

## Tratamento com Resveratrol Normaliza a Função Endotelial e a Pressão Arterial em Ratas Ovariectomizadas

*Resveratrol Treatment Normalizes the Endothelial Function and Blood Pressure in Ovariectomized Rats*

Victor Fabricio, Jorge Camargo Oishi, Bruna Gabriele Biffe, Leandro Dias Gonçalves Ruffoni, Karina Ana da Silva, Keico Okino Nonaka, Gerson Jhonatan Rodrigues

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP – Brasil

### Resumo

**Fundamentos:** Apesar de se saber que o resveratrol apresenta efeitos sobre a pressão arterial e os vasos sanguíneos, e que os fitoestrógenos podem melhorar o relaxamento/vasodilatação dependente do endotélio, não há relatos do efeito direto do resveratrol sobre a pressão arterial e a função endotelial em animais com deficiência de estrógeno (mimetizando a pressão arterial aumentada pós-menopausa).

**Objetivo:** Verificar o efeito de dois diferentes períodos de tratamento preventivo com resveratrol sobre a pressão arterial e a função endotelial em ratas adultas jovens ovariectomizadas.

**Métodos:** Foram utilizadas ratas Wistar com 3 meses de idade, distribuídas em 6 grupos: grupos intactas com 60 ou 90 dias, grupos ovariectomizadas com 60 ou 90 dias, grupos ovariectomizadas e tratadas com resveratrol na dose de 10mg/kg de massa corporal por dia, durante 60 ou 90 dias, sendo o número de dias em cada grupo relativo à duração do período experimental. Foi realizado um estudo de reatividade vascular em anéis da aorta abdominal, mensurada a pressão arterial sistólica e quantificada a concentração sérica de óxido nítrico (NO).

**Resultados:** A ovariectomia induziu aumento da pressão arterial 60 e 90 dias após a cirurgia, enquanto a função endotelial decaiu apenas após 90 dias, e não houve diferença na concentração de NO entre os grupos. Apenas o tratamento prolongado com resveratrol (90 dias) foi capaz de melhorar a função endotelial e normalizar a pressão arterial.

**Conclusão:** Nossos resultados sugerem que o tratamento por 90 dias com resveratrol é capaz de melhorar a função endotelial e diminuir a pressão sanguínea em ratas ovariectomizadas. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(2):116-121)

**Palavras-chave:** Pressão Arterial; Ratos Wistar; Resveratrol; Fitoestrógenos; Ovariectomia; Endotélio Vascular.

### Abstract

**Background:** Despite knowing that resveratrol has effects on blood vessels, blood pressure and that phytoestrogens can also improve the endothelium-dependent relaxation/vasodilation, there are no reports of resveratrol's direct effect on the endothelial function and blood pressure of animals with estrogen deficit (mimicking post-menopausal increased blood pressure).

**Objective:** To verify the effect of two different periods of preventive treatment with resveratrol on blood pressure and endothelial function in ovariectomized young adult rats.

**Methods:** 3-month old female Wistar rats were used and distributed in 6 groups: intact groups with 60 or 90 days, ovariectomized groups with 60 or 90 days, and ovariectomized treated with resveratrol (10 mg/kg of body weight per day) for 60 or 90 days. The number of days in each group corresponds to the duration of the experimental period. Vascular reactivity study was performed in abdominal aortic rings, systolic blood pressure was measured and serum nitric oxide (NO) concentration was quantified.

**Results:** Ovariectomy induced blood pressure increase 60 and 90 days after surgery, whereas the endothelial function decreased only 90 days after surgery, with no difference in NO concentration between the groups. Only longer treatment (90 days) with resveratrol was able to improve the endothelial function and normalize blood pressure.

