; LI, Q; ZHAO, Y.L; YANG, R.H; REN, Y. [Relationship between female menopause and hypertension/isolated systolic hypertension in rural districts of Hanzhong in Shaanxi province]. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**. 2013 Aug;35(4)

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, V.288: 373 - 376, 1980.

GARRIDO, G. A; DE LA MAZA, C; M. P; VALLADARES, L. B Fitoestrógenos dietarios y sus potenciales beneficios en la salud del adulto humano. **Revista médica de Chile**, Santiago , v. 131, n. 11, nov. 2003 . Disponible en <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872003001100015&lng=es&nrm=iso>. accedido en 26 abr. 2015.

GREEN, L.C; WAGNER, D.A; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, P.L; WISHNOK, J.S; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

GRINGS, A.C. Riscos e benefícios da terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres na menopausa. *Rev Bras Anal Clin*, v.41, n.3, p.231-234, 2009.

HAGE, F. G; MANSUR, S. J; XING, D; OPARIL, S. Hypertension in women. **Kidney International Supplements** (2013) 3, 352–356

HAN,Y; LI, X; ZHOU, S; MENG, G; XIAO, Y; ZHANG, W; WANG, Z; XIE, L; LIU, Z; LU, H; JI,Y. 17 β -estradiol antagoniza a sub-regulação de ER α / NOS -3 sinalização na disfunção endotelial vascular de ratos diabéticos fêmea. **PLoS One** , 2012.

HAO, S; XU, R; LI,D ; ZHU, Z; WANG, T ; LIU, K. Attenuation of Streptozotocin-Induced Lipid Profile Anomalies in the Heart, Brain, and mRNA Expression of HMG-CoA Reductase by Diosgenin in Rats. **Cell Biochemistry and Biophysics**. 2015 Jan 29.

HUANG, B et al. Synthesis, characterization and biological studies of diosgenyl analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Volume 22, Issue 24, 15 December 2012, Pages 7330–7334

HASSAN,H. A, ABDEL-WAHHAB, M. A. Effect of soybean oil on atherogenic metabolic risks associated with estrogen deficiency in ovariectomized rats: dietary soybean oil modulate

atherogenic risks in ovariectomized rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**. . 2012 Jun;68(2):247-53.

HVIDTFELDT, U.A; TJØNNELAND, A; KEIDING, N; LANGE, T; ANDERSEN, I; SØRENSEN, T.I, PRESCOTT, E; HANSEN, Å.M; GRØNBÆK, M; BOJESEN, S.E; DIDERICHSEN, F; ROD, N.H. Risk of Breast Cancer in Relation to Combined Effects of Hormone Therapy, Body Mass Index, and Alcohol Use, by Hormone-receptor Status. **Epidemiology**. 2015 May;26(3):353-61. doi: 10.1097/EDE.0000000000000261.

IGNACIO, D. L; FRANKENFELD, T. G. P; FORTUNATO, R.S; VAISMAN, WERNECK-DE-CASTRO, J. P. S; CARVALHO, D. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. 2009;53/3.

IRIGOYEN M.C.; FIORINO P.; DE ANGELIS K.; KRIEGER E.M. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. **Revista Brasileira de Hipertensão** vol.12(4): 229-233, 2005.

ISAYEVA, G. S.The State of Coronary Arteries in Perimenopausal Women With Chest Pain. **Journal of Clinical Medicine Research**.2014; 6 (6):451-455

JANIČKO, M; VESELÍNY, E; ORENČÁK, R; HUSŤAK, R; FEDAČKO, J, DRAŽILOVÁ, S; MADARASOVÁ-GECKOVÁ, A; MAREKOVÁ, M; PELLA, D; KRISTIÁN, P; RÁC, M; JARČUŠKA, P; HepaMeta Study Group. Redefining the alanine aminotransferase upper limit of normal improves the prediction of metabolic syndrome risk. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. 2015 Apr;27(4):405-11.

JIANG G; LI, L; FAN, J, ZHANG, B; OSO, A.O; XIAO, C; YIN, Y. Dietary soy isoflavones differentially regulate expression of the lipid-metabolic genes in different white adipose tissues of the female Bama mini-pigs. **Biochem Biophys Res Commun**. 2015 Apr 10. pii: S0006-291X(15)00672-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.006.

