

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Efeitos das isoflavonas da soja (*Glycine max*) na síntese de  
fatores vasoativos derivados de células endoteliais humanas  
da linhagem ECV304**

**Michele Paulo**

**Ribeirão Preto**  
**2008**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Efeitos das isoflavonas da soja (*Glycine max*) na síntese de  
fatores vasoativos derivados de células endoteliais humanas  
da linhagem ECV304**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biociências  
Aplicadas à Farmácia para obtenção do título  
de mestre em Biociências Aplicadas à  
Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas  
à Farmácia.

**Orientada:** Michele Paulo

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Regina Torqueti Tolo

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Paulo, Michele

Efeitos das isoflavonas da soja (*Glycine max*) na síntese de fatores vasoativos derivados de células endoteliais humanas da linhagem ECV304. Ribeirão Preto, 2008.

111:il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Toloí, Maria Regina Torqueti

1. Isoflavonas da soja.
2. Células endoteliais.
3. Óxido Nítrico.
4. Prostaglandina.
5. Endotelina-1.

**Autora: Michele Paulo**

**Título: Efeitos das isoflavonas da soja (*Glycine max*) na síntese de fatores vasoativos derivados de células endoteliais humanas da linhagem ECV304**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

*Dedico este trabalho...*

*...a minha família*

*Joaquim e Cleide, meus pais*

Por terem sido durante toda minha existência meu porto seguro. Estejam certos de que o amor incondicional e o exemplo de vocês me fizeram chegar tão longe e suportar os momentos difíceis. Agradeço a vocês por tudo que tenho e sou.

*Mirele, minha irmã*

Pelo amor e companheirismo que nos une e por poder contar com você em todos os momentos da minha vida.

*...Aos meus tios, tias, avós, avô, primos e primas.*

Pelo apoio, pelo carinho, pela torcida, pela paciência e por confiarem em mim e no meu trabalho. Amo todos vocês!

*...Ao Danilo, meu amor*

*“O amor não consiste em olhar um para o outro, mas sim em olhar juntos para a mesma direção.”* (Antoine de Saint-Exupéry)

Pelo amor, carinho, amizade, compreensão, enfim, pela sua dedicação a mim nesses quatro anos de convivência. Te amo!

*...Aos meus afilhados Thays e Thales e aos meus sobrinhos Victória, Pedro e Ana Clara*

Meus maiores presentes e amores da minha vida. Obrigada pelos momentos de amor, ternura e descontração.

## *Agradecimentos*

### **À orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Toqueti Tolo**

Obrigada pela orientação, pelo carinho materno que me recebeu em seu laboratório, pelo seu exemplo, pelo constante apoio, pela amizade....Minha mais profunda admiração e gratidão.

### **Aos colegas do laboratório de Citologia Clínica da FCFRP/USP:**

#### **À especialista de laboratório Marlise Bonetti Agostinho Montes**

Querida amiga-irmã, sempre dividindo as alegrias, inseguranças, ansiedades...Grande incentivadora e colaboradora deste trabalho. Muito obrigada pela amizade sincera e verdadeira.

#### **Às amigas Mirian M. Salvador, Danyelle R. A. Rios e Renata D. Fernandes**

Amigas do coração que deram suporte e auxílio nas diferentes etapas deste trabalho e na minha vida. Sem vocês a conclusão deste não teria sido possível.

#### **À Camila M. Andrade**

Pela colaboração e por compartilhar o ambiente de trabalho.

#### **À técnica Marcella D. Grando**

Obrigada pela amizade e pela animada companhia. Tornando o ambiente mais alegre.

#### **À técnica Solange A. Bocardo**

Obrigada pelo carinho, pela amizade e por cuidar da limpeza e da organização do laboratório.

#### **Ao docente responsável pelo laboratório de Glicoimunobiologia da FCFRP/USP**

Obrigada pelos ensinamentos, apoio, colaboração, amizade e pelo empréstimo do laboratório e de equipamentos.

**Aos colegas da pós-graduação: Camillo D. C. Andrade, Daniel R. Callejon, Helder H. Paiva, Juliana O. da Silva, Lílian C. Rodriguez, Nathalia S. Koyama, Raquel M. Alves, Thalita B. Riul e Willian Schiavi**

Durante esses anos vocês foram muito mais que colegas de trabalho, se tornaram amigos, confidentes e parceiros. Vocês tornaram essa jornada muito mais prazerosa. Muito obrigada a todos vocês.

**Ao técnico do laboratório de Glicoimunobiologia da FCFRP/USP Rubens Eduardo da Silva**

Pela amizade, carinho e auxílio no preparo de materiais.

**Ao pós-graduando Mário dos Anjos Neto Filho do Laboratório de Farmacologia da FCFRP/USP**

Pela paciência, apoio e disponibilidade em me ajudar nos experimentos de citometria de fluxo e na correção do trabalho. Foi ótimo poder contar com você.

**À equipe da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Crott e da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fabíola Attié de Castro, em especial à Zita Maria Gregório**

Muito obrigada pela convivência amiga e pelo fornecimento de reagentes e instrumentos.

**À responsável técnica Fabiana Rossetto de Moraes**

Muito obrigada pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.

**Às instituições CAPES e FAPESP**

Pelo auxílio financeiro proporcionando a realização deste trabalho.

**À Seção de pós-graduação da FCFRP/USP**

**A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.**



*“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.”*

*(Augusto Cury)*

Paulo, M. **Efeitos das isoflavonas da soja (*Glycine max*) na síntese de fatores vasoativos derivados de células endoteliais humanas da linhagem ECV304**. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

As mulheres na fase reprodutiva apresentam menor incidência de doenças cardiovasculares (DCV), em relação aos homens de mesma idade. Porém, essa vantagem desaparece na pós-menopausa, sugerindo que os hormônios sexuais femininos exercem algum efeito cardioprotetor. Um dos mecanismos propostos para explicar essa proteção é o fato dos estrógenos promoverem a produção de importantes fatores vasoativos pelo endotélio vascular, entre eles o óxido nítrico e a prostaglandina I<sub>2</sub>. Com a diminuição da quantidade de estrógenos circulante, as mulheres na pós-menopausa, estão mais suscetíveis à disfunção endotelial e a doenças cardiovasculares. Estudos têm demonstrado que a terapia de reposição hormonal (TRH) utilizada por mulheres na pós-menopausa combate os sintomas deste período, melhora o quadro de disfunção endotelial e o perfil lipídico e aumenta a síntese de fatores vasoativos, que auxiliam na prevenção da DCV. Entretanto a TRH vem sendo questionada por grandes estudos como o WHI (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators) e o HERS (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*), que mostraram um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama e endometrial em mulheres fazendo uso da TRH. Entre as terapias alternativas para combater os sintomas indesejáveis da menopausa e as implicações mórbidas que acompanham esse período, sem expor as pacientes aos efeitos colaterais da TRH, a literatura aponta os fitoestrógenos, principalmente os extraídos da soja (*Glycine max*). O objetivo geral deste estudo é avaliar a ação das isoflavonas da soja, que vem sendo utilizadas por mulheres na pós-menopausa, na produção de óxido nítrico, prostaglandina E<sub>2</sub> e endotelina-1, por células endoteliais, utilizando um modelo "*in vitro*", células endoteliais da linhagem ECV304.

**Palavras Chave:** Isoflavonas da soja, Células endoteliais, Óxido Nítrico, Prostaglandina e Endotelina-1.

Paulo, M. **Effects of soy isoflavones (*Glycine max*) in the synthesis of vasoactive factors derived from human endothelial cells line ECV304.** 2008. 111f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

During their reproductive years, women have a lower incidence of coronary heart disease (CHD) compared to men of similar age. However, this advantage disappears in post-menopause, suggesting that female sex hormones exert some cardio protective effect. One of the mechanisms proposed to explain this protection is the fact that estrogens promote the production of important vasoactive factors by vascular endothelium, including nitric oxide and prostaglandin I<sub>2</sub>. By decreasing circulating estrogen, women in post-menopause are more susceptible of endothelial dysfunction and cardiovascular diseases. Studies have shown that the hormone replacement therapy (HRT) used by post-menopausal women in combating the symptoms of this period, improve endothelial dysfunction and lipid profile and increases the synthesis of vasoactive factors, which help in the prevention of CHD. Meanwhile the HRT has been questioned by two large trials, the WHI (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators) and HERS (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study), which showed an increased risk of developing breast cancer and endometrial cancer in women using HRT. Among the alternative therapies to combat the symptoms of menopause and undesirable morbid implications that accompany this period, without exposing the patients to the side effects of HRT, the literature suggests the phytoestrogens, especially those from the soybean (*Glycine max*). The aim of this study is to evaluate the effect of isoflavones from soy, which are used by women in post-menopause, in the production of nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> and endothelin-1 by endothelial cells, using an "in vitro" model: human endothelial cell line ECV304.

**Keywords:** Soy isoflavones, Endothelial cell, Nitric oxide, Prostaglandin and Endothelin-1.

## 1. Introdução

As DCV, entre elas a hipertensão, a doença coronariana e a aterosclerose, são a maior causa de morte no século XXI. Estão associadas ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial. Apesar dos avanços da medicina, as DCV são a maior causa de morte de mulheres na pós-menopausa em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, morrem por ano aproximadamente quinhentas mil mulheres em decorrência dessas doenças (MATURANA; IRIGOYEN; SPRITZER et al.; 2007).

A incidência de DCV em mulheres na pré-menopausa é muito menor que nos homens da mesma idade. (FORTE et al.; 1998; MATURANA; IRIGOYEN; SPRITZER et al.; 2007). Porém, a incidência de DVC aumenta significativamente após a menopausa, devido à perda da proteção cardiovascular, atribuída à deficiência de estrógeno que ocorre neste período (MENDELSON; KARAS, 2005).

Estudos observacionais em mulheres na pós-menopausa sugeriram que a terapia de reposição hormonal estrogênica (TRH) reduz o risco de doença cardiovascular (BARRETT-CONNOR; BUSH, 1991). Uma das principais razões pela qual a TRH diminui o risco de desenvolvimento de DCV é seu impacto favorável no endotélio vascular onde promove a síntese de óxido nítrico (*Nitric oxide* - NO) (CHAMBLISS; SHAUL, 2002).

Dois grandes estudos, o HERS e o WHI, questionaram os efeitos positivos da TRH e alertaram para seus efeitos adversos: o aumento da incidência de câncer de mama e de endométrio em tratamentos prolongados (HURLEY et al.; 1998).

Na busca por terapias alternativas à TRH, as pesquisas apontam os efeitos dos fitoestrógenos (FEs), compostos não-esteroidais que promovem efeitos estrogênicos em mamíferos e são estruturalmente semelhantes ao 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>). As diversas atividades biológicas destes compostos são devidas em parte a sua capacidade de agir como agonista aos receptores de estrógenos (REs), promovendo efeitos estrogênicos, ou como antagonista, bloqueando ou alterando os REs e assim prevenindo contra atividade estrogênica (KUIPER et al., 1998)

Os estrógenos possuem numerosos efeitos no corpo humano, tal como influenciar no crescimento e funcionamento dos tecidos reprodutivos femininos e masculinos, preservar o esqueleto e o sistema nervoso central, promover efeitos cardioprotetores e proteger contra câncer de colo de útero e envelhecimento da pele; é esperado que os FEs tenham importante papel na saúde humana, como prevenir cânceres e doenças cardíacas, aliviar os sintomas da menopausa e prevenir a osteoporose (CARSON-JURICA; SCHRADER; O'MALLEY, 1990).

Entre os FEs, as isoflavonas extraídas da soja têm sido foco de pesquisas recentes. O atual interesse por esses compostos vem da observação de que as populações com alto consumo de soja (população asiática) apresentam menor incidência de DCV e menor incidência de queixas dos sintomas da menopausa, sugerindo uma relação direta entre o consumo de soja e melhoria da qualidade de vida durante a menopausa (SIMONCINI et al.; 2005). Estudos têm mostrado que as isoflavonas da soja possuem efeitos positivos contra a DCV prevenindo o estresse oxidativo, além de estimular o endotélio vascular na produção de importantes fatores de relaxamento, entre eles o NO (SLOW et al.; 2007).