**Conclusion:** Our results suggest that 90 days of treatment with resveratrol is able to improve the endothelial function and decrease blood pressure in ovariectomized rats. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(2):116-121)

**Keywords:** Blood Pressure; Rats, Wistar; Resveratrol; Phytoestrogens; Ovariectomy; Endothelium, Vascular.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Victor Fabricio •

Rodovia Washington Luís, Km 235. CEP 13565-905, Jardim Guanabara, São Carlos, SP – Brasil

E-mail: vicfabricio@gmail.com, malaksoad@gmail.com

Artigo recebido em 01/07/16, revisado em 19/10/16, aceito em 21/11/16

DOI: 10.5935/abc.20170012

## Introdução

O endotélio é uma monocamada de tecido localizada no interior dos vasos sanguíneos e pode ter funções endócrinas e parácrinas, regulando a função vascular através da liberação de fatores tróficos e vasoativos que controlam o tônus vascular e até mesmo a inflamação da parede vascular.<sup>1</sup> A disfunção endotelial caracteriza-se principalmente pela diminuição, direta ou indireta, da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO).<sup>2</sup>

A liberação de NO pelo endotélio é modulada por vários fatores, incluindo o estrogênio. Este hormônio é capaz de aumentar a biodisponibilidade e a produção de NO através de fatores genômicos e não genômicos, entre os quais podemos mencionar a ação sobre o receptor  $\alpha$  estrogênico (ER $\alpha$ ) e a redução do estresse oxidativo.<sup>3,4</sup> Assim, a redução deste hormônio, que é observada após a menopausa, pode levar à disfunção endotelial, com consequente aumento da pressão arterial.

A fim de reduzir alguns efeitos negativos da deficiência estrogênica, geralmente se indica a terapia de reposição hormonal (TRH). No entanto, estudos indicam que este tratamento pode estar associado a eventos cardiovasculares adversos, aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama e trombose venosa profunda em mulheres com predisposição para estas doenças.<sup>3,5,6</sup>

Numa tentativa de encontrar alternativas à TRH com menos efeitos colaterais, o resveratrol (3,4,5'-trihidroxiestilbeno) tem mostrado efeito promissor devido à sua semelhança com o dietilestilbestrol (um estrogênio sintético), podendo ser considerado um fitoestrogênio. Além disso, o resveratrol pode exercer sua ação sobre os receptores de estrogênio, podendo ser considerado um modulador seletivo do receptor de estrogênio (MSRE).<sup>7-9</sup>

Apesar de se saber que há relatos na literatura tanto dos fitoestrogênios quanto dos MSRE como melhoradores agudos do relaxamento/vasodilatação endotélio-dependente<sup>4</sup> e que há estudos mostrando o efeito do resveratrol sobre a pressão arterial e os vasos sanguíneos,<sup>10,11</sup> não há muitos relatos de seu efeito direto sobre a função endotelial e a pressão arterial em animais com deficiência isolada de estrogênios. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito de dois diferentes protocolos de tratamento preventivo com resveratrol sobre a pressão arterial e a função endotelial em ratas jovens ovariectomizadas.

## Métodos

### Animais e tratamentos

O protocolo experimental foi realizado de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro para Experimentos em Animais (COBEA), tendo sido aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (2-043/2013).

Sessenta ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) (90 dias de vida no início do experimento) foram abrigadas sob ciclos claro-escuro (14h/10h das 18:00 às 8:00 horas) e temperatura (22  $\pm$  2 °C) controlados, recebendo dieta padrão à vontade durante 60 ou 90 dias.

Os animais foram randomicamente distribuídos em seis grupos experimentais: intactas – 60 dias (INT 60); ovariectomizadas – 60 dias (OVX 60); ovariectomizadas + resveratrol – 60 dias (OVX + RES 60); intactas – 90 dias (INT 90); ovariectomizadas – 90 dias (OVX 90); e ovariectomizadas + resveratrol – 90 dias (OVX + RES 90), sendo que o número de dias em cada grupo representou a duração do período experimental. Os animais dos grupos intactas não receberam nenhuma intervenção; as ratas dos grupos ovariectomizadas foram ovariectomizadas e tratadas com soro fisiológico a 0,9% (0,1 mL/100 g de peso corporal por dia) por gavagem até o fim do período experimental; e as dos grupos ovariectomizadas + resveratrol foram ovariectomizadas e tratadas diariamente com uma solução de resveratrol a 10mg/kg de peso corporal por dia (solubilizado em etanol e diluído em água destilada, com a concentração final de etanol a 5%), igualmente por gavagem, durante 60 ou 90 dias. Ao final do período experimental, as ratas foram anestesiadas com isoflurano e submetidas a eutanásia por decapitação, sendo coletados sangue e a aorta para análise.