KITADA, K; YUI, N; MORI, T; OHKITA, M ; MATSUMURA, Y. Vasoprotective effects of an endothelin receptor antagonist in ovariectomized female rats. **Life Sciences** 2014 Nov 24;118(2):379-85. Epub 2014 Jan 24.

KHALIL, R. A. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. **Biochemical Pharmacology** 86 (2013) 1627–1642

KNOWLTON, A.A; KORZICK , D.H.Estrogen and the female heart.**Molecular and Cellular Endocrinology**, 389 (2014) 31–39.

KUBACKA, M; MOGILSKI, S; BEDNARSKI, M; RAŻNY, K; SAPA, J; WASZKIELEWICZ, A.M; MARONA, H; FILIPEK, B. The nitric oxide/soluble cyclic guanylate/cyclic guanosine monophosphate pathway is involved in the cardiovascular effects of a novel α 1- and β -adrenoceptor antagonist. **Pharmacology**. 2014;94(5-6):287-95.

KUMAR, MANOJ DAS & BHARALI, RUPJYOTI. Chemomodulatory effect of diosgenin on xenobiotic detoxifying enzymes and free radical scavenging activities.**International Journal of Bio-Technology and Research (IJBTR) ISSN(P): 2249-6858; ISSN(E): 2249-796X. Vol. 4,**

LAHLOU, S.; PETITJEAN, P.; PELLISSIER, G.; MOUCHET, P.; FEUERSTEIN, C.; DEMENGE, P.. Rostrocaudal localization of cardiovascular responses induced by intrathecal administration of apomorphine in conscious, freely ovigrats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** V.16: 331-337, 1990.

LE, T.P; SUN, M; LUO, X; KRAUS, W.L; GREENE, G.L. Mapping ER β Genomic Binding Sites Reveals Unique Genomic Features and Identifies EBF1 as an ER β Interactor **PLoS One**. ECOLLECTION 2013.

LEE, H; KIM, T; CHOI, K. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. **Laboratory Animal Research** 2012 Jun; 28(2): 71–76

LI, H. Effects of estrogen and phytoestrogens on endometrial leakage in ovariectomized rats and the related mechanisms. **Sheng Li Xue Bao**. Feb 25; 65 (1): 8-18, 2013.

LIU, X; GUO, C; MA, X; TIAN, R; ZHANG, Y; YIN, H. Relationship between serum estrogen levels and blood stasis syndrome in postmenopausal women with coronary heart disease. **Pakistan Journal of Medical Sciences** .. 2015 Jan-Feb; 31(1): 25-30.

MANIVANNAN, J; BARATHKUMAR, T₂R; SIVASUBRAMANIAN, J; ARUNAGIRI, P; RAJA, B; BALAMURUGAN, E.. Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** (2013) 378:9–18

LÓRÁND T, VIGH E, GARAI J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. **Current Medicinal Chemistry**, 2010;17(30):3542-74. Review.

MATURANA, M.A; FRANZ, R.F; METZDORF, M; DA SILVA, T.R; SPRITZER, P.M. Subclinical cardiovascular disease in postmenopausal women with low/medium cardiovascular risk by the Framingham risk score. **Maturitas**. 2015 Mar 21.

MAYRA, P.R, ROSALINA, V.L; LÓPEZ, G; IRURETAGOYENA, J; MAGNESS, R. Regulation of uterine blood flow. II. Functions of estrogen and estrogen receptor α/β in genomic and non-genomic actions of the uterine endothelium. **Revista Chilena de Obstetricia e Ginecología**. 2014 Jun;79(3):218-228.

MEDIGOVIĆ ,I, RISTIĆ, N; ŽIVANOVIĆ, J; ŠOŠIĆ-JURJEVIĆ, B; FILIPOVIĆ, B; MILOŠEVIĆ, V; NESTOROVIĆ, N. Diosgenin does not express estrogenic activity: a uterotrophic assay. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 2014. Apr;92 (4):292-8.

MEIRELLES, RM. Menopause and metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. 2014 Mar;58(2):91-6. Review. Portuguese.

MENDONÇA, L.DE S; FERNANDES-SANTOS, C; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Cardiac and aortic structural alterations due to surgically-induced menopause associated with renovascular hypertension in rats. **International Journal of Experimental Pathology** 2007 Aug;88(4):301-9.