O objetivo geral deste estudo é avaliar a ação das isoflavonas da soja na proteção contra o estresse oxidativo e na produção de importantes fatores derivados do endotélio: óxido nítrico, prostaglandina E<sub>2</sub> e endotelina-1 por células endoteliais, utilizando um modelo *“in vitro”*, células endoteliais da linhagem ECV304.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Endotélio Vascular

O endotélio vascular é uma monocamada de células pavimentosas e alongadas, que recobre a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. As células endoteliais (CEs) formam a luz dos vasos e estão assentadas na zona subendotelial, formada pela matriz extracelular, que se estende até a lâmina elástica interna. A lâmina elástica interna separa a camada íntima (camada endotelial e camada subendotelial) da média (camada muscular lisa) (Figura 1) (HENNIG et al., 1994). Atua na regulação do tônus vascular, na aderência de monócitos, na trombogênese, na inflamação, no metabolismo lipídico e na remodelação do crescimento dos vasos (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004).

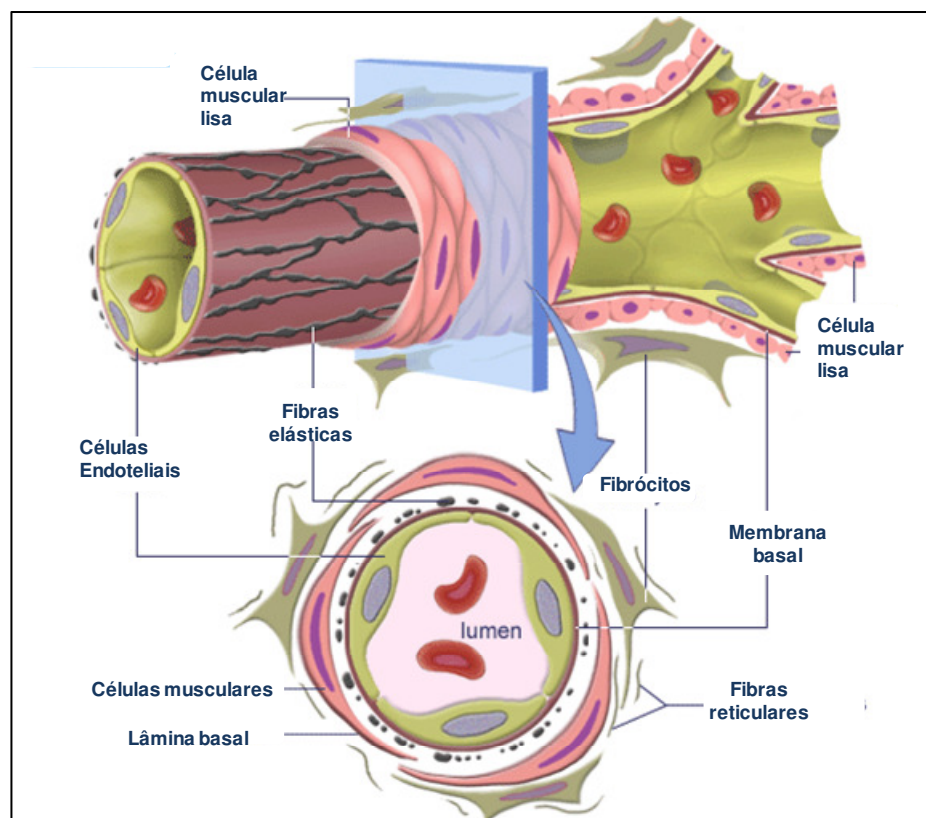


Figura 1 - Representação esquemática do endotélio vascular. Adaptado de MAHMOUDI, CURZEN, GALLAGHER, 2007.

O endotélio forma uma barreira seletiva regulando o fluxo de nutrientes, de biomoléculas e de células sanguíneas, mantém o balanço entre a fibrinólise e a trombose, promovendo uma superfície não trombótica devido à sua capacidade de produção de derivados de prostaciclina (PCs), principalmente prostaglandinas (PGs), potentes vasodilatadores e fortes inibidores da agregação plaquetária. Além disso, secreta substâncias como o plasminogênio, capaz de lisar coágulos. Entretanto, as CEs sintetizam fatores pró-coagulantes como fator de Von Willebrand (vWF) além de substâncias trombogênicas, como fatores de coagulação, moléculas de adesão, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) e tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) (MATURANA; IRIGOYEN; SPRITZER et al.; 2007).

O tecido endotelial é capaz de inibir a proliferação do músculo liso vascular, prevenindo a migração das células da musculatura vascular lisa através de mecanismos diretos como a síntese de NO. Além disso, desempenha papel crucial na homeostasia vascular e na prevenção do início e progresso da doença cardiovascular, através da síntese de fatores que atuam nas células da musculatura lisa, atuando deste modo na modulação do tônus vascular, através do balanço da liberação de substâncias vasoativas (MAHMOUDI; CURZEN; GALLAGHER, 2007).

Os fatores que promovem vasodilatação, os chamados fatores de dilatação derivados do endotélio, (*EDVF Endothelium-derived vasodilator factors*) são: o Óxido Nítrico (NO - *Nitric Oxide*), o Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (*EDHF-Endothelium-derived hyperpolarizing factor*) a prostaciclina (PGI<sub>2</sub> - *Prostacyclin I<sub>2</sub>*); os fatores que promovem vasoconstrição são: endotelina-1 (ET-1- *Endothelin-1*) e os prostanóides (prostaglandina H<sub>2</sub> – PGH<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub> – TXA<sub>2</sub> e a angiotensina). De todos os fatores que atuam na musculatura lisa destacamos o NO como o principal mediador do tônus vascular (STANKEVICIUS et al., 2003).

## ***2.2. Fatores derivados do endotélio***

### ***2.2.1. Óxido Nítrico (NO)***

Em 1980, a partir do estudo de Furchgott e Zawadsky, ficou estabelecida a importância do endotélio para o controle do tônus vascular. Neste estudo os pesquisadores demonstraram que o efeito vasodilatador da acetilcolina dependia da liberação de um fator relaxante derivado do endotélio. Anos depois, em 1987, Palmer e colaboradores demonstraram que cultura de CEs da aorta liberavam NO em concentrações suficientes para promover vasodilatação, mostrando que o fator relaxante derivado do endotélio era o NO (STANKEVICIUS et al., 2003).

O NO é sintetizado pela enzima oxido nítrico sintase – NOs (*Nitric Oxide synthase*), que utiliza o aminoácido L-arginina como substrato. A síntese de NO pela NOs implica inicialmente na formação do N-hidroxi-L-arginina (L-OHArg) pela monoxigenação da L-arginina dependente de NADPH e tetrahydropterina (BH<sub>4</sub>). Em um segundo passo, a L-OHArg tem a ligação C=N clivada, ocorrendo a formação de citrulina e NO (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

A NOs é uma enzima presente em uma grande variedade de células e que pode se apresentar sob as formas constitutivas (neuronal ou endotelial) ou induzível (iNOs - Inducible *nitric oxide synthase*). A forma constitutiva (cNOs – Constitutive *nitric oxide synthase*) é dependente de íons cálcio (Ca<sup>++</sup>) e de calmodulina, estando envolvida na sinalização celular. A iNOs é produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MONCADA; HIGGS, 2006).

A cNOs e a iNOs diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO. A cNOs ou isoforma I está presente no cérebro e foi purificada inicialmente no cerebelo de camundongo e de porco, sendo também conhecida como oxido nítrico sintase neuronal (nNOS – *Neuronal nitric oxide synthase*). A iNOs ou isoforma II não é expressa constitutivamente, sendo induzida em macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos bacterianos (*Lipopolissacaride* – LPS) ou citocinas. A oxido nítrico sintase endotelial (eNOs -*Endothelial nitric oxide synthase*) ou isoforma III é expressa constitutivamente nas CEs (BREDT,1999).

Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores de membrana das CEs são ativados por acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato e outras, estimulando a formação do complexo cálcio-calmodulina o que leva à ativação da eNOs presente nestas células e à



produção de NO. A eNOs está ancorada à membrana da célula endotelial, o que favorece a liberação do NO próximo à camada muscular do vaso (BUSCONI; MICHAEL, 1994).

No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), resultando em uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanina monofosfato cíclica (GMPc – *guanilate monophosphate cyclic*). O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento desta célula (Figura 2) (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

O NO também é um potente inibidor da agregação plaquetária que, ao deixar a célula endotelial em direção à corrente sanguínea, pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede dos vasos. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o NO promove um aumento do GMPc e conseqüente diminuição do  $Ca^{++}$  livre. Como o  $Ca^{++}$  é essencial para o processo de inibição plaquetária, esse processo também será inibido (WOLIN,1996).

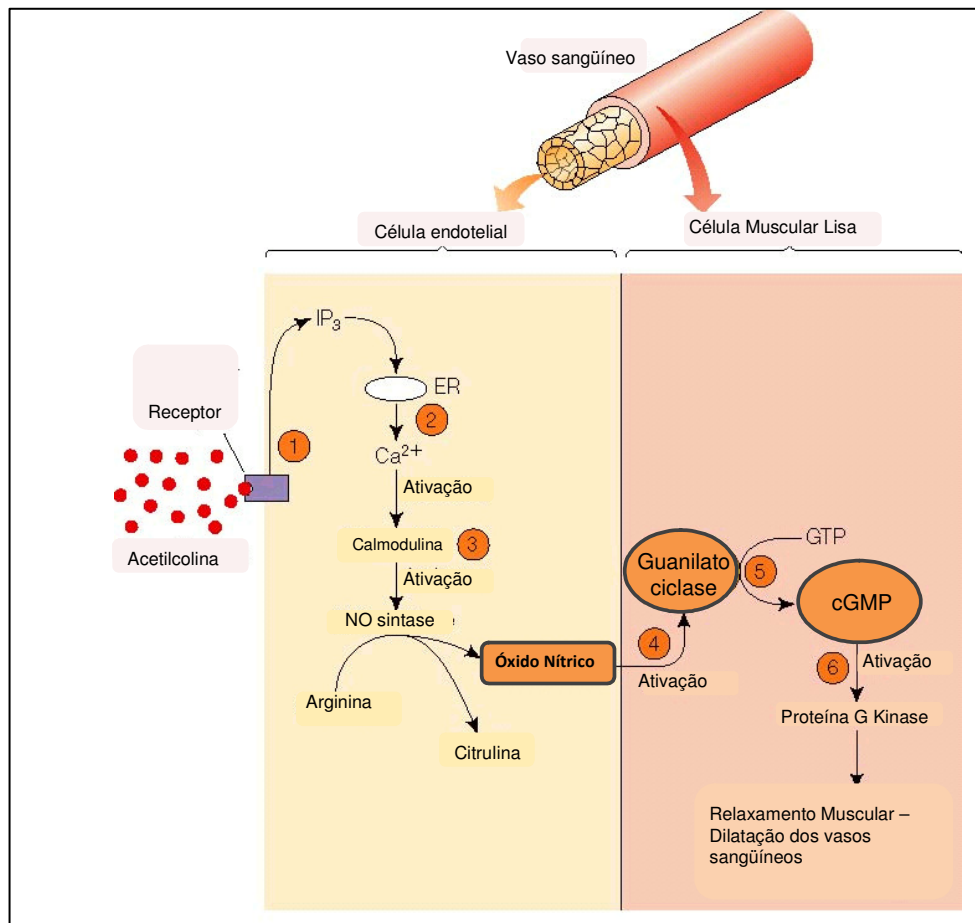


Figura 2 - Representação esquemática da síntese e da atuação do NO. Adaptado de ALDERTON et al.; 2001.

### 2.2.2. *Prostaglandinas (PGs)*

As PGs são ácidos graxos de 20 átomos de carbono que apresentam na sua estrutura básica o ácido prostanóico, que possui 20 carbonos com um anel ciclopentano e duas cadeias laterais. Também apresentam um grupo hidroxila na posição 15 e uma dupla ligação entre os carbonos 13 e 14 na posição trans. As PGs são sintetizadas a partir de um precursor primário, o ácido araquidônico. Este ácido é liberado dos fosfolipídeos das membranas celulares pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, através de um processo controlado por hormônios e outros estímulos. Há duas vias principais para síntese de PGs a partir do ácido araquidônico: a via da lipoxigenase e a via da ciclooxygenase (PARKINGTON; COLERMAN; TARE, 2004).

