

**YANNA DANTAS RATTMANN**

**MECANISMOS ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS VASCULARES  
DA *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como pré-requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Co-orientadores: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

Profª Drª Valérie B. Schini-Kerth

**CURITIBA**

**2009**

*Aos meus amores, Carlos e Valkyria, por tomarem  
como seus todos os meus propósitos.*

## *Agradecimentos*

*Obrigada, Deus, pelo amor, pela minha família, pelas oportunidades, desafios e fé, os quais me conduziram a esta conquista.*

*Ao Professor Adair Roberto Soares dos Santos, por me conceder a oportunidade de ser sua orientada e poder compartilhar dos seus ensinamentos, espiritualidade, e otimismo inabalável. Agradeço ainda por haver sempre me incentivado a progredir e a acreditar em mim mesma.*

*Ao Professor José Eduardo da Silva Santos, pelos muitos ensinamentos, pela fonte incessante de boas idéias, pelo exemplo de perseverança, pelo companheirismo e apoio constantes, especialmente nos momentos acadêmicos mais decisivos.*

*À Professora Maria Consuelo Andrade Marques, pelas orientações, pela acolhida em seu laboratório durante todos esses anos, pelas oportunidades, pelos muitos ensinamentos, pelo dinamismo contagiante e pelo exemplo de garra e determinação, que levarei sempre comigo.*

*Au Professeur Valérie B. Schini-Kerth, je vous remercie très chaleureusement pour la plus grande expérience professionnelle de ma vie. Dans votre labo, j'ai pu constater votre immense passion pour la pharmacologie cardiovasculaire. Que vous trouvez ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon respect.*

*À Professora Virgínia Soares Lemos, por ter me iniciado na pesquisa e, assim, ter me dado a oportunidade de encontrar o caminho profissional que me realizaria. Agradeço imensamente pelos conhecimentos, pelo incentivo constante e pelo apoio que continua a me dar sempre que a oportunidade surge.*

*A Martine Schmitt, mami Thérèse, Ane Marie, Simone et les enfants, je vous remercie pour toute l'aide, pour l'attention et l'accueil que vous m'avez dispensé à Strasbourg et à Weyersheim. Avec vous, je me suis senti dans ma famille. Que Dieu vous bénisse!*

*A todos os professores de Farmacologia da UFPR, pelos conhecimentos transmitidos, esforço e exemplos de competência. Agradeço especialmente aos professores Aleksander Zampronio, Roberto Andreatini, Lia Rieck, Maria Vital e Paulo Dalsenter por se disporem em momentos importantes da minha formação.*

*Aos professores Jamil Assreuy, Giles A. Rae e Clair Lugnier, minha gratidão e profunda admiração.*

*Às minhas mães Maria do Carmo (“mainha”), tia Neves, vó Antônia, e aos meus pais Luiz, vô Gaudêncio (in memorian) e tio Gilberto, pelo amor, por todo esforço, por terem me encorajado e dado suporte material ou espiritual ao longo dos meus estudos.*

*Ao meu sogro Ayrton e à minha sogra Rosy (in memorian) pela compreensão e incessante apoio.*

*Ao meu irmão Khalil, à querida tia Salô e tia Maria Amélia (in memorian) pela amizade, companheirismo e apoio à minha família durante a minha longa ausência.*

*À equipe do laboratório da “Tia Consu” e frequentadores assíduos pelo companheirismo, atenção e amizade, especialmente a Eliana, Kelly, Elisângela, Sandra, Dani, Fernanda, Arquimedes, Rita, Cândida, Priscila, Rene, Irinéia, Emerson, Maritana, Ana Helena e Thales.*

*A tous les gens du laboratoire “Schini-team” à l’Université Louis Pasteur de Strasbourg-France, pour l’accueil, pour l’aide, pour l’attention et pour partager les vins et plusieurs moments de bonne humeur. Je remercie particulièrement Thierry, Eric, Jong, Cyril, Stéphanie, Alyson, Nouridine, Sharif et Mayada.*

*Aos colegas Katia Paludo, Carolina Sanchez, Ana Flávia, Mauro Schneider e aos professores Sílvia Cadena, Obdulio Miguel e Carlos Mello pela amizade e parceria.*

*Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR e do biotério por todo suporte necessário à execução deste trabalho. Agradeço especialmente à Sílvia (companheira de conversas e orações), ao Eirich (amigo High tech), Alessandra (suicida de cantina), Linda, Seu Jorge, Nair, Luiz e Cândido.*

*Aos animais, minha gratidão e respeito.*

*À CAPES pelo suporte financeiro.*

*“Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não te atemorizes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andares.”*

*(Josué 1:9)*

## SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de figuras.....	xi
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
<b>I INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos fisiológicos e patológicos do endotélio vascular.....	4
1.1.1 Estrutura do vaso sanguíneo.....	4
1.1.2 Funções do endotélio vascular.....	7
1.1.2.1 Envolvimento do endotélio na regulação da coagulação e da fibrinólise.....	8
1.1.2.2 Papel do endotélio vascular na angiogênese.....	9
1.1.2.3 Fatores envolvidos na regulação do tônus vascular.....	10
1.1.2.3.1. Fatores vasoconstritores.....	10
1.1.2.3.2. Fatores vasodilatadores.....	12
1.2.3. A via do NO.....	16
1.2.3.1 Breve Histórico.....	16
1.2.3.2 Sintases do NO:.....	18
1.2.3.3 Regulação da eNOS .....	21
1.2.3.3.1 Ca <sup>2+</sup> e atividade da eNOS.....	23
1.2.3.3.2 Fosforilação da eNOS.....	26
1.2.3.4 Papel fisiológico do NO de origem endotelial.....	28
1.2.3.5 Via de sinalização envolvida no efeito vasodilatador do NO.....	29
1.2.4 Disfunção endotelial.....	31
1.2.4.1 Considerações gerais.....	31
1.2.4.2. Participação das espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS) na disfunção endotelial.....	33
1.2.5. Opções farmacológicas para o aumento da biodisponibilidade do NO.....	36
1.2.6. Importância dos compostos polifenólicos.....	37
1.2.7. <i>Dicksonia sellowiana</i> (Presl.) Hook.....	39

<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
2.1	Objetivo geral.....	42
2.2	Objetivos específicos.....	42
<b>III</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
3.1	Material Botânico.....	44
3.2	Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Dicksonia sellowiana</i> .....	44
3.3	Protocolos experimentais.....	47
3.4	Efeitos da <i>Dicksonia sellowiana</i> em vaso de condutância: experimentos em aorta isolada de rato e confirmação do efeito <i>in vivo</i> .....	47
3.4.1	Drogas.....	47
3.4.2	Animais.....	48
3.4.3	Procedimento para isolamento da aorta torácica de rato.....	48
3.4.4	Avaliação dos efeitos vasculares do EHDS e investigação dos mecanismos envolvidos.....	49
3.4.5	Avaliação dos efeitos do EHDS na pressão sanguínea de ratos anestesiados.....	51
3.4.6	Equipamentos de registro.....	52
3.5	Efeitos antioxidantes da <i>Dicksonia sellowiana in vitro e in vivo</i> .....	52
3.5.1	Drogas e reagentes.....	52
3.5.2	Animais.....	53
3.5.3	Cultura celular.....	53
3.5.4	Protocolos experimentais <i>in vitro</i> .....	54
3.5.4.1	Avaliação da capacidade seqüestradora do radical DPPH pelo EHDS.....	54
3.5.4.2	Determinação da capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pelo EHDS.....	54
3.5.4.3	Avaliação da capacidade seqüestradora do radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) pelo EHDS.....	55
3.5.4.4	Avaliação da capacidade seqüestradora do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pelo EHDS.....	56
3.5.4.5	Efeito do EHDS nas células endoteliais expostas ao $H_2O_2$ .....	56
3.5.5	Protocolos experimentais <i>in vivo</i> .....	58