MESSINA, M. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition** 2014 Jul;100 Suppl 1:423S-30S.

MICHEL, T; HALABALAKI, M; SKALTSOUNIS, A.L. New Concepts, Experimental Approaches, and Dereplication Strategies for the Discovery of Novel Phytoestrogens from Natural Sources New Concepts, Experimenta. **Planta Med** 2013; 79: 514–532.

MIHARA, M; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**v. 86, p. 271-278, 1978.

MILEWICZ, A; KRZYŻANOWSKA-ŚWINIARSKA,B; MIAZGOWSKI, T; JĘDRZEJUK, D; ARKOWSKA, A; MIESZCZANOWICZ, U; BAR-ANDZIAK, E. The reference values of sex hormones and SHBG serum levels in subjects over 65 years old - The PolSenior Study. **Endokrynologia Polska**. 64(2):82-93, 2013.

MOHAMMAD, R.Y; SOMAYYEH,G; GHOLAMREZA, H; MAJID, M; YOUSEF, R. Diosgenin inhibits hTERT gene expression in the A549 lung cancer cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 2013;14(11):6945-8.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**. 29:2002-2012, 1993.

MONTEIRO, F. S.; SILVA A. C. L.; MARTINS I. R. R.; CORREIA A. C. C.; BASÍLIO I. J. L. D.; AGRA M.F.; BHATTACHARYYAB J.; SILVA B.A. Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels. **Journal Ethnopharmacol**. Jun 14;141 (3):895-900, 2012.

MUTHUMANI, M ; MILTONPRABU, S. Ameliorative efficacy of tetrahydrocurcumin against arsenic induced 4 oxidative damage, dyslipidemia and hepatic mitochondrial toxicity 5 in rats. **Chemico-Biological Interactions**. 2015 Apr 11. pii: S0009-2797(15)00150-7.

NAIDU, P.B; PONMURUGAN P; BEGUM, M.S; MOHAN, K; MERIGA, B; RAVINDARNAIK R; SARAVANAN, G. Diosgenin reorganises hyperglycaemia and distorted tissue lipid profile in high-fat diet-streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2014 Dec 22.

O'DONNELL, E; FLORAS, J.S; HARVEY, P.J. Estrogen status and the renin angiotensin aldosterone system. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**. 2014 Sep 1;307(5):R498-500.

OKAWARA, Masaki et al.Enhancement of Diosgenin Distribution in the Skin by Cyclodextrin Complexation Following Oral Administration **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 36(1) 36–40 (2013)

OLIVEIRA, E. J.; MEDEIROS, I. A.; MUKEIERJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine**, v. 3, p. 45-49, 1996

OLSZANECKA, A; DRAGAN, A ; KAWECKA-JASZCZ, K ; CZARNECKA, D. Influence of metabolic syndrome and its components on subclinical organ damage in hypertensive perimenopausal women. **Advanced Medical Science**. 2014 Sep;59(2):232-9. EPUB 2014 JUN 11.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE In: Grupo Técnico de Pesquisa de Estratégias de Saúde, **2009**

PALLOS,D; CESCHIN, A; ABREU,V.G; BULHÕES, R. C; Quirino, M. R. S; SOUZA, M.R. Menopausa: fator de risco para doença periodontal?. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 28(5), 292-297,2006.

PARK, I.S; LEE, H.W; RYUK, J.A ; KO, B, Effects of an aqueous extract of dangguijagyagsan on serum lipid levels and blood flow improvement in ovariectomized rats. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2014;2014:497836.

PARKER, D.R; LU, B; SANDS-LINCOLN, M; KROENKE, C.H; LEE, C.C; O'SULLIVAN, M; PARK, H.L; PARIKH, N; SCHENKEN, R.S; EATON, C.B. Risk of cardiovascular disease among postmenopausal women with prior pregnancy loss: the women's health initiative. **The Annals of Family Medicine**. 2014 Jul;12(4)

PEDRAM, A; RAZANDI, M; KORACH, K.S; NARAYANAN, R; DALTON, J.T; LEVIN, E.R. ER β Selective Agonist Inhibits Angiotensin-Induced Cardiovascular Pathology in Female Mice. **Endocrinology**. Aug 22, 2013.