Na via da lipoxigenase, o ácido araquidônico sofre ação de lipoxigenases para formar ácidos graxos hidroxilados não cíclicos, os Ácidos hidroperóxeicosatetranóico - HPETE (*Hydroxyeicosatetraenoic acid*), que são derivados peroxidados instáveis que são convertidos em seus correspondentes derivados hidroxilados ou, dependendo do tecido, em leucotrienos ou lipoxinas. Os leucotrienos são substâncias comprometidas com as reações anafiláticas, sendo potentes broncoconstritores com importante papel nas reações de hipersensibilidade imediata (CAMPBELL; FALCK, 2007).

Pela via da ciclooxygenase, as prostaglandinas, entre elas a PGI<sub>2</sub> são obtidas através da ação catalítica das enzimas ciclooxygenases (MULLANE; PINTO, 1987). Esta via do metabolismo do ácido araquidônico foi a primeira a ser descoberta, e tem envolvida a enzima denominada prostaglandina endoperóxido sintetase (PGsintetase) ou ciclooxygenase (COX). Esta enzima catalisa a endoperoxidação do ácido araquidônico em intermediários muito

instáveis, as prostaglandinas endoperóxidos: prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ) e  $PGH_2$ . Por isomerização são formadas algumas PGs como  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_2$ . As enzimas COX e tromboxano sintase promovem a síntese de  $PGI_2$  e  $TXA_2$  respectivamente (Figura 3) (REILLY; FITZGERALD, 1993).

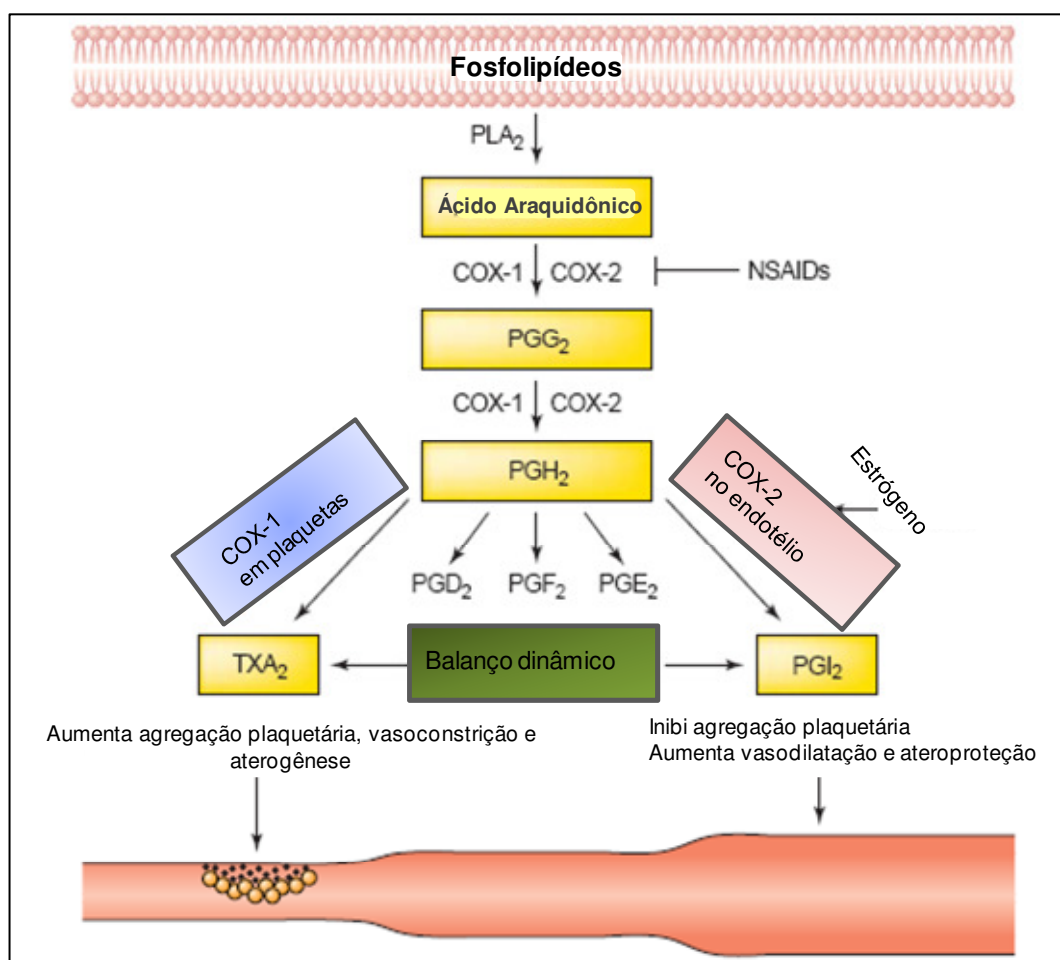


Figura 3 - Representação esquemática da síntese de  $PGI_2$ . Adaptado de SHAH, 2005.

A COX foi primeiramente purificada em vesículas seminais de carneiro e foi descrita como enzima singular que produzia PGs em vários tipos de células e tecidos (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000). Trabalhos posteriores mostraram a existência de duas isoformas: a COX<sub>1</sub> possui o aminoácido isoleucina e a COX<sub>2</sub> possui a valina. A maior parte

da COX<sub>1</sub> fica armazenada no retículo endoplasmático, enquanto a COX<sub>2</sub> localiza-se no envoltório nuclear (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000).

A COX<sub>1</sub> está presente em tecidos como estômago, intestino ou rins, locais onde catalisa a biossíntese de PGs citoprotetoras no endotélio vascular, mantendo a homeostase celular. Portanto, sob condições normais, agindo sobre o endotélio íntegro, a COX<sub>1</sub> atua mantendo o equilíbrio entre tromborresistência e trombogênese. É a única isoforma presente nas plaquetas, onde leva à formação de TXA<sub>2</sub>. A COX<sub>2</sub> ocorre principalmente em processos inflamatórios, sendo expressa em células como fibroblastos e macrófagos, favorecendo a liberação de fatores pró-inflamatórios. Nas CEs, a COX<sub>2</sub> converte o ácido araquidônico em PGE<sub>2</sub>, que é convertida em PGI<sub>2</sub> através da PGsintetase (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2005).

Desde a descoberta das PGs, a elucidação do seu papel na hemostasia e nas doenças cardiovasculares vem se tornando cada vez mais importante, especialmente o chamado balanço entre PGs e TXA<sub>2</sub>. Sob condições normais, quando estimulado pela COX<sub>2</sub> as CEs formam PGE<sub>2</sub> e posteriormente PGI<sub>2</sub>, que é vasodilatador e possui efeito antitrombogênico por inibir adesão e agregação plaquetárias. Porém, em situação de disfunção endotelial, o estímulo da COX<sub>2</sub> resulta na formação de maior concentração de TXA<sub>2</sub> e menor concentração de PGI<sub>2</sub>. O TXA<sub>2</sub> tem se mostrado indutor da condição de disfunção endotelial (Figura 3) (DAÍ; KLONER, 2004).

### ***2.2.3. Endotelina-1***

A endotelina-1 (ET-1) foi primeiramente isolada em cultura de CEs de porcos; constituem uma família de peptídeos constituídos de 21 aminoácidos. A família das endotelinas possui três membros: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) (MARASCIULO; MONTAGNANI; POTENZA, 2006). A ET-1 é produzida em resposta a estímulos físicos como estresse, hipóxia, citocinas e em resposta a ação de hormônios vasoativos entre eles: angiotensina II e adrenalina. São sintetizadas principalmente por CEs, mas também por outras como macrófagos e células da musculatura vascular lisa (WEBB; HAYNES, 1995).

No sistema vascular, a ET-1 atua como potente vasoconstritor e desempenha um papel fisiológico importante na regulação do tônus vascular, estimulando a geração de mediadores vasculares como NO, PGs e fatores de ativação plaquetária (HALLER, 1997).

Foram identificados dois subtipos de receptores em mamíferos: ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. Os receptores ET<sub>A</sub> mais comumente encontrados nas células musculares lisas dos vasos induzem vasoconstrição pelo aumento do Ca<sup>++</sup> intracelular. Os receptores ET<sub>B</sub> localizados principalmente nas CEs, estimulam a liberação de agentes como o NO e PGs, reduzindo a concentração intravascular de Ca<sup>++</sup>. O ET<sub>B</sub> também aparece em células musculares lisas dos vasos, onde estimulam a vasoconstrição (SCHNEIDER; BOESEN; POLLOCK, 2007).

O NO e a ET-1 são, na realidade, os fatores vasoativos derivados do endotélio mais relevantes tratando-se de doenças cardiovasculares. O NO causa vasodilatação, inibe a agregação plaquetária, inibe a produção de ET-1, modula o número e afinidade dos receptores ET<sub>A</sub>, suprime a proliferação de células musculares e age como fator antitrombogênico. Alternativamente, a ET-1 atua de maneira oposta ao NO, causando potente vasoconstrição, aumentando a adesão de monócitos, ativando macrófagos e promovendo a proliferação e migração de células musculares dos vasos (SCHNEIDER; BOESEN; POLLOCK, 2007).

### *2.3. Disfunção Endotelial*

A disfunção endotelial pode ser definida como o impedimento das funções endoteliais mais importantes, como as propriedades vasorrelaxantes, anticoagulantes e anti-inflamatórias (BUSSE; FLEMING, 1996). Está associada a várias formas de doença cardiovascular como a aterosclerose (ENDERMAN; SCHIFRIN, 2004).

Os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial são muitos. Entre eles incluem-se: 1) diminuição da liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio: NO e PGI<sub>2</sub>; 2) diminuição da biodisponibilidade desses fatores, principalmente o NO, por inativação oxidativa; 3) disfunção nas vias de transdução dos sinais dos fatores de relaxamento endoteliais; 4) diminuição da

sensibilidade da musculatura lisa vascular aos fatores de relaxamento; 5) aumento da produção de fatores de contração produzidos pelo endotélio: ET-1,  $\text{PGH}_2$ , e  $\text{TXA}_2$  (DEANFIELD HALCOX; RABELINK, 2007).

Uma das principais características da disfunção endotelial é a diminuição da concentração de NO. Isto pode ser resultado da diminuição da síntese ou aumento na inativação do NO pela produção aumentada de espécies reativas do oxigênio –EROs (VOETSCH; JIN; LOSCALZO, 2004).

A maioria das disfunções associadas com o aumento do estresse oxidativo, particularmente a produção elevada do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e de LDL oxidada (oxLDL), podem diminuir a atividade biológica do NO (GRYGLEWSKI; PALMER; MONCADA, 1986).

#### ***2.4. Estresse Oxidativo***

As células estão continuamente produzindo radicais livres e EROs como parte do processo metabólico. As principais EROs relacionadas ao estresse oxidativo são o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila (OH). As espécies reativas são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado na sua órbita externa e caracterizam-se por ser altamente instáveis e por ter tempo de vida muito curto (HALLIWELL, 1992).

Estas espécies reativas são normalmente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes presentes no organismo. Assim, o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto na redução da capacidade antioxidante. Portanto, a ocorrência de um dano oxidativo depende do equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade das defesas antioxidantes (DAWSON; DAWSON, 1998).

O radical  $\text{O}_2^-$  é continuamente gerado “*in vivo*” na mitocôndria, através da cadeia respiratória (SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994) e pelas enzimas NADPH. Apesar disso, a concentração de  $\text{O}_2^-$  no interior das células é relativamente baixa devido à ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que inativa o  $\text{O}_2^-$  formando peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (GARTNER; FRIDOVICH, 1991). Embora a dismutação do  $\text{O}_2^-$  pela SOD seja uma reação enzimática rápida (KLUG; RABANI; FRIDOVICH, 1997), a velocidade de reação deste radical com o NO é duas a três vezes mais rápida. Desta maneira, o NO

compete com a SOD pelo  $O_2$ , podendo ocorrer a formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (HUIE; PADMAJA, 1993).