3.5.5.1	Determinação da atividade da catalase.....	58
3.5.5.2	Ensaio de peroxidação lipídica – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	58
3.6	Efeitos da <i>Dicksonia sellowiana</i> em artéria coronária de porco (vaso de resistência) e em cultura de células endoteliais.....	59
3.6.1	Reagentes.....	59
3.6.2	Preparação dos anéis de artéria coronária de porco.....	60
3.6.3	Estudos de reatividade vascular.....	61
3.6.4	Determinação da formação vascular de ROS em presença do EHDS.....	62
3.6.5	Determinação da fosforilação da eNOS por imunohistoquímica.....	63
3.6.6	Cultura primária de células endoteliais de coronária de porco.....	63
3.6.7	Análise por Western Blot.....	64
3.7	Análise estatística (aplicada nos três estudos) .....	65
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	66
4.1	Efeitos da <i>Dicksonia sellowiana</i> em vaso de condutância: experimentos em aorta isolada de rato e confirmação <i>in vivo</i> .....	66
4.1.1	Participação da via NO/GMPc no efeito vasorrelaxante do EHDS em aorta de rato.....	66
4.1.2	Envolvimento da via PGI <sub>2</sub> /AMPc no efeito vasorrelaxante do EHDS em aorta de rato.....	67
4.1.3	Participação dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante do EHDS em aorta de rato.....	68
4.1.4	Envolvimento dos receptores muscarínicos endoteliais no efeito vasodilatador induzido pelo EHDS.....	70
4.1.5	Efeito hipotensor do EDHS em ratos anestesiados.....	71
4.1.6	Efeito vasorrelaxante das frações obtidas a partir do EHDS.....	72
4.2	Efeitos antioxidantes da <i>Dicksonia sellowiana</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	73
4.2.1	Atividade antioxidante do EHDS contra os radicais DPPH, O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> , ·OH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	73
4.2.2	Efeito protetor do EHDS nas células endoteliais contra a ação oxidante do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	75
4.2.3	Efeitos <i>in vivo</i> do EHDS na atividade da catalase e na peroxidação lipídica.....	78

4.3	Efeitos da <i>Dicksonia sellowiana</i> em artéria coronária de porco (vaso de resistência) e em cultura de células endoteliais.....	80
4.3.1	Efeito vasorrelaxante do EHDS em artéria coronária de porco.....	80
4.3.2	Participação da calmodulina, mas não da quinase II dependente de calmodulina (CaMKII), no efeito vasorrelaxante dependente do NO induzido pelo EHDS.....	82
4.3.3	Participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e da via Src quinase e PI3K/Akt no relaxamento induzido pelo EHDS.....	83
4.3.4	Efeito do EHDS sobre as resposta contráteis induzidas pelo U46619 em artérias coronárias de porco.....	85
4.3.5	Efeito do EHDS na formação de ROS em secções de artéria coronária de porco.....	87
4.3.6	Efeito do EHDS na fosforilação na Ser 1177 da eNOS em secções de artéria coronária de porco. ....	89
4.3.7	Efeito do EHDS na ativação redox-sensível da Src e subseqüente fosforilação da eNOS dependente da via PI3-kinase/Akt.....	90
4.3.7.1	Efeito dependente da concentração do EHDS na fosforilação da Akt e da eNOS em células endoteliais de artéria coronária de porco.....	91
4.3.7.2	Efeito do tempo de incubação do EHDS sobre a fosforilação da Akt e da eNOS em células endoteliais de artéria coronária de porco.....	93
4.3.7.3	Efeito dos inibidores de calmodulina e CaMKII nos níveis de fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidos pelo EHDS.....	95
4.3.7.4	Participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) na fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidas pelo EHDS em cultura de células endoteliais.....	97
4.3.7.5	Efeito do EHDS na ativação da via Src, PI3K/Akt em células endoteliais de artéria coronária de porco.....	99
4.3.7.6	Duração da fosforilação da Akt e da eNOS após a remoção do EHDS da cultura de células endoteliais de artéria coronária de porco.....	101
4.3.8	Efeito vasorrelaxante dos compostos fenólicos do EHDS em artéria coronária de porco.....	103

<b>V</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>123</b>
<b>VII</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>125</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> As dez principais causas de óbito no Brasil no ano de 2005.....	2
<b>Tabela 2:</b> Previsão de causas de mortalidade em 2020 em comparação com 1999 em nível mundial.....	3
<b>Tabela 3:</b> Compostos identificados por HPLC-DAD no EHDS, seus tempos de retenção e porcentagens estimadas no extrato.....	47
<b>Tabela 4:</b> Efeito vasorrelaxante das frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Dicksonia sellowiana</i> (EHDS) em anéis de aorta de rato.....	73