### Pressão arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida por pletismografia de cauda com manguito (modelo Power Lab 8/35, AD Instruments, Pty Ltd, Colorado Springs, CO) com os animais não anestesiados, conforme descrito anteriormente por Rodrigues et al.,<sup>12</sup> dois dias antes de os animais serem mortos por decapitação ao final de cada período experimental. A média de quatro medidas sucessivas foi considerada como a média da pressão arterial sistólica de cada animal.

### Estudos da reatividade vascular

As aortas torácicas foram isoladas, sendo removido o tecido conjuntivo nelas aderido, e colocadas em solução de Krebs, como descrito anteriormente.<sup>13</sup> As aortas foram cuidadosamente dissecadas e montadas em anéis ( $\cong$  4 mm de extensão), sendo colocadas em câmaras de banho (5 mL) contendo solução de Krebs à 37 °C (NaCl 130mM, KCl 47 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, CaCl 1,6; MgSO<sub>4</sub> 1,2mM; NaHCO<sub>3</sub> 14,9 mM; glicose 5,5 mM) continuamente borbulhada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, pH 7,4, em miógrafo isométrico Mulvany-Halpern (modelo 610 DMT-USA, Marietta, GA), com registro através de um sistema de aquisição de dados PowerLab8/SP (AD Instruments Pty Ltd., Colorado Springs, Colorado). Os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de 1,5g, que foi reajustada a cada 15 minutos durante um período de equilíbrio de 60 minutos antes de ser adicionada a droga especificada. Os experimentos foram realizados em anéis aórticos com endotélio intacto e também em anéis aórticos desprovidos de endotélio. A integridade endotelial foi avaliada através do grau de relaxamento induzido por acetilcolina (Acl) a 1  $\mu$ mol/L na presença de tônus ccontrátil induzido por fenilefrina (0.1  $\mu$ M). Considerava-se que o anel possuía endotélio intacto se o relaxamento com acetilcolina fosse maior que 80%. Em aortas desprovidas de endotélio, o relaxamento com Acl foi menor que 5%. Após o teste de integridade endotelial, os anéis aórticos foram pré-contraídos

com fenilefrina (0,1µM). Após o platô de contração ser atingido, curvas concentração-efeito foram construídas para acetilcolina (0,1nM a 0,1mM) em anéis aórticos com endotélio intacto, ou para o nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis aórticos sem endotélio. A potência (pD2) e o efeito relaxante máximo (EM) foram mensurados

### Nitrito e Nitrato Séricos (NO<sub>x</sub>)

Foram obtidos os níveis de óxido nítrico sérico através da medida das concentrações séricas de seus produtos finais estáveis nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), coletivamente conhecidos como NO<sub>x</sub>. O método de quimioluminescência de NO/ozônio foi realizado através do aparelho *NO Analyzer 280i* (Sievers, Boulder, CO, EUA). A concentração de NO<sub>x</sub> foi corrigida pelo fator obtido pelo quociente entre o NO<sub>x</sub> medido e as concentrações esperadas de nitrito de sódio (5, 10, 25, 50 e 100 µM), que fornecessem uma curva padrão.<sup>14</sup>

### Análise estatística

Foi verificada a distribuição normal das variáveis estudadas (todas quantitativas e contínuas) através do teste de Kolmogorov-Smirnof.

As diferenças das médias entre os grupos em cada período experimental foram comparadas através da análise de variância de uma via (ANOVA). Quando havia significância, foi usada a análise de Newman-Keul post hoc, sendo o nível de significância estatística estabelecido a p<0,05 (Software Statistica 7.0, StatSoft. Inc, Tulsa, EUA).