O ânion  $ONOO^-$  é efetivamente mais reativo do que os seus precursores, além de ser mais tóxico para a célula (BECKMAN et al., 1990) pois em pH fisiológico o  $ONOO^-$  encontra-se formando o ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), o qual sofre clivagem homolítica dando origem ao OH e ao dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (BECKMAN et al., 1990). Assim, o  $ONOO^-$  é capaz de promover inúmeros danos oxidativos como a nitração de proteínas (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995), a peroxidação lipídica e a oxidação de grupamentos tiólicos (RADI et al., 1991).

O NO além de ser vasodilatador, sabe-se que ele é um seqüestrador de radical peroxil, sendo capaz de inibir a oxidação da LDL quando promovida por metais de transição (PADMAJA; HUIE, 1993). Diversos estudos *in vitro* têm demonstrado que a LDL nativa ou oxidada pode inibir a síntese ou liberação de NO pelas CEs, ou atenuar seu efeito biológico, contribuindo, assim, para a disfunção endotelial (SIMON; CUNNINGHAM; COHEN, 1990).

Algumas condições como idade, dislipidemia, pressão sangüínea elevada, diabetes mellitus e menopausa estão associadas à disfunção endotelial (CHING et al.; 2003).

Existem evidências mostrando a associação entre a disfunção endotelial e a redução da produção de estrógenos após menopausa natural ou cirúrgica em mulheres, portadoras ou não de doenças coronarianas (SANADA et al., 2003).

## *2.5. Menopausa e DCV*

Durante a fase reprodutiva, as mulheres apresentam uma baixa incidência de DCV comparadas com homens da mesma idade. Porém, o risco de DCV nas mulheres aumenta durante a menopausa (RAHIMIAN et al., 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a menopausa é o término permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana fisiológica com declínio da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona pelos ovários, que ocorre naturalmente ou é induzida por cirurgia, quimioterapia

ou radiação. A menopausa natural é reconhecida após 12 meses consecutivos sem períodos menstruais que não esteja associada com uma causa fisiológica (ex.: lactação) ou patológica (SPEROFF, 1999; NIH CONFERENCE, 2005).

A incidência de DCV em mulheres na menopausa vem se tornando a maior causa de morbidade e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento. A diminuição fisiológica da atividade ovariana durante essa fase causa mudanças desfavoráveis no metabolismo da mulher, incluindo alterações nos lipídeos e nas lipoproteínas, na distribuição da gordura corpórea, no metabolismo da glicose e da insulina, e no sistema coagulação/fibrinólise, dificultando o fluxo sangüíneo decorrente do aumento da resistência vascular (CRISAFULLI et al., 2005). Portanto, a diminuição da quantidade de estrógenos está diretamente ligada à redução do efeito cardioprotetor que este hormônio produz (GRODSTEIN; HU, 2002).

As principais alterações do perfil lipídico que contribuem para o desenvolvimento da DCV durante a menopausa são: o aumento do colesterol total, do triglicérides, da Lipoproteína de baixa densidade (LDL - *Low density lipoprotein*), da lipoproteína (Lp(a)) e a diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL - *High density lipoprotein*). A menopausa está também associada com o aumento dos níveis de fatores hemostáticos relevantes ao risco de DCV, representado pelo aumento do fibrinogênio, PAI-1, fator VII e VIII. Estas alterações causam um desequilíbrio no sistema hemostático, favorecendo a coagulação sobre a fibrinólise, podendo resultar em infarto do miocárdio e doenças isquêmicas (AL-AZZAWI et al., 2001; GENSINI et al., 1996; KENEMANS et al., 2001).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que essas alterações são devido à redução de estrógeno circulante. Os estrógenos possuem uma ação direta na reatividade vascular, modificando o estado funcional do endotélio vascular (LOSORDO; ISNER, 2001).

## ***2.6. Endotélio e a Ação dos Estrógenos***

Os estrógenos são hormônios esteróides monofenólicos que exercem numerosas atividades em todo o organismo. O estrógeno mais potente de ocorrência natural nos seres humanos é o 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) seguido pela



estrona e estriol, sua principal forma de excreção (Figura 4) (ÖSTERLUND; HURD, 2001).

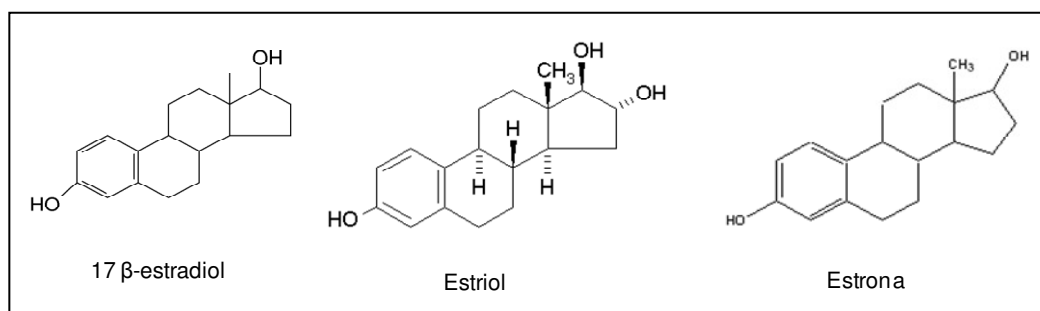


Figura 4 - Representação esquemática dos estrógenos endógenos. Adaptado de ÖSTERLUND, HURD, 2001.

Os efeitos diretos dos estrógenos no sistema vascular que atuam na modulação do tônus vascular incluem: 1) intensa vasodilatação, aumentando a síntese e a atividade do NO (MENDELSON, 2000), 2) modulação do tônus vascular de longa duração, regulando a produção de PGI<sub>2</sub>, a expressão de eNOs e de ET-1 (HERMENEGILDO et al., 2005), 3) inibição da vasoconstrição induzida por ET-1 (TANG et al., 2005) e 4) inibição da atividade do sistema nervoso simpático (MERCURO et al.; 1999).

Como já dito anteriormente, durante a menopausa ocorre diminuição da quantidade de estrógenos e isso está relacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre outros fatores, pela perda do efeito protetor dos estrógenos no endotélio vascular, acarretando em distúrbios da função endotelial, podendo acarretar em disfunção do endotélio (GRODSTEIN; HU, 2002). Esta tem um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose. Evidências mostram que algumas intervenções podem modificar o progresso da disfunção endotelial, da aterosclerose e da DCV (LIMA et al.;2005).

As intervenções realizadas para combater a disfunção endotelial são focadas na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, que ocasionam melhora desta disfunção (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003). Dentre as estratégias encontram-se a diminuição sérica do colesterol (VOGEL, 1999), a terapia anti hipertensiva (TADDEI; SALVETTI, 2002), a redução do tabagismo (CELERMAJER et al., 1993) e a terapia de reposição hormonal na pós-menopausa (VITA; KEANEY, 2001).

## *2.7. Terapia de Reposição Hormonal (TRH)*

A TRH é a terapia de escolha para o tratamento dos sintomas da menopausa e das implicações mórbidas que acompanham este período. Consiste na administração de estrógeno, que pode ser por diferentes vias, como oral, vaginal, transdérmica, subcutânea ou intramuscular, em associação ou não a progestágenos (HANS et al., 1988).

Os benefícios do estrógeno na TRH resultam, em parte, no papel mediador do estrógeno que aumenta a atividade e a síntese do NO e da PGI<sub>2</sub> e diminui a síntese de ET-1 resultando em alteração no balanço entre os sistemas vasoconstritores e vasodilatadores (KLEINERT et al., 1998).

No entanto, estudos observacionais e controlados mostraram um aumento do risco de eventos tromboembólicos venosos (ETV) nas mulheres em uso da maioria dos tipos de estrógenos e progestágenos. Portanto, TRH é contra-indicada para pacientes com fatores de risco para ETV, como sobrepeso, tendência trombótica ou histórico familiar de ETV (HICKEY; DAVIS; STURDEE, 2005).

Callejon e colaboradores, 2005 analisaram os efeitos da TRH constituída de estradiol transdérmico associado com acetato de medroxiprogesterona (AMP) por via oral nas variáveis hemostáticas em mulheres brasileiras na pós-menopausa e não verificaram alterações nos parâmetros analisados.

Para verificar os resultados dos estudos observacionais quanto dos efeitos da TRH nas doenças cardiovasculares, foram realizados grandes ensaios clínicos controlados. Um ensaio clínico controlado (HERS - Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) avaliou o uso de estrógeno associado a progestágeno, em mulheres na pós-menopausa com útero íntegro e com estabelecida doença coronariana, as quais foram tratadas com 0.625 mg de estrógeno eqüino conjugado (EEC) associado 2.5 mg de acetato de medroxiprogesterona (AMP), ambos diariamente. Estas foram comparadas com um grupo placebo por um período de 4.1 anos. Os resultados mostraram que o grupo tratado com TRH não apresentou redução nas doenças

coronarianas e houve um aumento dos eventos tromboembólicos e doenças vasculares (HURLEY et al.; 1998).

Outro importante ensaio clínico controlado foi realizado pelo *Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators* (WHI, 2002) para verificar os riscos e benefícios da TRH. O estudo avaliou mulheres na pós-menopausa (50-79 anos), saudáveis, com útero íntegro, que foram submetidas a um tratamento de 0.625mg de EEC associado com 2.5 mg de AMP diariamente e comparadas com placebo, por um período de 5.2 anos. O período planejado da triagem era de 8.5 anos, no entanto, o grupo de pacientes que utilizavam TRH apresentou um aumento do risco relativo de eventos cardiovasculares e câncer de mama, o que levou ao término precoce do estudo. Houve uma diminuição das fraturas ósseas e câncer de cólon nas usuárias de TRH. Apesar do término precoce deste estudo clínico utilizando estrógeno e progesterona, o estudo duplo-cego placebo controlado utilizando EEC isolado em mulheres hysterectomizadas, desenvolvido paralelo a esta triagem clínica, continuou porque os riscos/benefícios à saúde não tinham sido adequadamente determinados. Chegaram à conclusão que o uso de ECC aumenta o risco de derrame, diminui o risco de fratura da bacia e não afeta a incidência de doenças cardíacas em mulheres na pós-menopausa; uma possível diminuição do risco de câncer de mama requer mais investigação. A capacidade de causar eventuais doenças foi equivalente no grupo ECC e placebo, não indicando nenhum benefício. Assim, o estudo concluiu que ECC não deve ser recomendado para prevenção de doenças crônicas em mulheres na pós-menopausa (WHI, 2002).

Os resultados destes dois ensaios geraram grandes discussões sobre o uso da TRH, além de dúvidas entre médicos e pacientes. Um levantamento de 776 mulheres na Nova Zelândia em 2003 indicou que 58% delas pararam de fazer reposição devido aos resultados desfavoráveis do WHI (HICKEY; DAVIS; STURDEE, 2005). Então, criou-se uma polêmica mundial e um estado de alerta e de grande preocupação quanto a fazer ou não reposição hormonal; além disso, existem mulheres para quem a TRH é contra-indicada por problemas tromboembólicos ou histórico de câncer em si ou em seus familiares. Nestes casos, muito pouco pode ser oferecido para aliviar os sintomas do climatério e da menopausa. Por todas essas razões, o desenvolvimento de terapias

alternativas que possam trazer benefícios à saúde da mulher sem contra-indicações tem sido objeto de interesse (LIEN; LIEN, 1996; GLAZIER; GINA; BOWMAN, 2001; KASS-ANNESE, 2000).

## 2.8. *Fitoestrógenos (FEs)*

Entre as terapias alternativas para combater os sintomas indesejáveis da menopausa e as implicações mórbidas que acompanham esse período, sem expor as pacientes aos efeitos colaterais da TRH, a literatura aponta os FEs, compostos não-esteroidais que promovem efeitos estrogênicos em mamíferos e são estruturalmente semelhantes ao E<sub>2</sub>. As diversas atividades biológicas destes compostos são devidas, em parte, a sua capacidade de agir como agonista ao receptor de estrógeno (REs), promovendo efeitos estrogênicos, ou como antagonista, bloqueando ou alterando os REs, e assim, prevenindo contra a atividade estrogênica (MACKEY; EDEN, 1998; MURKIES; WILCOX; DAVIS, 1998; XU et al., 2000; KUIPER et al.; 1998). Desta forma, agindo como agonistas ou antagonistas, os FEs podem ser classificados como moduladores seletivos de receptores de estrógeno SERMs (SERMs - *selective estrogen receptor modulator*), assim como tamoxifeno e raloxifeno, sendo que o primeiro tem sido usado na clínica por pacientes com câncer de mama por agir como antagonista estrogênico no tecido mamário, reduzindo a proliferação de células cancerígenas, e como agonista no tecido ósseo e no sistema cardiovascular, prevenindo osteoporose e doenças cardíacas. Porém, o tamoxifeno tem mostrado atividade estrogênica no útero podendo aumentar o risco de câncer endometrial, além de não ser capaz de tratar os sintomas da menopausa (CARR, 1998).