PERROTA, I; AQUILA, S. The Role of Oxidative Stress and Autophagy in Atherosclerosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Volume 2015, Article ID 130315, 10 pages

POURBAKHS H, TAGHIABADI E, ABNOUS K, HARIRI AT, HOSSEINI SM, HOSSEINZADEH H. Effect of Nigella sativa fixed oil on ethanol toxicity in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. 2014 Dec;17 (12):1020-31.

QHIN J, KANG Y, XU Z, ZANG C, FANG B, LIU X. Dioscin prevents the mitochondrial apoptosis and attenuates oxidative stress in cardiac H9c2 cells. **Drug Res (Stuttg)**. 2014 Jan; 64(1):47-52. doi: 10.1055/s-0033-1349101. Epub 2013 Aug 15.

QIN Y. Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in rodents. **Journal Ethnopharmacol**. 2009 Dec 10;126(3):543-50. doi: 10.1016/j.jep.2009.08.047. Epub 2009 Sep 6.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Vasorelaxant Effect of 8(17), 12E, 14-Labdatrien-18-oic Acid (Labdane-302) in Rat Aorta Involves K⁺ Channels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 197-203, 2007.

RIBEIRO, G. A; AQUINO, R.M; SILVA, R. C.N; SILVA JÚNIOR, R. N. C; SILVA, A. S. C. S.N; Cartágenes, M. S. S; BORGES, A. C. R; SILVA, R. R. S; BORGES, M. O. R. Avaliação dos efeitos das isoflavonas de soja em ratas com Hipoestrogenismo induzido. **Cadernos de Pesquisa**. São Luís, v. 18, n. 1, jan./abr. 2011.

ROGALSKI, M.;MODARESSI, A; , MAGRI, P; MUTELET, F; GRYDZIUSZKO, A. A ; WLAZŁO, M; DOMAŃSKA, U. Physico-Chemical Properties and Phase Behavior of the Ionic Liquid- β -Cyclodextrin Complexes. **International Journal of Molecular Sciences**. 2013 Aug 13;14(8).

ROMITELLI, F. et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography. B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 851, n. 1, p. 257–67, 2007.

SANKAR P, ZACHARIAH B, VICKNESHWARAN V, JACOB SE, SRIDHAR MG. Amelioration of oxidative stress and insulin resistance by soy isoflavones (from Glycine max) in ovariectomized Wistar rats fed with high fat diet: the molecular mechanisms. **Experimental Gerontology** 2015 Mar;63:67-75.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine**.Jun;4(6):624-30, 2013

SHEN, M, KUMAR, SP, SHI, H. Estradiol regulates insulin signaling and inflammation in adipose tissue. **International Journal of Preventive Medicine**. 2014 Feb;17 (2):99-107.

SHI-HUA, F et al.Relationship between Female Menopause and Hypertension/Isolated Systolic Hypertension in Rural Districts of Hanzhong in Shaanxi Province. **Yi Xue Ke Xue Xue Yuan Bao**.30 de agosto; 35 (4) :422-6. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.04.012, 2013

SEDLAK, J; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVA-FILHO, J.C; OLIVEIRA, N.N; ARCANJO, D.D; QUINTANS-JÚNIOR, L.J; CAVALCANTI, S.C; SANTOS, M.R; OLIVEIRA, R.D.E.C; OLIVEIRA, A.P. Investigation of Mechanisms Involved in ()-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 110, 171–177, 2011.

SIMÕES, R.S; OLIVEIRA-FILHO, R.M; NADER, H.B; BARACAT, E.C. Glycosaminoglycan profiles in the uterus of adult ovariectomized rats treated with estrogen and progestagen. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2012 Dec;165(2):265-70. Epub 2012 Sep 16.

TAO, Q; FAN, X; Li, T; TANG, Y; YANG, D; LE, W. Gender Segregation in Gene Expression and Vulnerability to Oxidative Stress Induced Injury in Ventral Mesencephalic Cultures of Dopamine Neurons. **Journal of Neuroscience Research** 90:167–178 (2012)

TUCCI, M; BENGHUZZI, H.Structural changes in the kidney associated with ovariectomy and diosgenin replacement therapy in adult female rats. **Journal of Biomedical Science**. 2003;39:341-6.