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACh	- acetilcolina
ADP	- difosfato de adenosina
Akt	- proteína serina treonina quinase, conhecida como proteína quinase B
AMPC	- monofosfato cíclico de adenina
ANOVA	- análise de variância
ATP	- trifosfato de adenosina
AVC	- acidente vascular cerebral
bFGF	- fator de crescimento fibroblástico básico
BK	- bradicinina
BK <sub>Ca</sub>	- canal de K <sup>+</sup> de condutância elevada ativado pelo Ca <sup>+2</sup>
Ca <sup>2+</sup>	- ions cálcio
Ca <sup>2+</sup> /CaM	- complexo cálcio/calmodulina
CALMID	- calmidazólio
CaMKII	- proteína quinase II dependente da calmodulina
CAT	- enzima catalase
Cav-1	- caveolina 1
CE <sub>50</sub>	- concentração efetiva 50%
CI <sub>50</sub>	- concentração inibitória 50%
DAG	- diacilglicerol
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenilindol
DCFH-DA	- 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato
DHE	- diidroetidina
DMSO	- dimetil sulfóxido
DPPH	- 2,2-Difenil-2-picril hidrazil
E.P.M.	- erro padrão da média
ECA	- enzima conversora de angiotensina
EDHF	- fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	- fator relaxante derivado do endotélio
EHDS	- extrato hidroalcoólico padronizado das folhas de <i>Dicksonia sellowiana</i>
E <sub>MAX</sub>	- efeito máximo
ET	- endotelina

FAD	- dinucleotídeo de flavina e adenina
FEN	- fenilefrina
FMN	- mononucleotídeo de flavina
GCs	- guanilil ciclase solúvel
GLB	- glibenclamida
GMP <sub>c</sub>	- monofosfato cíclico de guanosina
GTP	- trifosfato de guanosina
H <sub>1</sub>	- receptor da histamina – subtipo 1
HEPES	- N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano-ácido sulfônico
HIST	- histamina
HOCl	- ácido hipocloroso
HPLC	- cromatografia líquida de alta performance
IK <sub>Ca</sub>	- canal de K <sup>+</sup> de condutância intermediária ativado pelo Ca <sup>+2</sup>
iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
IP <sub>3</sub>	- inositol 1, 4, 5, trifosfato
K <sup>+</sup>	- ions potássio
K <sub>Ca</sub>	- canais de K <sup>+</sup> ativados pelo Ca <sup>2+</sup>
KN-93	-2-[N-(2-Hidroxietil)]-N-(4-metoxibenzenesulfonil)]amino-N-(4-clorocinamil)-N-metilbenzilamina
KT 5720	- 9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-hidroxi-9-metil -1 -oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pirrolo[3,4-i][1,6] benzodiazocina - 10- ácido carboxílico hexil éster
L-NA	- N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina
L-NAME	- N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	- N <sup>ω</sup> -monometil-L-arginina
M <sub>3</sub>	- receptor muscarínico do tipo M <sub>3</sub>
MCP-1	- proteína quimioatraente de monócitos-1
MDA	- malonaldeído
MeOH	- metanol
MLC	- cadeia leve da miosina
MLCK	- quinase da cadeia leve de miosina
MMA	- Ministério do Meio Ambiente
MnTMPyP	- Mn(III)tetraquis(1-metil-4-piridil)porfirina)

N <sub>2</sub> O	- dióxido de nitrogênio
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	- ortovanadato de sódio
NAC	- N-acetil-L-cisteína
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NBT	- cloreto de nitroazul de tetrazólio
nNOS	- óxido nítrico sintase neuronal
NO	- óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	- nitrato
NOS	- óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub>	- oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- ânion superóxido
ODQ	- 1H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a]quinoxalin-1-ona
OH•	- radical hidroxila
ONOO-	- peroxinitrito
PAF	- fator ativador de plaquetas
PBS	- <i>phosphate-buffered saline</i>
PEG	- polietilenoglicol
PGE <sub>2</sub>	- prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	- prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub>	- prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	- Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	- prostaciclina
PI3K	- fosfatidil-inositol 3-quinase
PIP <sub>2</sub>	- fosfatidil-inositol-bifosfato
PKA	- proteína quinase A
PKC	- proteína quinase C
PKG	- proteína quinase G
PLC	- fosfolipase C
PMS	- metassulfato de fenazina
PP2	- 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolo [3,4-d]pirimidina
RAEC	- células endoteliais imortalizadas de aorta de coelho
R-COO	- radicais peróxidos