Os estrógenos exercem diversos efeitos no corpo humano, tal como influenciar no crescimento e funcionamento dos tecidos reprodutivos femininos e masculinos, na preservação do esqueleto e do sistema nervoso central, promover efeitos cardioprotetores e proteger contra câncer de colo de útero e envelhecimento da pele. Considerando esses efeitos, é esperado que os FEs tenham importante papel na saúde humana, como prevenção de cânceres,

doenças cardíacas, aliviar os sintomas da menopausa e prevenir a osteoporose (CARSON-JURICA; SCHRADER; O'MALLEY, 1990).

Existem dois tipos de receptores de estrógenos nos quais os FEs podem se ligar, receptores  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) e  $\beta$  (RE $\beta$ ), que diferem-se na distribuição tecidual e na afinidade por ligantes. Estes são receptores nucleares que podem agir como fatores de transcrição para genes reguladores de estrógeno. Os FEs são potentes agonistas do RE $\beta$  e fracos agonistas do RE $\alpha$  e assim mostram efeitos estrogênicos principalmente em tecidos que expressam basicamente RE $\beta$ , tais como os ossos, sistema cardiovascular, pele e sistema nervoso central, sugerindo os diferentes caminhos para as ações dos mesmos e explicando as variáveis da especificidade de ação tecidual. Os FEs são capazes de interagir com enzimas e receptores, e devido a sua estrutura estável e ao baixo peso molecular, eles podem atravessar as membranas celulares (IMHOF et al.; 2006).

Os FEs são compostos naturalmente encontrados em alguns vegetais. Eles são divididos em quatro classes principais: 1) isoflavonas, encontradas na soja e em seus produtos; 2) lignanas, encontradas em todos os cereais e plantas oleaginosas, 3) flavonóides, encontrados em algumas frutas e vegetais; 4) coumestanas, encontradas nos brotos de feijão e alfafa. Os FEs encontrados na soja têm sido amplamente estudados porque a proteína da soja, uma rica fonte destes compostos, contém de 1 a 3 mg de isoflavona por grama de proteína (KUIPER et al.; 1998).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a ingestão de alimentos ricos em FEs pode fornecer proteção contra certos cânceres dependentes de estrógeno, tal como câncer de mama. Como exemplo, pode-se citar a associação entre uma baixa incidência de câncer de mama e próstata dentro de populações do sudeste da Ásia, uma vez que estes povos apresentam uma dieta rica em soja (ADLERCREUTZ, 2002; BARNES; KIM, 1995; LEE et al.; 1991; ADLERCREUTZ, 1995).

Segundo Knobf (1997), a média de isoflavonas da soja ingerida no Japão, é de 50 a 100 mg por dia, enquanto que os ocidentais consomem uma dieta com menos de 1 mg por dia. Esta diferença proeminente entre as dietas orientais e ocidentais tem feito os cientistas focalizarem a atenção nos benefícios fisiológicos do que eles têm denominado de “o grão benéfico”

(QUELLA et al.; 2000). Outros estudos epidemiológicos mostraram que asiáticos que emigraram para os EUA também tinham uma baixa incidência de câncer de mama, enquanto que seus descendentes, os quais consumiam principalmente alimentos ocidentais, tiveram um aumento no risco de câncer de mama (BECK; ROHR; JUNGBAUER, 2005).

## 2.9. Isoflavonas

A unidade estrutural básica das isoflavonas compreende dois anéis benzeno (A ou B), unidos por um anel pirrólico heterocíclico (C) (Figura 5). Até o momento aproximadamente 370 isoflavonas foram descritas (RIMBACH et al.; 2007).

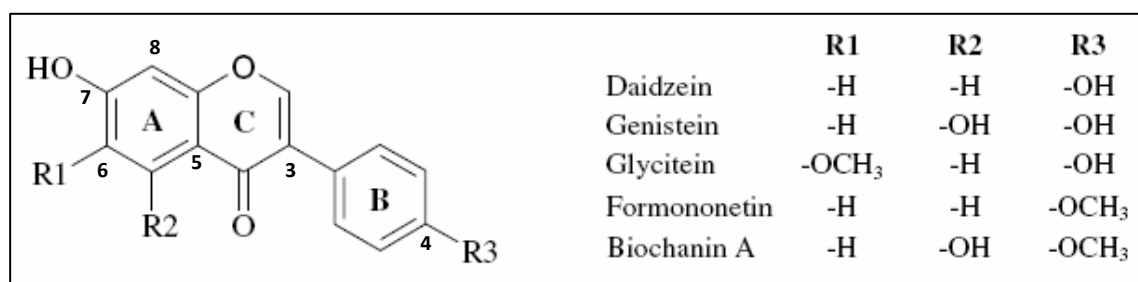


Figura 5 - Unidade estrutural básica das isoflavonas (RIMBACH et al.; 2007).

O anel fenólico, particularmente o que apresenta o grupo hidroxila (OH), anel A, não é uma estrutura esteroidal, porém é um componente essencial na interação com os ERs (CASSIDY; TERESA; RIMBACH, 2003).

As isoflavonas estão contidas nos alimentos na forma glicosilada, predominantemente como genisteína (4,5,7-triidroxiisoflavona) e daidzeína (4,7-diidroxiisoflavona), e em menor quantidade como gliciteína, formononetina e biocanina A (figura 6) (MURPHY et al.; 1999). Há relatos que a velocidade de absorção das isoflavonas na forma de agliconas é mais rápida que na forma glicosilada, assim como a primeira é absorvida em maior quantidade que a segunda (KAWAKAMI et al.; 2005).

Após a ingestão das isoflavonas, a daidzeína e a genisteína são metabolizadas no trato gastrointestinal. Biocanina A e formononetina são precursores metilados da genisteína e daidzeína, respectivamente. No

intestino, são convertidas por bactérias em suas respectivas agliconas. A absorção das várias isoflavonas varia entre indivíduos devido às diferenças na microbiota intestinal (BECK; ROHR; JUNGBAUER, 2005).

A daidzeína pode ser transformada em dihidrodaidzeína e então em O-des-metil-angolensina (O-DMA) e equol. Este não é metabolizado igualmente em humanos, e a capacidade individual de transformar isoflavonas em equol pode oferecer uma explicação para a variedade de resultados dos benefícios da dieta rica em isoflavona, e os produtores de equol podem ser mais beneficiados do que os não-produtores. Segundo Setchell et al (2002), 30-50% da população excretam equol na urina após consumo de soja. A genisteína é metabolizada em dihidrogenisteína e então em 6-hidroxi-O-DMA e p-etilfenol (composto inerte).

O metabolismo da isoflavona é variável entre indivíduos e é influenciado por outros componentes da dieta, por exemplo, uma alta quantidade de carboidratos leva a um aumento na formação de equol. Esses novos compostos produzidos do metabolismo podem ter diferentes efeitos biológicos e maior atividade estrogênica (como o equol) que as isoflavonas originais digeridas (KRENN; UNTERRIEDR; RUPRECHTER, 2002).

De forma geral, são absorvidos pelo trato intestinal após uma desconjugação pela flora bacteriana, com formação de fenóis heterocíclicos de estrutura similar ao estrogênio, o que os torna biodisponíveis. Na parede intestinal e no fígado, estes compostos sofrem um processo de conjugação a proteínas e, em sua maior parte, são enviados para a corrente sanguínea e a seus sítios de atuação. Uma pequena parte é excretada pela vesícula biliar, podendo sofrer nova desconjugação e reabsorção ou ser excretada pelas fezes. O maior volume dessas substâncias é retirado do organismo por via urinária (OSOSKI; KENNELLY, 2003).

A biodisponibilidade das isoflavonas é um importante fator para a avaliação dos suplementos de FEs. Estudos de diferentes preparações para TRH resultaram em discrepâncias entre o conteúdo de substâncias ativas determinadas por análises químicas e biológicas. O principal problema é a baixa qualidade de muitos produtos disponíveis no comércio, sendo necessário criar padrões de qualidade para tais produtos (BECK; ROH; JUNGBAUER, 2005).

As isoflavonas exercem efeitos estrogênicos e antiestrogênicos no metabolismo, dependendo de muitos fatores, incluindo sua concentração, a concentração de estrógenos endógenos e características individuais, tais como sexo e a fase da menopausa (BARNES; KIM, 1995; THAM; GARDNER; HASKELL, 1998).

Os FEs têm também efeitos sobre diferentes enzimas envolvidas no metabolismo dos hormônios esteroidais. A aromatase, enzima que converte androstenediona em estrona e testosterona em estradiol, é inibida pelos FEs. Com isso, a produção endógena de estrógeno fica diminuída, podendo ser responsável pelo efeito protetor contra o câncer de mama em populações com dieta rica em isoflavonas. As isoflavonas exercem seus efeitos inibitórios sobre muitas enzimas-chave do metabolismo esteroidal e assim diminuem o nível dos hormônios ativos nos respectivos tecidos. Muitos tipos de cânceres nos órgãos reprodutivos são dependentes de hormônios, e através da diminuição dos níveis dos hormônios ativos, o crescimento celular é evitado, sendo essa a base para explicar os efeitos benéficos de prevenção de câncer numa dieta rica em isoflavonas (WONG; KEUNG, 1999).

Após a menopausa, a densidade óssea freqüentemente está reduzida devido à deficiência dos hormônios ovarianos e, portanto, muitas pacientes sofrem de osteoporose. Rassi et al. (2002) investigaram os efeitos da daidzeína e do E<sub>2</sub> sobre o desenvolvimento e a atividade dos osteoclastos “*in vitro*”. A daidzeína inibe a diferenciação de osteoclastos, da mesma forma que o E<sub>2</sub>, devido a um aumento na apoptose dos seus progenitores mediados pelos REs. Outros estudos relataram uma estimulação dos osteoblastos pelos FEs maior que a inibição dos osteoclastos, e assim o mecanismo de ação das isoflavonas diferem dos estrógenos (WARREN; SHORTLE; DOMINGUEZ, 2002).

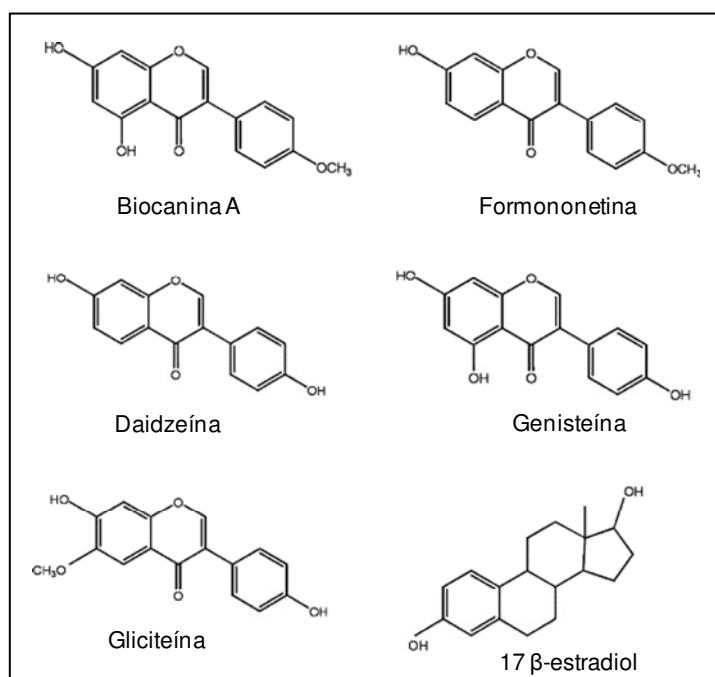




Figura 6 - Fórmula estrutural das isoflavonas. Adaptado de BECK et al.; 2005.