### Drogas e substâncias químicas

A acetilcolina, fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram adquiridas de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). O resveratrol foi adquirido de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA).

## Resultados

Na Tabela 1, pode-se observar que 60 dias de ovariectomia não alteraram o relaxamento vascular endotélio dependente e independente dos anéis aórticos, sendo que a suplementação com resveratrol não teve nenhum efeito no grupo OVX. O efeito relaxante máximo (EM) não se alterou nos anéis aórticos com ou sem endotélio para todos os grupos. Além disso, 90 dias após a ovariectomia, observou-se uma queda na potência de relaxamento à acetilcolina (pD2 OVX 90: 6,99 ± 0,10) em comparação com os animais intactos (pD2 INT 90: 7,51 ± 0,07, p<0,05). A suplementação com resveratrol por 90 dias foi capaz de aumentar o pD2 (pD2: OVX+RES: 7,50 ± 0,15, p <0,05) trazendo-o ao nível dos do grupo de intactas, normalizando a função endotelial. Em anéis aórticos desprovidos de endotélio, não foram observadas mudanças no efeito de relaxamento independente de endotélio em valores de pD2 para todos os grupos. Não houve mudança no EM 90 dias após a ovariectomia ou suplementação com resveratrol no relaxamento endotélio dependente ou independente induzido por acetilcolina ou nitroprussiato de sódio, respectivamente.

Na tabela 2, podemos observar que a ovariectomia induziu a um aumento na pressão arterial sistólica (PAS) 60 e 90 dias após a cirurgia. O tratamento com resveratrol por 60 dias não preveniu o aumento na pressão arterial. No entanto, o tratamento com resveratrol por 90 dias preveniu esse aumento, e normalizou a pressão arterial. Ainda, não foram observadas diferenças na concentração de NO sérica (Figuras 1 e 2) em ambos os períodos de tratamento (60 e 90 dias).

## Discussão

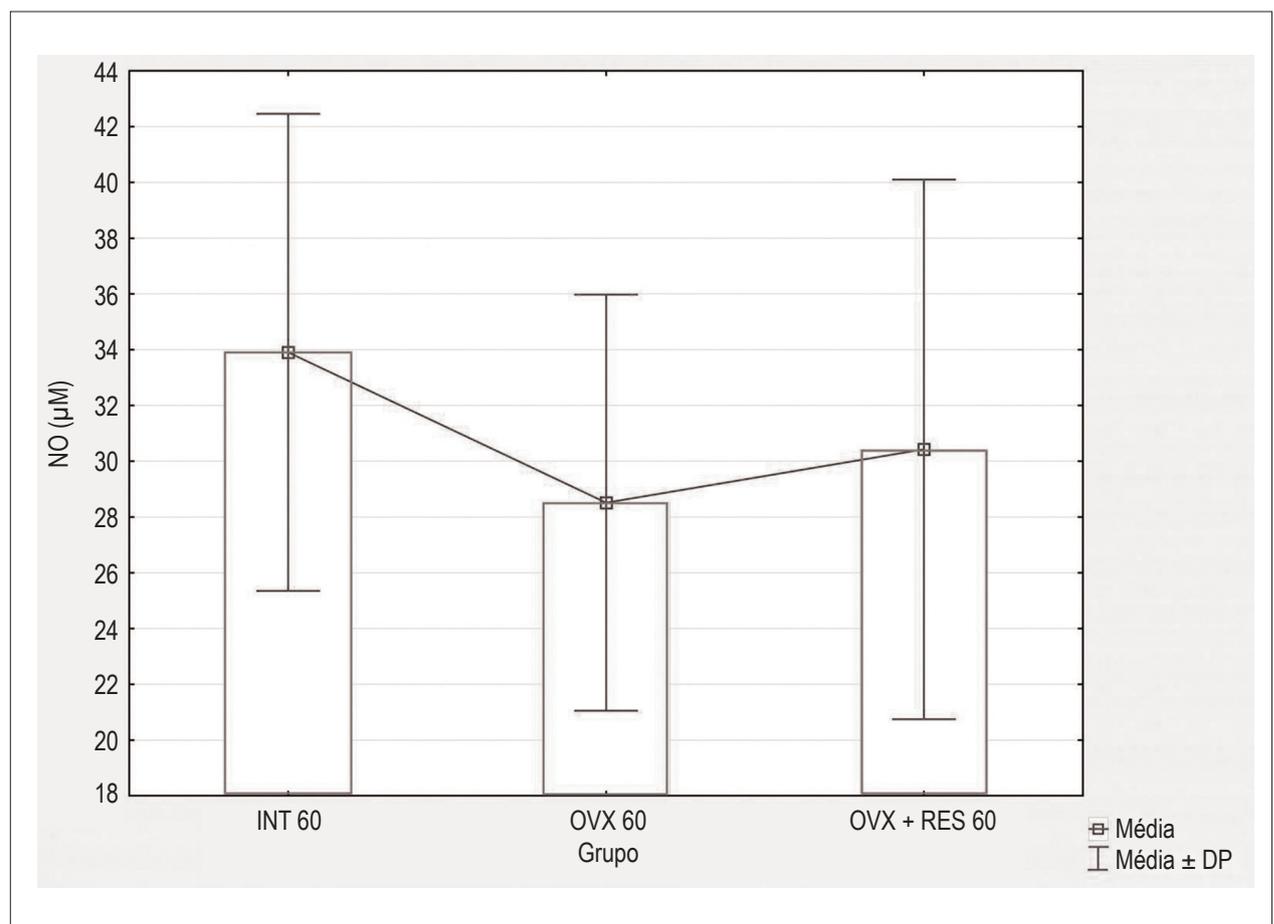
O principal achado deste estudo foi que o tratamento com resveratrol durante 90 dias preveniu alterações na pressão arterial e na função endotelial induzidas por deficiência estrogênica. Neste período experimental, verificamos que a