RE	- retículo endoplasmático
ROS	- espécies reativas de oxigênio
SDS	- dodecil sulfato de sódio
Ser	- serina
SK <sub>Ca</sub>	- canal de K <sup>+</sup> de condutância baixa ativado pelo Ca <sup>+2</sup>
SNC	- sistema nervoso central
SOD	- superóxido dismutase
SP	- substância P
Src	- proteína tirosina quinase Src
TBA	- ácido tiobarbitúrico
TBARS	- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEA	- tetraetilamônio
TGFβ	- fator de Crescimento e transformação β
TH <sub>4</sub>	- tetrahidrobiopterina
TXA <sub>2</sub>	- tromboxano A <sub>2</sub>
Tyr	- tirosina
U46619	- 9,11-dideoxi- 9α-metanoepoxi prostaglandina F2α
VEGF	- fator de crescimento do endotélio vascular
vWF	- fator de Von Willebrand
4-AP	- 4-aminopiridina
15-HETE	-15-s-hidroieicosatetraenóico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Causas de mortalidade no mundo em 2000.....	1
<b>Figura 2:</b>	Corte transversal da parede arterial.....	5
<b>Figura 3:</b>	Fatores vasorrelaxantes produzidos pelo endotélio vascular.....	15
<b>Figura 4:</b>	Principais fatores vasoativos liberados pelo endotélio vascular.....	16
<b>Figura 5:</b>	Principais etapas da descoberta do papel fisiológico do NO.....	17
<b>Figura 6:</b>	Estrutura e atividade catalítica das NOS.....	19
<b>Figura 7:</b>	Reações catalisadas pela eNOS para a biossíntese do NO a partir da L-arginina.....	19
<b>Figura 8:</b>	Regulação da eNOS nas cavéolas.....	22
<b>Figura 9:</b>	Produção do NO e do relaxamento vascular após a estimulação da eNOS pelas principais vias de ativação denominadas dependente do $Ca^{2+}$ e independente do $Ca^{2+}$ .....	25
<b>Figura 10:</b>	Ativação da eNOS mediada pela ativação da Src e da via PI3K/Akt.....	27
<b>Figura 11:</b>	Múltiplos efeitos do NO endotelial.....	29
<b>Figura 12:</b>	A disfunção endotelial.....	32
<b>Figura 13:</b>	Efeitos dos polifenóis vegetais na função endotelial.....	38
<b>Figura 14:</b>	<i>Dicksonia sellowiana</i> .....	40
<b>Figura 15 A:</b>	Estruturas químicas dos compostos fenólicos majoritários identificados no extrato hidroalcoólico da <i>Dicksonia sellowiana</i> (EHDS).....	46
<b>Figura 15 B:</b>	Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico da <i>Dicksonia sellowiana</i> (EHDS) em HPLC-DAD.....	46
<b>Figura 16:</b>	O EHDS induz relaxamento vascular dependente do endotélio e da via óxido nítrico/GMPc.....	67
<b>Figura 17:</b>	Inibição parcial do relaxamento induzido pelo EHDS em presença dos inibidores da ciclooxigenase (COX) e da proteína quinase A (PKA).....	68
<b>Figura 18:</b>	Efeito inibitório dos bloqueadores de canais de potássio no relaxamento vascular induzido pelo EHDS.....	69
<b>Figura 19:</b>	O relaxamento vascular induzido pelo EHDS envolve a ativação	70