Há muitos relatos na literatura avaliando o papel terapêutico dos FEs como preventivo de doenças cardiovasculares, seja em modelos animais e/ou em mulheres em peri e pós-menopausa.

Os mecanismos sugeridos para explicar a prevenção contra doenças cardiovasculares e redução de aterosclerose são: melhora nas concentrações dos lipídios plasmáticos, redução na formação de trombos pela inibição da ação plaquetária, melhora da reatividade vascular e atividade antioxidante, alteração no metabolismo hepático e inibição da tirosina quinase. O efeito antioxidante pode ser devido à capacidade das isoflavonas de doar átomos de hidrogênio a radicais livres, diminuindo a reatividade dos mesmos (PARK; HUANG; FRISHMAN, 2005).

Para determinar se as isoflavonas são responsáveis pelo efeito da soja na melhora do perfil lipídico, alguns estudos compararam os efeitos da proteína da soja isolada rica em isoflavonas com os da proteína da soja isolada na qual a maioria das isoflavonas foi retirada por extração com álcool. Estes estudos mostraram que a primeira exerce esses efeitos, enquanto a segunda não, sugerindo que as isoflavonas são necessárias. O efeito é maior em mulheres hipercolesterolêmicas, embora pequenas, mas significantes mudanças foram encontradas em mulheres normocolesterolêmicas e moderadamente hipercolesterolêmicas (KURZER, 2003).

Simons et al. (2000) utilizaram FE para avaliar perfil lipídico e função endotelial. Trataram suas pacientes menopausadas com 80 mg de isoflavona/dia num estudo duplo cego, placebo controlado. Os autores não observaram mudanças significativas nestes dois parâmetros.

Clarkson et al. (2001) num trabalho feito com macacas ovariectomizadas e alimentadas com dieta aterogênica por 36 meses observaram que o grupo que recebeu soja isolada quando comparado com o grupo que recebeu estógeno apresentou um melhor perfil lipídico, ou seja, o tratamento promoveu

nas macacas um aumento nos níveis de HDL, sem nenhuma alteração nas taxas de triglicérides. Neste mesmo trabalho avaliou-se a progressão da aterosclerose, analisando o interior da artéria carótida (aterosclerótica pela dieta induzida). Observou-se que ambos os tratamentos, soja e estrógeno, reduziram significativamente a extensão da aterosclerose sobre a carótida, não havendo diferença entre eles, indicando assim o efeito benéfico da soja na prevenção de doenças cardiovasculares.

Nestel (2003) num estudo “*in vivo*” observou redução na agregação plaquetária (induzida por tromboxano) em pacientes tratadas com isoflavona, indicando assim uma menor tendência pró-trombótica nestas pacientes. Por outro lado, Rios et al (2008) não observaram alterações significativas nos parâmetros hemostáticos em pacientes na pós-menopausa ingerindo 40mg soja/dia durante seis meses.

### ***2.10. Atividade Antioxidante das isoflavonas***

As ROS, entre elas o  $O_2$ ,  $H_2O_2$  e o  $OH^-$  são moléculas de meia-vida curta, geradas por produtos do metabolismo. Elas reagem rapidamente com os componentes celulares, podendo causar danos nos lipídeos de membrana, nas proteínas celulares e no DNA (WIDLANSKY et al.; 2003; DRÖGE, 2002). A disfunção endotelial induzida pelas ROS, como descrito anteriormente, pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose e outras DVC (COOKE; FLOW, 2003).

A inibição da formação das ROS ou o seqüestro dessas moléculas previne o estresse oxidativo. (HERMANN; ZEIHNER; DIMMELER, 1997). O estresse oxidativo vascular está intimamente associado à disfunção endotelial dependente de NO. Assim, é crescente a utilização de compostos antioxidantes, principalmente aqueles de origem dietética, na busca da prevenção das DCV (AVIRAM; FUHRMAN, 1997). Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram a relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em FEs, entre eles as isoflavonas e a mortalidade (HERTOG et al., 1995).

O mecanismo sugerido para esse efeito anti-aterogênico desses compostos tem sido a inibição das reações mediadas por radicais livres, à sua capacidade de seqüestrar as ROS e de quelar metais (RUCINSKA; KIRKO; GABRYELAK, 2007).

Parte desse efeito é atribuído à genisteína, que atua como bom seqüestrador de radicais livres (DUGAS et al., 2000) e apresenta efeitos de proteção contra a peroxidação lipídica e contra ao dano oxidativo no DNA (SAIJA et al., 1995). Isso ocorre pois a genisteína aumenta a ação de enzimas com atividade antioxidante como: a SOD e a GP<sub>x</sub>-3 (Glutathione peroxidase plasmático) (RIMBACH et al.; 2007).

### ***2.11. Isoflavonas e Fatores Derivados do Endotélio***

Estudos “*in vivo*” têm demonstrado que as isoflavonas da soja são capazes de melhorar o quadro de disfunção endotelial. Squadrito et al.; (2002), demonstraram que a genisteína influencia na função endotelial de mulheres na pós-menopausa, alterando o balanço entre a produção de NO e ET-1.

Galiesteo et al. (2005) verificaram que camundongos tratados com dieta rica em soja apresentavam melhora no quadro de disfunção endotelial e de hipertensão, provavelmente devido ao aumento da síntese de NO pela eNOs .

Siow e colaboradores (2007) verificaram que a suplementação alimentar com genisteína melhora a função endotelial em humanos e em modelo animal com hipertensão leve ou moderada.

Trabalhos “*in vitro*” também têm demonstrado os efeitos das isoflavonas na liberação dos fatores derivados do endotélio. A produção de PG por células endoteliais de cordão umbilical humanas (HUVEC – *Human umbilical vein endothelial cell*) é estimulada após exposição a fitoestrógenos (GARCIA-MARTINEZ et al.; 2003). A literatura aponta que o extrato de *Red clover* (um tipo de isoflavona) exerceu relevante ação protetora sobre CEs humanas por estimular a síntese de NO, através da ativação na liberação de NOs (SIMONCINI et al.; 2005). Räthel et al. (2005), demonstraram que a genisteína e a daidzeína extraídas da soja aumentam a produção de NO em cultura de CEs via eNOs.

Hermenegildo e colaboradores (2005), estudaram os efeitos dos metabólitos da isoflavona genisteína e daidzeína em HUVECs, e verificaram aumento da síntese de PGI<sub>2</sub> quando estas foram tratadas com as isoflavonas. CEs de linhagem ECV304 tratadas com o flavonóide icariin, aumentaram a síntese de NO via eNOs (THAM; GARDNER; HASKELL, 1998).

## 7. *Conclusão*

O estímulo de células endoteliais humanas imortalizadas ECV304 pelas isoflavonas da soja e pelo 17 $\beta$ -estradiol sugere que:

- O 17 $\beta$ -estradiol e as isoflavonas da soja, especialmente a daidzeína e a genisteína, conferem proteção contra o dano celular induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- Houve aumento significativo na síntese de NO pelas ECV304 estimuladas com o 17 $\beta$ -estradiol em concentração semelhante à concentração sérica encontrada em mulheres na idade fértil (1 $\mu$ M);
- Houve aumento significativo na síntese de NO pelas ECV304 estimuladas com o 17 $\beta$ -estradiol em concentração semelhante à concentração sérica encontrada em mulheres na pós-menopausa (0.1 $\mu$ M);
- Houve aumento significativo na síntese de NO pelas ECV304 estimuladas com as isoflavonas daidzeína e genisteína;
- As isoflavonas daidzeína e genisteína aumentam significativamente a produção de NO pelas ECV304 pré-estimuladas com o 17 $\beta$ -estradiol em concentração semelhante à concentração sérica encontrada em mulheres na menopausa (0.1 $\mu$ M);
- O antagonista dos receptores estrogênicos ICI 182.780 inibiu a produção de NO pelas ECV304 estimuladas com o 17 $\beta$ -estradiol e com as isoflavonas genisteína e daidzeína ;
- O pré-tratamento com 100  $\mu$ M de N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) inibiu a produção de NO pelas ECV304 estimuladas com o 17 $\beta$ -estradiol e com as isoflavonas genisteína e daidzeína;
- As isoflavonas biocanina A e formononetina não alteraram significativamente a produção de NO pelas ECV304 nas concentrações e tempos testados;
- Houve aumento significativo na síntese de PGE<sub>2</sub> pelas ECV304 estimuladas com o 17 $\beta$ -estradiol em concentração semelhante à concentração sérica encontrada em mulheres na idade fértil (1 $\mu$ M);

- Houve aumento significativo na síntese de PGE<sub>2</sub> pelas ECV304 estimuladas com o 17β-estradiol em concentração semelhante à concentração sérica encontrada em mulheres na pós-menopausa (0.1μM);

- Houve aumento significativo na síntese de PGE<sub>2</sub> pelas ECV304 estimuladas com as isoflavonas daidzeína e genisteína;

- As isoflavonas daidzeína e genisteína aumentam significativamente a produção de PGE<sub>2</sub> pelas ECV304 pré-estimuladas com o 17β-estradiol em concentração semelhante à concentração sérica encontrada em mulheres na menopausa (0.1μM);

- O antagonista dos receptores estrogênicos ICI 182,780 inibiu a produção de PGE<sub>2</sub> pelas ECV304 estimuladas com o 17β-estradiol e com as isoflavonas genisteína e daidzeína ;

- As isoflavonas biocanina A e formononetina não alteraram significativamente a produção de PGE<sub>2</sub> pelas ECV304 nas concentrações e tempos testados;

- Não houve alteração na síntese de ET-1 nas culturas estimuladas pelas isoflavonas e pelo 17β -estradiol nas concentrações e tempos testados.

## 8. *Referências Bibliográficas*

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. **Environmental Health Perspectives**, Triangle Park, v. 103, p. 103-112, Oct. 1995.

ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **The Lancet Oncology**, London, v. 6, p. 364-73, Jun. 2002.

AL-AZZAWI, F.; WAHAB, M.; THOMPSON, J.; PORNEL, B.; HIRVONEN, E.; YLIKORKALA, O.; VAN DER; MOOREN, M J.; DILLON, J.; MAGARIL, C. Acceptability and patterns of endometrial bleeding in estradiol-based HRT regimens: a comparative study of cyclical sequential combinations of trimegestone or norethisterone acetate. **Climacteric : the journal of the International Menopause Society**, New York, v. 4, p. 343-354, Dec. 2001.

ALDERTON, W,K.; COOPER, C,E.; KNOWLES, R,G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, London, v.1, p.593-615, Aug. 2001.

AREHART, E.; GLEIM, S.; KASZA, Z.; FETALVERO, K, M.; MARTIN, K, A. Prostacyclin, atherothrombosis, and cardiovascular disease. **Current medicinal chemistry**, Schiphol, v. 20, p.2161-2169, Nov. 2007.

ARORA, A.; NAIR, M, G.; STRASBURG, G, M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 2, p.133-141, Aug. 1998.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated

BAI, W.; ZHENG, S.; DONG, Y. Effects of estrogen on vascular walls. **Zhonghua fu chan ke za zhi**, Beijing, v.32, p.251-252, Apr. 1997.

BARNES, S.; KIM, H. Soy isoflavones, estrogens, and growth factor signaling. **Soy Connection**, v. 6, p. 1-5, Mar.1995.

BARRETT-CONNOR, E.; BUSH, T, L. Estrogen and coronary heart disease in women. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 265, p.1861–1867, Apr. 1991.

BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 94, p. 499-518, Mar. 2005.

BECKMAN, J, S.; BECKMAN, T, W.; CHEN, J.; MARSHALL, P,A.; FREEMAN, B,A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite; implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.1620-1624, Feb.1990.

BILSEL, A, S.; MOINI, H.; TETIK, E.; AKSUNGAR , F.; KAYNAK, B.; OZER, A. 17Beta-estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. **Cardiovascular research**, London, v. 3, p. 579-584, Jun. 2000.  
**Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1, p. 1-9, Oct. 2006.

BONETTI, P, O.; LERMAN, L,O.; LERMAN A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas v.23, p.168-175, Feb. 2003.