**Tabela 1 – Valores de potência (pD2) e efeito relaxante máximo (EM) para relaxamento induzido por acetilcolina e nitroprussiato de sódio em anéis aórticos com (E+) ou sem (E-) endotélio dos grupos intacta (INT), ovariectomizada (OVX) e ovariectomizada + resveratrol (OVX + RES) nos dois períodos experimentais. Os valores são expressos como média ± DP. As comparações foram feitas através de ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls post-hoc. \*p<0,05 comparado com o grupo INT 60; +p<0,05 comparado com o grupo INT 90; # p< 0,05 comparado com o grupo OVX 90**

Relaxamento induzido por acetilcolina (E+) e nitroprussiato de sódio (E-)			
60 DIAS	INT 60	OVX 60	OVX+ RES 60
pD2 E+	7,69 ± 0,15	7,43 ± 0,18	7,63 ± 0,16
EM E+	94,28 ± 4,80	84,66 ± 4,93	89,00 ± 4,43
pD2 E-	8,55 ± 0,09	8,51 ± 0,11	8,56 ± 0,09
EM E-	105,40 ± 2,12	103,30 ± 2,17	105,50 ± 2,71
90 DIAS	INT 90	OVX 90	OVX+ RES 90
pD2 E+	7,51 ± 0,07	7,00 ± 0,10*	7,50 ± 0,15#
EM E+	86,18 ± 4,32	85,50 ± 2,45	81,67 ± 3,61
pD2 E-	8,45 ± 0,02	8,45 ± 0,02	8,43 ± 0,01
EM E-	105,70 ± 2,62	105,20 ± 1,76	102,20 ± 4,21

**Tabela 2 –** Pressão arterial sistólica (PAS) e concentração sérica de óxido nítrico (NO) nos grupos intacta (INT), ovariectomizada (OVX) e ovariectomizada + resveratrol (OVX + RES) nos dois períodos experimentais. Os valores são expressos como média  $\pm$ DP. As comparações foram feitas por ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls post-hoc.  $p < 0,05$  comparado com o grupo INT 60;  $+p < 0,05$  comparado com o grupo INT 90; #  $p < 0,05$  comparado com o grupo OVX 90