	de receptores muscarínicos em aorta de rato.....	
<b>Figura 20.</b>	Registro típico do efeito hipotensor dependente da dose induzido pelo EHDS (10, 20, e 40 mg/Kg) administrado pela via endovenosa em ratos anestesiados.....	71
<b>Figura 21.</b>	O efeito hipotensor do EHDS em ratos anestesiados é dependente da ativação de receptores muscarínicos.....	72
<b>Figura 22:</b>	Atividade antioxidante do EHDS contra espécies reativas de oxigênio.....	75
<b>Figura 23 A:</b>	O EHDS protege as células endoteliais contra o estresse oxidativo produzido pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	77
<b>Figura 23 B:</b>	Representação gráfica das médias de fluorescência da 2',7'-diclorofluoresceína (DCF).....	78
<b>Figura 24:</b>	Efeitos <i>in vivo</i> do extrato hidroalcoólico da <i>Dicksonia sellowiana</i> (EHDS) na atividade da enzima catalase e na peroxidação lipídica.....	79
<b>Figura 25:</b>	Caracterização do efeito vasorrelaxante induzido pelo EHDS em anéis de artéria coronária de porco.....	81
<b>Figura 26:</b>	Envolvimento da Calmodulina, independente da ativação da CaMKII, no relaxamento dependente do NO induzido pelo EHDS em artéria coronária de porco.....	82
<b>Figura 27:</b>	Participação da ativação da quinase redox-sensível Src e da via PI3K/Akt no relaxamento dependente de endotélio induzido pelo EHDS.....	84
<b>Figura 28:</b>	O efeito do EHDS nas contrações induzidas pelo U46619 em anéis de artéria coronária de porco com endotélio.....	86
<b>Figura 29 A:</b>	O EHDS induz a formação endotelial de ROS em secções de artéria coronária de porco.....	88
<b>Figura 29 B:</b>	Representação gráfica das médias de fluorescência da dihidroetidina (DHE).....	89
<b>Figura 30:</b>	Imunohistoquímica utilizando um anticorpo seletivo para eNOS fosforilada em Ser1177 em secções de artéria coronária de porco.....	90
<b>Figura 31:</b>	O EHDS induz fosforilação da Akt na Ser473 e da eNOS na	92

	Ser1177 de forma dependente da concentração em cultura de células endoteliais de coronária de porco.....	
<b>Figura 32:</b>	O EHDS induz uma rápida fosforilação da Akt a Ser473 e da eNOS a Ser1177 em cultura de células endoteliais de coronária de porco.....	94
<b>Figura 33:</b>	Papel da calmodulina e da CaMKII nos níveis de fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidos pelo EHDS.....	96
<b>Figura 34:</b>	Participação das ROS na fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidas pelo EHDS em cultura de células endoteliais de artéria coronária de porco.....	98
<b>Figura 35:</b>	O EHDS induz a ativação da via Src- PI3-kinase/Akt em células endoteliais de artéria coronária de porco.....	100
<b>Figura 36:</b>	Duração do efeito do EHDS na fosforilação da Akt e da eNOS após a remoção do extrato.....	102
<b>Figura 37:</b>	Efeito vasorrelaxante dos compostos fenólicos identificados no extrato hidroalcoólico de <i>Dicksonia sellowiana</i> (EHDS).....	104
<b>Figura 38:</b>	Principais mecanismos envolvidos no relaxamento vascular mediado pelo NO após estimulação pelo EHDS em aorta isolada de rato e em artéria coronária de porco.....	122

## RESUMO

*Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook é uma planta nativa das Américas Central e do Sul, conhecida popularmente como Xaxim ou samambaiaçu. Uma preparação fitoterápica das partes aéreas da *D. sellowiana* tem sido testada clinicamente no Brasil para tratar a asma, porém tem sido relatados efeitos benéficos no sistema cardiovascular. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do extrato hidroalcoólico padronizado obtido das folhas da *D. sellowiana* (EHDS) em aorta de rato e em artéria coronária de porco, e ainda investigar as propriedades antioxidantes deste extrato.

Em aorta de rato pré-contraída com fenilefrina, o EHDS causou relaxamento total, o qual foi bloqueado pela remoção do endotélio, ou incubação prévia de L-NAME (inibidor das NO sintases), ODQ (inibidor da guanilil ciclase solúvel), caribdotoxina (CTX; bloqueador de canais de potássio de condutância intermediária e alta ativados pelo cálcio), ou atropina (antagonista muscarínico), e foi parcialmente inibido por indometacina (inibidor da ciclooxigenase), KT 5730 (inibidor da PKA) ou apamina (APA; bloqueador de canais de potássio de baixa condutância ativados pelo cálcio). Além disso, o EHDS causou hipotensão em ratos anestesiados, a qual foi inibida pela atropina, mas não pela pirlamina (antagonista de receptores H<sub>1</sub>). O EHDS (0,1 a 100 µg/mL) também apresentou uma forte atividade sequestradora de todas as espécies reativas testadas (•DPPH, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, •OH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), protegeu células endoteliais contra o estresse oxidativo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de mecanismos que independem do aumento da atividade da catalase, e exerceu um efeito protetor contra a peroxidação lipídica em ratos. Além disso, foi investigado o mecanismo de ação pelo qual o EHDS estimula a formação do NO em artérias coronárias de porco e em cultura de células endoteliais deste vaso. O relaxamento arterial dependente do endotélio e produzido pelo EHDS foi fortemente inibido pelo L-NA (inibidor das NOS), pela combinação do L-NA, CTX mais APA, pelo MnTMPyP (um mimético da SOD permeável à membrana), pela PEG-catalase (análogo da catalase permeável à membrana). A combinação da CTX mais APA (inibidores da resposta vasorrelaxante mediada pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio), o calmidazólio (inibidor da calmodulina) e o PP2 (inibidor da Src quinase) inibiram parcialmente o relaxamento induzido pelo EHDS. Em células endoteliais, o EHDS causou a fosforilação sustentada da Akt e da eNOS no resíduo de Ser1177, a qual foi abolida pelo MnTMPyP, PEG-catalase e wortmaninaa.