BREDDT, D, S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free radical research**, v.6, p.577-596, California, Dec.1999.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase membrane targeting. Evidence against involvement of a specific myristate receptor. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.7, p.25016-2520, Oct. 1994.

BUSSE, R.; FLEMING, I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Journal of vascular research**, New York, v.33, p.181-194, May. 1996.

CALLEJON, D, R.; FRANCESCHINI, S, A.; MONTES, M, B.; TOLOI, M, R. Hormone replacement therapy and hemostasis: effects in Brazilian postmenopausal women. **Maturitas**, Amsterdam, v.52, p.249-255, Nov. 2005.

CAMPBELL, W, B.; FALCK, J, R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Hypertension**, Dallas, v.49, p.590-596, Jan. 2007.

CARR, B, R. Disorders of the ovaries and female reproductive tract. In: Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., Larsen P.R. (Eds.), **Williams Textbook of Endocrinology**. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 751–773, Jan. 1998.



CARSON-JURICA, M, A.; SCHRADER, W, T.; O'MALLEY, B, W. Steroid receptor family: structure and functions. **Endocrine reviews**, Baltimore, v.2,p.201-220, May. 1990.

CASSIDY, A.; TERESA, D, S.; RIMBACH, G. Molecular mechanisms by which dietary isoflavones potentially prevent atherosclerosis. **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v.24, p.1-15, Sep. 2003.

CELERMAJER,D,S.;SORENSEN,K,E.;GEORGAKOPOULOS,D.;BULL,C.;THO MA,S,O.; ROBINSON,J.; DEANFIELD, J,E. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. **Circulation**, Dallas, v.5,p.2149-2155, Nov. 1993.

CHAMBLISS, K, L.; SHAUL, P, W. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. **Endocrine Society**, Baltimore, v.23, p.665-686, Oct. 2002.

CHANDRASEKHARAN, N, V.; SIMMONS, D, L. The cyclooxygenases. **Genome biology**, London, v.5, p.241-246, Aug. 2005.

CHEN, Z.; YUHANNA, I, S. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v.103, p.401-406, Feb.1999.

CHING, H,L.;WATTS,G,F.;DHALIWAL,S,S.;BARRETT,P,H.;STUCKEY,B,G. Vascular function of forearm microcirculation in postmenopausal women with type 2 diabetes: potential benefit of hormone replacement therapy? **Climacteric : the journal of the International Menopause Society**, New York, v.6, p.31-37, Mar. 2003.

CLARKSON, T.B.; ANTHONY, M.S.; MORGAN, T.M. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 86, p. 41-47, Nov. 2001.

COOKE, P.; FLOW, P. NO and atherogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington,v.100, p. 768-770, Jan. 2003.

CRISAFULLI, A.; D'ANNA, R.; BAVIERA, G.; CORRADO, F.; CANCELLIERI, F.; SQUADRITO. The effect of the phytoestrogen genistein and hormone replacement therapy on homocysteine and C-reactive protein level in postmenopausal women. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, Copenhagen, v.5, p.474-477, Mai. 2005.

DAÍ, W.; KLONER, R.A. Relationship between cyclooxygenase-2 inhibition and thrombogenesis. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, Naperville, v.9, p.51-59, Mar. 2004.

DASHWOOD, M, R.; TSUI, J, C. Endothelin-1 and atherosclerosis: potential complications associated with endothelin-receptor blockade. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 2, p. 297-304, Feb. 2002.

DAVIS, N.; KATZ, S.; WYLIE-ROSETT, J. The effect of diet on endothelial function. **Cardiology in review**, Baltimore, v. 2, p.62-66, Mar.2007.

DAWSON, V, L.; DAWSON, T, M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Progress in brain research**, Amsterdam, v. 118, p.118-215, Sep. 1998.

DEANFIELD, J, E.; HALCOX ,J ,P.; RABELINK, T ,J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, Dallas, v.115, p.1258-1295, Mar. 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v.82, p.47-95, Jan. 2002.

DUGAS, J, R.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G,C.; PRICE, K,L.; FISCHER N,H.; WINSTON, G,W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of natural products**, Cincinnati, v.63, p.327-331, Mar. 2000.

ENDEMANN, D.; SCHIFFRIN, E. Endothelial Dysfunction. **The American Society of Nephrology**, Washington ,v.15, p.1983-1992, Aug. 2004.

FORTE, P.; KNEALE, B. J.; MILNE, E.; CHOWIENCZYK, P, J.; JOHNSTON, A.; BENJAMIN, N.; RITTER, J, M. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. **Hypertension**, Dallas, v. 32,p.730-734, Oct. 1998.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, London, v.6, p.288-373, Nov, 1980.

GALISTEO, M.; VILLAR, I. C.; SANCHEZ, M.; ZARZUELO, A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Soy isoflavones improve endothelial function in spontaneously hypertensive rats in an estrogen-independent manner: role of nitric-oxide synthase, superoxide, and cyclooxygenase metabolites. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Baltimore, v.3, p.1300-1309, Sep. 2005.

GARCIA-MARTINEZ, M. C.; HERMENEGILDO, C.; TARIN, J. J.; CANO A. Phytoestrogens increase the capacity of serum to stimulate prostacyclin release in human endothelial cells. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, Copenhagen, v.8, p.705-710, Aug. 2003.

GARTNER, P. R.; FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the E.coli 6-phosphogluconate dehydratase. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 1478-1483, Jan. 1991.

GENSINI, G. F.; MICHELI, S.; PRISCO, D.; ABBATE, R. Menopause and risk cardiovascular disease. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 84, p. 1-19, Oct. 1996.

GIBSON, L. L.; HAHNER, L.; OSBORNE-LAWRENCE, S.; GERMAN, Z.; WU, K. K.; CHAMBLISS, K. L.; SHAUL, P. W. Molecular basis of estrogen-induced cyclooxygenase type 1 upregulation in endothelial cells. **Circulation research**, Baltimore, v. 5, p. 518-525, Mar. 2005.

GLAZIER, M.; GINA, M. B.; BOWMAN, M. A. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 161, p. 1161-72, May. 2001.

GOU, Q.; LIU, C. H.; BEN-AV, P.; HLA, T. Dissociation of basal turnover and cytokine-induced transcript stabilization of the human cyclooxygenase-2 mRNA by mutagenesis of the 3'-untranslated region. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v.26, p. 508-512, Jan. 1998.

GRODSTEIN, F.; HU, F. B. Postmenopausal hormone therapy and the risk of cardiovascular disease: the epidemiologic evidence. **The American journal of cardiology**, New York, v.3, p. 26F-29F, Jul. 2002.

GRYGLEWSKI, R, J.; PALMER, R, M, J; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, London, v. 320, p. 454-456, Apr. 1986.

HALLER, H. Endothelial function. General considerations. **Drugs**, New York, v.53, p.1-10, Jan. 1997.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of neurochemistry**, London, v.59, p.1609-1623, Nov.1992.

HANS, S.; WALSH, B.; EVANS, S.; KRACHE, M.; RAVNIKAR, V.; SCHIFF, L. The effect of transdermal estradiol on hormone and metabolic dynamics over a six-week period. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 715, p. 671-76, Sep. 1988.

HENNIG, B.; TOBOREK, M.; CADER, A, A.; DECKER, E, A. Nutrition, endothelial cell metabolism, and atherosclerosis. **Critical Reviews in food science and nutrition**, Philadelphia, v.34, p.253-258, Jan. 1994.

HERMANN, C.; ZEIHNER, A, M, S.; DIMMELER, S. Shear stress inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Baltimore, v. 17, p.3588–3592, Dec. 1997.

HERMENEGILDO, C.; OVIEDO, P .J.; GARCIA-PEREZ, M .A.; TARIN, J. J.; CANO, A. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Baltimore, v. 315, p. 722-728, Nov. 2005.

HERMENEGILDO, C.; OVIEDO, P,J.; CANO, A. Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 12, p. 205-215, Oct. 2006.

HERTOG, M,G, J., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., GIAMPAOLI, S., JANSEN, A., MENOTTI, A., NEDELJKOVIC, S., PEKKARINEN, M., SIMIC, B. S., TOSHIMA, H., FESKENS, E. J. M., HOLLMAN, P. C. H; KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of internal medicine**, Chicago, v. 155, p. 381-386, Feb. 1995.

HICKEY, M.; DAVIS, S, R.; STURDEE, D, W. Treatment of menopausal symptoms: what shall we do now? **Lancet**, London, v. 366, p. 409-421. Jan. 2005.

HUIE, R, E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free radical research communications**, New York, v. 18, p. 195-199, Jan.1993.

HURLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T. et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS). **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 280, p. 605-613. Aug. 1998.

IMHOF, M.; GOCAN, F.; REITHMAYR, F.; LIPOVAC, M.; SCHIMITZEK, C.; CHEDRAUI, P.; HUBER, J. Effects of a red clover (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women. **Maturitas**, Amsterdam, v. 38, p. S41-8, Nov. 2006.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A, B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 364, p. 279-282, May.1995.

KASS-ANNESE, B. Alternative therapies for menopause. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v. 43, p. 162-83, Mar. 2000.

KAWAKAMI, Y.; TSURUGASAKI, W.; NAKAMURA, S.; OSADA, K. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 16, p. 205-212, Apr. 2005.

KENEMANS, P.; VAN UNNIK, G. A.; MIJATOVIC, V.; VAN DER MOREN, M. J. Perspectives in hormone replacement therapy. **Maturitas**, Amsterdam, v. 15, p. s41-s48, Jun. 2001.

KIM, J, A.; FORMOSO, G, L, I Y.; POTENZA, M, A.; MARASCIULO, F, L.; MONTAGNANI, M.; QUON, M, J. Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 18, p. 13736-13745, May.2007.

KLEINERT, H.; WALLERATH, T.; FRITZ, G.; IHRIG-BIEDERT, I.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F.; GELLER, D. A. ; FORSTERMANN, U. Cytokine

induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. **British journal of pharmacology**, London, v.1, p. 193-201, Jun. 1998.

KLUG, D.; RABANI, J.; FRIDOVICH, I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.15, p. 4839-4842. Aug. 1972.

KNOBF, M, T. More than symptom relief. **Innovations breast cancer care**, v. 2, p. 41-63, Mar. 1997.

KRENN, L, I.; UNTERRIEDER, R.; RUPRECHTER, T. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography **Journal of Chromatography**, London, v.777, p.123–128, Sep. 2002.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S.H.; van der SAAG, P.T.; van der BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . **Endocrinology**, Springfield, 1998, v. 139, p. 4252-4263, Oct. 1998.

KURZER, M.S. Phytoestrogen supplement use by women. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 1983S-1986S, Oct. 2003

LEE, H.P.; GOURLEY, L.; DUFFY, S.W.; ESTEVE, J.; LEE, J.; DAY, N.E. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. **Lancet**, London, v. 337, p. 1197-2000, May. 1991.

LEIKERT, J, F.; RÄTHEL, T, R.; VOLLMAR, A, M.; DIRSCH, V, M. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 5, p.131-134, Oct. 2001.

LIEN, L, L.; LIEN, E, J.. Hormone therapy and phytoestrogens. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, Oxford, v. 21, p. 101-11, Abr.1996.

LIMA, S, M, R.; ALDRIGHI, J, M.; CONSOLIN-COLOMBO, F, M.; MANSUR, A.; RUBIRA, M, C.; KRIEGER, E, M.; et al. Acute administration of 17 $\beta$ -estradiol improves endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. **Maturitas**, Amsterdam, v. 50, p.266-274, Dec. 2005.

LIU, D.; HOMAN, L, L.; DILLON, J, S. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cell by a cyclic adenosine 5-monophosphate-

dependent mechanism. **Endocrinology**, Springfield, v.12, p.5532-5539, Dec. 2004

LOSORDO, D. W.; ISNER, J. M. Estrogen and angiogenesis: A review. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v.1, p. 6-12, Jan. 2001.

MACKEY, R.; EDEN, J. Phytoestrogens and the menopause. **Climacteric: The Journal of the International Menopause Society**, New York, v. 4, p. 302-308, Dec. 1998.