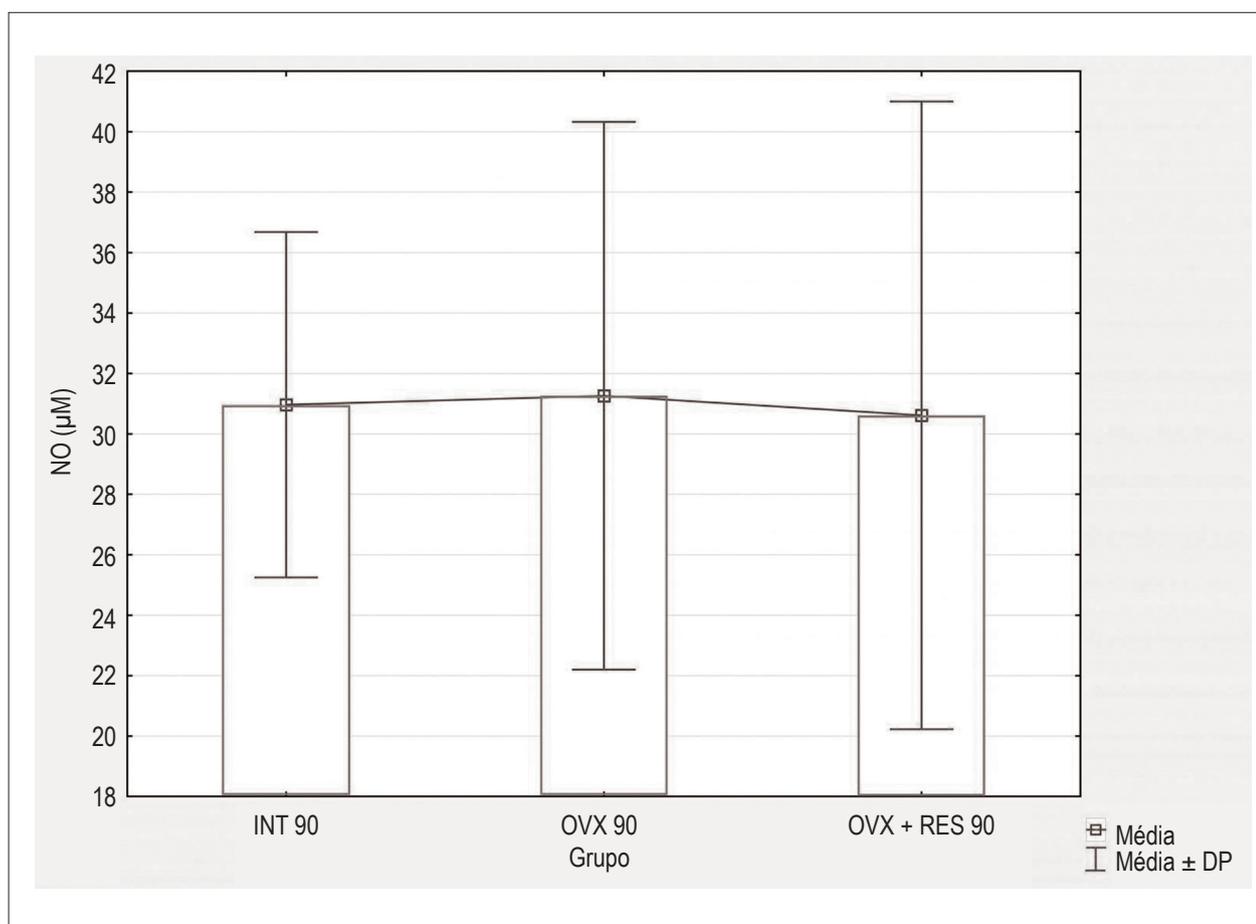
60 DIAS	INT 60	OVX 60	OVX+ RES 60
PAS (mmHg)	120,39 $\pm$ 4,58	138,16 $\pm$ 5,42*	135,18 $\pm$ 5,42*
NO ( $\mu$ M)	33,91 $\pm$ 8,55	28,51 $\pm$ 7,47	30,42 $\pm$ 9,68
90 DIAS	INT 90	OVX 90	OVX+ RES 90
PAS (mmHg)	123,92 $\pm$ 4,98	145,21 $\pm$ 9,79 <sup>#</sup>	123,33 $\pm$ 3,66 <sup>#</sup>
NO ( $\mu$ M)	30,96 $\pm$ 5,17	31,26 $\pm$ 9,06	30,61 $\pm$ 10,38