UEMURA, T; GOTO, T; KANG, M.S; MIZOGUCHI, N; HIRAI, S; LEE, J.Y; NAKANO, Y; SHONO, J; HOSHINO, S; TAKETANI, K; TSUGE, N; NARUKAMI, T; MAKISHIMA, M; TAKAHASHI, N;KAWADA, T. Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits

LXR α activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice. **Journal of Nutrition**. 2011 Jan;141(1):17-23.

VASANTHI, H.R.; SHRISHRIMAL, N.; DAS, D.K. Phytochemicals from Plants to Combat Cardiovascular Disease. **Current Medicinal Chemistry**, 2012, 19, 2242-2251 2012.

VITOLO, E; COMASSI, M; CAPUTO, M.T; SOLINI, A. Hormone replacement therapy, renal function and heart ultrasonographic parameters in postmenopausal women: an observational study. **International Journal of Clinical Practice** 2014 Dec 11. doi: 10.1111/ijcp.12597. [Epub ahead of print]

WANG, Y; CONG, Y; LI, J; LI, X; LI, B ; QI,S. Comparison of Invasive Blood Pressure Measurements from the Caudal Ventral Artery and the Femoral Artery in Male Adult SD and Wistar Rats **PLOS ONE**. April 2013. V 8. Issue 4. e60625

WEIDINGER, A; KOZLOV, A.V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**. 2015 Apr 15;5(2):472-484.

WOŁAWEK-POTOCKA,I; MANNELLI, C; BORUSZEWSKA, D; KOWALCZYK-ZIEBA, I; WAŚNIEWSKI,T; . SKARŻYŃSKI, D.J. Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model. **International Journal of Endocrinology**, Volume 2013

WHITE, R.M.; RIVERA, C.O.; DAVISON C.B. Ddifferential contribution of endothelial function to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. **Hypertension** 27:1245-53, 1996.

XING, D; NOZELL, S; CHEN, Y; HAGE, F; OPARIL, S. Estrogen and Mechanisms of Vascular Protection **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** . 2009;

XUE, B; ZHANG Z; BELTZ, T.G; GUO, F; HAY, M; JOHNSON, A.K. Estrogen regulation of the brain renin-angiotensin system in protection against angiotensin II-induced sensitization of hypertension. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology** 2014 Jul 15;307(2):H191-8. doi: 10.1152/ajpheart.01012.2013. Epub 2014 May 23.

YAMADA, T; HOSHINO, M; HAYAKAWA, T;OHHARA, H; YAMADA, H; NAKAZAWA, T; INAGAKI, T; LIDA, M; OGASAWARA, T; UCHIDA, A.; HASEGAWA, C; MURASAKI, G; MIYAJI, M; HIRATA,,A.; TAKEUCHI, T., 1997. Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats. **American Journal of Physiology**. 273, G355–G364.

YAVARI, A; JAVADI, M; MIRMIRAN, P; BAHADORAN, Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. **Asian Journal of Sports Medicine**. 2015 Mar;6(1):e24898. doi: 10.5812/asjasm.24898. Epub 2015 Feb 20.

YUAN, P; WU, W.H, GAO, L; ZHENG, Z.Q; LIU, D; MEI, H.Y; ZHANG, Z.L; JING, ZC. Oestradiol ameliorates monocrotaline pulmonary hypertension via NO, prostacyclin and endothelin-1 pathways. **European Respiratory Journal**. 2013 May;41(5):1116-25.

ZHANG, Z; SONG, C; FU, X; LIU, M; LI, Y; PAN, J; LIU, H; WANG S; XIANG, L; XIAO, GG; JU, D. High-Dose Diosgenin Reduces Bone Loss in Ovariectomized Rats via Attenuation of the RANKL/OPG Ratio. **International Journal of Molecular Sciences**.2014 Sep 25;15(9):17130-47.

ZHAO, H; LI, X; LI, N ; LIU, T ; LIU, J; LI, Z; XIAO, H; LI, J Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus. **British Journal of Nutrition**. Mar 14;111(5):836-46.

ZHOU, E.S; FALK, S.J; BOBER, S.L. Managing premature menopause and sexual dysfunction. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, 2015