MAHMOUDI, M.; CURZEN, N.; GALLAGHER, P, J. Atherosclerosis: the role of inflammation and infection. **Histopathology**, Oxford, v.50, p.534-546, April. 2007.

MÄKELÄ, S.; SAVOLAINEN, H.; AAVIK, E.; MYLLÄRNIEMI, M.; STRAUSS, L.; TASKINEN, E.; GUSTAFSSON, J, A.; HÄYRY, P. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 7077-7082, Jun. 1999.

MANN, G, E.; ROWLANDS, D, J.; LI FY, D, E.; WINTER, P.; SLOW, R, C. Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression. **Cardiovascular research**, London, v. 15, p. 261-277, Jul. 2007.

MARASCIULO, F ,L.; MONTAGNANI, M.; POTENZA, M,A. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. **Current medicinal chemistr**, Schiphol, v.13, p.1655-1665, Mai. 2006.

MATURANA, M, M, A.; IRIGOYEN, M, C.; SPRITZER, P, M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction. **Clinics : official scientific journal of Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo**, São Paulo, v.62, p.77-86, Feb.2007.

MENDELSON, M, E.; KARAS, R, H. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. **Science**, Washington, v. 308, p.1583–1587, Jun. 2005.

MENDELSON, M. E. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, New York, v. 5, p. 337-343, Nov. 2000.

MERCURO, G.; LONGU, G.; ZONCU, S.; CHERCHI, A. Impaired forearm blood flow and vasodilator reserve in healthy postmenopausal women. **American heart journal**, St. Louis, v. 4, p.692-697, Apr. 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, E, A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handbook of experimental pharmacology**, Berlin, v.1, p.213-254, Jan. 2006.  
MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.16, p.55-56, Dec. 1983.

MULLANE, K, M.; PINTO, A. Endothelium, arachidonic acid, and coronary vascular tone. **Federation proceedings**, Washington, v.46, p.54-56, Jan. 1987.

MURKIES, A, L.; WILCOX, G.; DAVIS, S, R. PHYTOESTROGENS. **THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM**, SPRINGFIELD, V. 83, P. 297-303, Feb. 1998.

MURPHY, P, A.; SONG, T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K.; BEECHER, G, R.; TRAINER, D.; HOLDEN, J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** ,Washigton, v. 47, p. 2697-2704, Jul. 1999.

NESTEL P. Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions. **Current Opinion in Lipidology** , London, v. 14, p. 3-8, Feb. 2003.

NIH CONFERENCE. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Management of Menopause-Related Symptoms. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 142, p. 1003-13, Oct. 2005.

OSOSKI, A, L.; KENNELLY, E, J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytotherapy Research: PTR**, London, v. 18, p. 845-869, Sep. 2003.

OSTERLUND, M, K.; HURD, Y ,L. Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders. **Progress in neurobiology**, Oxford, v.64, p.251-267, Jun. 2001.



PADMAJA, S.; HUIE, R, E. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 195, p. 539-544, Sep.1993.

PALMER, R, M.; FERRIGE, A, G.; MONCADA, S. NO release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, London, v.327, p.524–526. Sep. 1987.

PARK, D.; HUANG, T.; FRISHMAN, W.H. Phytoestrogens as cardioprotective agents. **Cardiology in Review** , Baltimore, v. 13, p. 13-17, Sept. 2005.

PARKINGTON, H, C.; COLEMAN, H, A.; TARE, M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, London, v.49, p.509-514, Jun. 2004.

POLDERMAN, K, H.; STEHOUWER, C, D.; VAN KAMP, G, J.; DEKKER, G, A.; VERHEUGT, F, W.; GOOREN, L, J. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. **Annals of internal medicine**, Philadelphia, v. 6, p. 429-432, Mar. 1993.

QUELLA, S, K.; LOPRINZI, C, L.; BARTON, D, L.; KNOST, J, A.; SLOAN, J, A.; LAVASSEUR, B, I.; SWAN, D.; KRUPP, K, R.; MILLER, K, D.; NOVOTNY, P, J. Evaluation of phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: a North Central Cancer Treatment Group Trial. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 5, p. 1068-1074, Mar. 2000.

RADI, R.; BECKMAN, J, S.; BUSH, K, M.; FREEMAN, B, A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 4244-4250, Mar. 1991

RAHIMIAN, R.; CHAN, L.; GOEL, A.; POBURKO, D.; VAN BREEMEN, C. Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v.17, p. 373-379, Feb. 2004.

RASSI, C, M.; LIEBERHERR, M.; CHAUMAZ, G.; POINTILLART, A.; COUMOT, G. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 17, p. 630-638, Apr. 2002.

RÄTHEL, T, R.; LEIKERT, J, F.; VOLLMAR , A, M.; DIRSCH, V ,M. The soy isoflavone genistein induces a late but sustained activation of the endothelial nitric oxide-synthase system in vitro. **British journal of pharmacology**, London, v.144, p.394-399, Feb. 2005.

REILLY, M.; FITZGERALD, G, A. Cellular activation by thromboxane A2 and other eicosanoids. **European heart journal**, London, v.K, p.88-93, Dec. 1993.

REINHART, K, C.; DUBEY, R, K.; COMETTI, B.; KELLER , P, J.; ROSSELLI , M. Differential effects of natural and environmental estrogens on endothelin synthesis in bovine oviduct cells. **Biology of reproduction**, New York, v. 4, p. 1430-1436. Nov. 2003.

RIMBACH, G.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; FRANK, J.; FUCHS, D.; WENZEL, U.; DANIEL, H.; HALL, W, L.; WEINBERG, P, D. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - A molecular perspective. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, New York, v.3, p.335-341,Jul.2007.

RIOS, D, R, A.; RODRIGUES, E, T.; CARDOSO, A, P.; MONTES, M, B.; FRANCESCHINI, S, A.; TOLOI, M, R. Effects of isoflavones on the coagulation and fibrinolytic system of postmenopausal women. **Nutrition**, Los Angeles, v. 24, p.120-126, Jan. 2008.

RUCINSKA, A.; KIRKO, S.; GABRYELAK, T. Effect of phytoestrogen, genistein-8-c-glucoside on Chinese hamster ovary. **Cell biology international**, London,v.31, p.1371-1378, May. 2007.

RUIZ-LARREA, M, B.; MOHAN, A, R.; PAGANGA, G.; MILLER, N, J.; BOLWELL ,G, P.; RICE-EVANS, C,A. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free radical research**, London, v. 26, p.63-70, Jan. 1997.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free radical biology & medicine**, New York, v.19, p. 481-486, Oct. 1995.

SANADA, M.; HIGASHI, Y.; NAKAGAWA, K.; KODAMA, I.; TSUDA, M.; NAGAI, N.; CHAYAMA, K.; OHAMA ,K. Comparison of forearm endothelial function between premenopausal and postmenopausal women with or without hypercholesterolemia. **Maturitas**, Amsterdam, v.44, p.307-315, Apr. 2003.

SCHNEIDER, M,P.;BOESEN, E,I.; POLLOCK ,D,M. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Palo Alto, v. 47, p.731-759, Feb. 2007.

SEEGER, H.; MUECK, A, O.; LIPPERT, T, H. Effect of estradiol metabolites on prostacyclin synthesis in human endothelial cell cultures. **Basic life sciences**, New York, v. 13, p. 167-170, Sep. 1999.

SETCHELL, K, D.; BROWN, N, M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, p. 3577-3584, Dec. 2002.

SHIGENAGA, M, K.; HAGEN, T, M.; AMES, B, N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 10771-10778, Nov. 1994.

SIMON, B, C.; CUNNINGHAM, L, D.; COHEN, R, A. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v.86, p. 75-79, Jun. 1990.

SIMONCINI, T.; FORNARI, L.; MANNELLA, P.; CARUSO, A.; GARIBALDI, S.; BALDACCI, C.; GENAZZANI, A. R. Activation of nitric oxide synthesis in human endothelial cells by red clover extracts. **The journal of the British Menopause Society**, Marlow, v. 12, p. 69-77, Jan. 2005.

SIMONCINI, T.; GENAZZANI, A, R. Raloxifene acutely stimulates nitric oxide release from human endothelial cells via an activation of endothelial nitric oxide synthase. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Springfield, v. 85, p.2966-2969, Aug. 2000.

SIMONS, L.A.; VON KONIGSMARK, M.; SIMONS, J.; CELERMAJER, D.S. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 85, p. 1297-301,Jun.2000.

SLOW, R, C.; LI, F,Y.;ROWLANDS, D,J.;DE WINTER, P.; MANN, G,E. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional

regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. **Free radical biology & medicine**, New York, v.42, p.909-925, Apr. 2007.

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

SMITH, W, L.; DEWITT, D, L.;GARAVITO, R,M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual review of biochemistry**, California, v.69, p.145-182, Dec. 2000.

SPEROFF, L. A transição da peri-menopausa. **Reprodução & Climatério**, Ribeirão Preto, v. 14, p. 59-61, Set. 1999.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; MORABITO, N.; CRISAFULLI, A.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; RUGGERI, P.; CAMPO, G. M.; CALAPAI, G.; CAPUTI, A. P.; SQUADRITO, G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.2, p. 339-347, Aug. 2002.

STANKEVICIUS, E.; KEVELAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, Lithuania, v.39, p.333-341, Jun. 2003.

STEFFEN, Y.; SCHEWE, T.; SIES, H. Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 3, p. 828-833, Aug. 2007.

TADDEI, S.; SALVETTI, A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. **Journal of hypertension**, London, v.20, p.1671-1674, Sep. 2002.

TANG, Y, B.; WANG, Q, L.; ZHU, B, Y.; HUANG H, L.; LIAO, D, F. Phytoestrogen genistein supplementation increases eNOS and decreases caveolin-1 expression in ovariectomized rat hearts. **Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]**, Beijing, v.57, p.373-378, Jun. 2005.

THAM, D, M.; GARDNER, C.D.; HASKELL, W,L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and

mechanistic evidence. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Springfield, v. 83, p. 2223-2235, Jul. 1998.

VIÑA, J.; SASTRE, J.; PALLARDÓ, F, V.; GAMBINI, J.; BORRÁS, C. Modulation of longevity-associated genes by estrogens or phytoestrogens. **Biological chemistry**, Berlin, v. 8, p. 33-40, Jan. 2008.

VITA, J, A.; KEANEY, J, F. Hormone replacement therapy and endothelial function: the exception that proves the rule? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas,v.21,p.1867-1869, Dec. 2001.

VOETSCH, B.; JIN, R,C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. **Histochemistry and cell biology**, Berlin, v.122, p.353-367, Aug. 2004.

VOGEL, R, A. Cholesterol lowering and endothelial function. **The American journal of medical electronics**, New York,v.5, p.479-487, Nov. 1999.

WARREN, M, P.; SHORTLE, B.; DOMINGUEZ, J, E. Use of alternative therapies in menopause. **Best Practice and Research. Clinical Obstetrics & Gynecology**, London, vol. 16, p. 411-448. Jun. 2002.

WEBB, D, J.; HAYNES, W,G. The role of endothelin-1 in cardiovascular physiology and pathophysiology. **Scottish medical journal**, Glasgow, v. 40, p.69-71, Jun. 1995.

WHI- The Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA: The journal of the American Medical Association**. Chicago, v.288, p. 321-333, Jul. 2002.

WIDLANSKY, M, E.; GOKCE, N, J, F.; KEANEY J, R., VITA, J, A. The clinical implications of endothelial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology** , New York, v.42, p.1149–1160. Oct. 2003

WOLIN, M.,S. Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. **Microcirculation**, New York, v.3,p.1-17, Mar. 1996.

WONG, C. K.; KEUNG, W. M. Bovine adrenal 3[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase E.C. 1.1.1.145/5-ene-4-ene isomerase (E.C.5.3.3.1): characterization and its inhibition by isoflavonas. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 719, p. 191-202, Feb. 1999.

XU, X; DUNCAN, A. M; WANGEN, K. E; KURZER, M. S. Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, Philadelphia, v. 8, p. 781-786, Aug. 2000.

ZHOU, Z.; WANG, S, Q.; LIU, Y.; MIAO, A, D. Cryptotanshinone inhibits endothelin-1 expression and stimulates nitric oxide production in human vascular endothelial cells **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1,p.1-9, Jan. 2005.