Em conjunto, os resultados demonstram que o extrato hidroalcoólico padronizado da *D. sellowiana* possui substâncias capazes de induzir relaxamento vascular e hipotensão. O mecanismo responsável pelos efeitos vasculares do EHDS em ratos envolve a ativação de receptores muscarínicos, estimulação da via NO/guanilil ciclase, e abertura de canais de potássio. Além disso, o EHDS também causa relaxamento dependente do endotélio e do NO

em artérias coronárias de porco. Este efeito envolve a ativação redox-sensível da via Src-PI3K/Akt a qual, por sua vez, causa a fosforilação da eNOS, resultando no aumento da formação do NO em anéis de artéria coronária e em células endoteliais. A ativação da eNOS pela calmodulina contribui parcialmente para o efeito do EHDS. O EHDS também apresenta uma importante atividade seqüestradora de radicais livres, a qual pode contribuir para a preservação do NO produzido endogenamente. Portanto, nosso estudo sugere que o EHDS e preparações obtidas da *D. sellowiana* podem ser úteis para auxiliar no tratamento de várias condições patológicas relacionadas à disfunção endotelial.

## ABSTRACT

*Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, a plant native to Central and South America, popularly known as “Xaxim”, is currently under clinical tests in Brazil against asthma, but has been associated with beneficial effects on cardiovascular system. We have thus investigated the effects of HEDS on contractility of both rat aortic and porcine coronary artery rings, as well as the antioxidant properties of this extract.