**Figura 1 –** Concentração de óxido nítrico sérico em  $\mu$ M nos grupos intacta - 60 dias (INT 60), ovariectomizada - 60 dias (OVX 60) e ovariectomizada + resveratrol - 60 dias (OVX + RES 60). Os valores são apresentados como média  $\pm$ DP. As comparações foram feitas com ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls post-hoc. Não foram observadas diferenças entre os grupos.

ovariectomia foi eficaz em induzir disfunção endotelial e aumento de pressão arterial. A deficiência estrogênica por 60 dias não foi suficiente para induzir mudanças na função endotelial em anéis aórticos de ratos; no entanto, este período foi capaz de aumentar o valor de pressão arterial, sendo que o tratamento com resveratrol não modificou a função endotelial nem a pressão arterial.

O aumento na pressão arterial decorrente de ovariectomia e subsequente redução da pressão no grupo tratado com resveratrol no protocolo experimental de 90 dias já havia sido anteriormente observado por Patki et al,<sup>15</sup> que trataram ratas Wistar ovariectomizadas com pó de uva congelada (no qual um dos componentes é o resveratrol). Ainda assim, os autores sugerem que o efeito da ovariectomia



**Figura 2** – Concentração de óxido nítrico sérico em  $\mu\text{M}$  nos grupos intacta - 90 dias (INT 90), ovariectomizada - 90 dias (OVX 90) e ovariectomizada + resveratrol - 90 dias (OVX + RES 90). Os valores são expressos como média $\pm$ DP. As comparações foram feitas através de ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls post-hoc. Não foram observadas diferenças entre os grupos.

na pressão arterial seja induzido pelo aumento do estresse oxidativo desencadeado pelo déficit de estrógeno e que o efeito do pó de uva congelada possa estar relacionado a seu grande efeito antioxidante,<sup>15</sup> característica que também foi verificada com o resveratrol.<sup>16</sup>

A diminuição do relaxamento dependente do endotélio em anéis aórticos e seu consequente aumento com o tratamento com resveratrol no protocolo experimental de 90 dias também foi encontrado por Mizutani et al.<sup>10</sup> em ratas ovariectomizadas espontaneamente hipertensas com predisposição a AVC, dieteticamente suplementadas com resveratrol (5mg/kg de peso corporal). Entretanto, esses autores indicam que o efeito da substância sobre o endotélio se dá através da biodisponibilidade aumentada de NO, como relatado por outros estudos,<sup>17,18</sup> o que não foi confirmado em nosso estudo.

Um resultado interessante foi que apenas o tratamento prolongado com resveratrol (90 dias) foi capaz de melhorar a função endotelial e normalizar a pressão arterial. Sessenta dias após a cirurgia, não se verificou disfunção endotelial, nem foi induzida nenhuma melhora com o resveratrol. Assim, nossos resultados sugerem que a melhora na função endotelial induzida pelo resveratrol normaliza a

pressão arterial em ratas OVX através de um mecanismo independente de NO.

Vanhoute et al.<sup>4</sup> mostram que além do NO há outros fatores endoteliais que podem induzir vasodilatação, incluindo o fator hiperpolarizante derivado de endotélio. Além disso, Dolinsky et al.<sup>11</sup> sugeriram que o efeito do resveratrol sobre a pressão arterial pode ser diferente de acordo com o modelo experimental usado, e essas diferenças poderiam ser decorrentes dos mecanismos distintos de hipertensão em desenvolvimento. Considerando-se que há uma escassez de estudos avaliando o efeito da deficiência de estrógeno sobre a pressão arterial e a função endotelial em modelos animais jovens/adultos, os resultados deste estudo apresentam uma importante contribuição sobre o resveratrol como tratamento preventivo de efeitos cardiovasculares pós-menopausa.

## Conclusão

Nossos resultados sugerem que o tratamento com resveratrol por 90 dias (10 mg/kg de peso corporal por dia) é capaz de normalizar a função endotelial e a pressão

arterial de ratas ovariectomizadas através de um mecanismo independente de NO.

### Limitações

Não houve orçamento suficiente para realizar outras análises que pudessem consolidar melhor as causas de comprometimento e/ou melhora na pressão arterial sistólica e na reatividade vascular, como a quantificação de NO e de marcadores de estresse oxidativo nos vasos sanguíneos.

### Agradecimentos

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Evelin Capellari Carnio e Marcelo Eduardo Batalhão (Especialista em Laboratório) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (USP) pela realização das análises de Óxido Nítrico.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Fabricio V, Nonaka KO, Rodrigues GJ; Obtenção de dados: Fabricio V, Oishi JC,

Biffe BG, Ruffoni LDG, Silva KA; Análise e interpretação dos dados: Fabricio V, Oishi JC, Nonaka KO, Rodrigues GJ; Análise estatística: Fabricio V, Oishi JC; Obtenção de financiamento: Nonaka KO, Rodrigues GJ; Redação do manuscrito: Fabricio V, Oishi JC, Nonaka KO, Rodrigues GJ; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Oishi JC, Biffe BG, Ruffoni LDG, Silva KA, Nonaka KO, Rodrigues GJ.

### Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela CAPES e parcialmente pela FAPESP (2012/24477-8).

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Victor Fabricio pela Universidade Federal de São Carlos.

### Referências

1. Belin de Chantemele EJ, Stepp DW. Influence of obesity and metabolic dysfunction on the endothelial control in the coronary circulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(4):840-7.
2. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir Bras.* 2002;17(6):417-23.
3. Usselman CW, Stachenfeld NS, Bender JR. The molecular actions of estrogen in the regulation of vascular health. *Exp Physiol.* 2016;101(3):356-61.
4. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(1):22-96.
5. Macedo JM, Macedo CR, Elkis H, De Oliveira IR. Meta-analysis about efficacy of anti-resorptive drugs in post-menopausal osteoporosis. *J Clin Pharm Ther.* 1998;23(5):345-52.
6. Ghazal S, Pal L. Perspective on hormone therapy 10 years after the WHI. *Maturitas.* 2013;76(3):208-12.
7. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):14138-43.
8. Bhat KP, Kosmeder JW 2<sup>nd</sup>, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3(6):1041-64.
9. Su JL, Yang CY, Zhao M, Kuo ML, Yen ML. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. *J Biol Chem.* 2007;282(27):19385-98.
10. Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2000;46(2):78-83.
11. Dolinsky VW, Chakrabarti S, Pereira TJ, Oka T, Levasseur J, Beker D, et al. Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(10):1723-33.
12. Rodrigues GJ, Pereira AC, Vercesi JA, Lima RG, Silva RS, Bendhack LM. Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012;60(2):193-8.
13. Oishi JC, Buzinari TC, Pestana CR, De Moraes TF, Vatanabe IP, Wink DA Jr, et al. In vitro treatment with cis-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(5):696-704.
14. Pereira FH, Batalhão ME, Cárnio EC. Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2014;22(1):123-8.
15. Patki G, Allam FH, Atrooz F, Dao AT, Solanki N, Chugh G, et al. Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female Wistar rats. *PLoS One.* 2013;8(9):e74522.
16. Frombaum M, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and \*NO bioavailability: potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie.* 2012;94(2):269-76.
17. Breen DM, Dolinsky VW, Zhang H, Ghanim H, Guo J, Mroziwicz M, et al. Resveratrol inhibits neointimal formation after arterial injury through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 2012;222(2):375-81.
18. Yamagata K, Tagami M, Yamori Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. *Nutrition.* 2015;31(1):28-37.