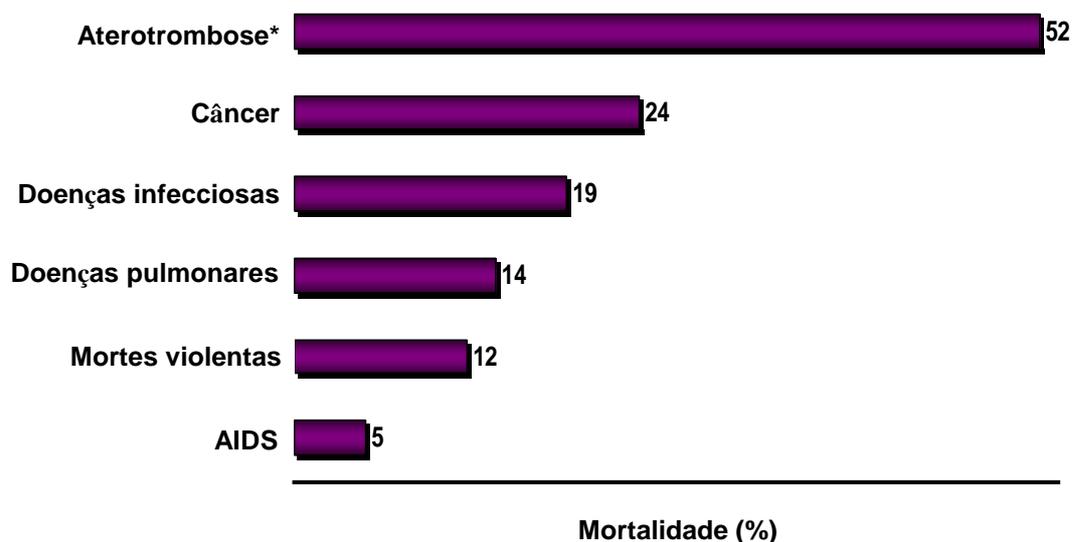
In phenylephrine-contracted rat aortic rings, HEDS caused a complete relaxation which was fully prevented by endothelium removal, L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor), ODQ (a guanylate cyclase inhibitor ODQ), charybdotoxin (CTX; a large and intermediate-conductance calcium-activated potassium channel blocker), or atropine (a muscarinic receptor antagonist), and partially inhibited by indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor), KT 5730 (a PKA inhibitor) and apamin (APA; a small conductance calcium-activated potassium channel blocker inhibitors). In addition, HEDS caused hypotension in anaesthetized rats, an event also inhibited by atropine, but not pyrilamine (a histaminic H<sub>1</sub> receptor antagonist). The HEDS (0.1 to 100 µg/mL) exhibited a strong scavenging effect against all reactive species tested (•DPPH, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, •OH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and protected endothelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, entirely via catalase-independent mechanisms. In addition, HEDS exerted a protective effect against lipidic peroxidation in rats. We also investigated whether phenolic compounds present in HEDS triggered the endothelial formation of nitric oxide (NO) and characterized the underlying mechanisms in porcine coronary artery rings and its endothelial cells. The endothelium-dependent relaxation induced by HEDS was strongly reduced by L-NA (an eNOS inhibitor), the combination of L-NA, CTX plus APA, MnTMPyP (a membrane permeant mimetic of superoxide dismutase-SOD), PEG-catalase (a membrane permeant analogue of catalase), or wortmannin (an inhibitor of PI3K/Akt pathway). The combination of CTX and APA (inhibitors of endothelium-derived hyperpolarising factor-mediated responses), calmidazólio (a calmodulin inhibitor), or PP2 (an inhibitor of Src kinase) partially inhibited HEDS-induced relaxation. In endothelial cells, HEDS caused a sustained phosphorylation of Akt and eNOS at Ser1177 residue, which was abolished by MnTMPyP, PEG-catalase, and wortmannin.

Taken together, our results reveal that the standardized hydroalcoholic extract from *D. sellowiana* contains substances which display vasodilatory properties both *in vivo* and *in vitro*. The mechanisms responsible for the vascular effects of HEDS involve activation of muscarinic receptors, stimulation of the nitric oxide-guanylate cyclase pathway, and opening of calcium-activated potassium channels in rats. Additionally, the HEDS also causes endothelium- and NO-dependent relaxation in coronary arteries. This effect involves the redox-sensitive activation of the Src-PI3-kinase/Akt pathway that, in turn, causes phosphorylation of eNOS, resulting in increased formation of NO in both coronary artery rings and endothelial cells. The vascular

relaxation induced by HEDS, at least part, is consequence of eNOS activation by calmoduline. Moreover, HEDS presents an important “scavenger” activity against free radicals, which can contribute for the preservation of endogenously produced NO. Therefore, our study discloses that HEDS, and preparations obtained from *D. sellowiana*, may be usefull to improve the management of several pathological conditions related to endothelial dysfunction.

## I INTRODUÇÃO

Alterações vasculares morfofuncionais são a origem da maior parte das patologias cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, as cardiopatias isquêmicas, os acidentes vasculares cerebrais e as isquemias vasculares periféricas, as quais são de longe a primeira causa de mortalidade no mundo, contabilizando 52% do número de mortes no ano de 2002 (Figura 1).



**Figura 1: Causas de mortalidade no mundo em 2000** (Modificado de Anselm 2007).

*\*Doenças cardiovasculares, doença cardíaca isquêmica e doenças cerebrovasculares.*

No Brasil, neste mesmo ano, as doenças cardiovasculares também foram responsáveis pelo maior número de casos de morte, em relação ao total de óbitos ocorridos no mesmo período, o qual correspondeu a 27,5%. Na sequência aparecem as neoplasias (12,7%), causas externas (12,5%), doenças do aparelho respiratório (9,3%), doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas (5,0%), doenças infecciosas e

parasitárias (4,7%), doenças do aparelho digestivo (4,5%), algumas afecções do período perinatal (3,9%), doenças do sistema nervoso (1,2%) e malformações congênitas (1,0%) (Nogueira, 2004).

No ano de 2005, as doenças relacionadas ao sistema circulatório continuaram sendo a principais causa de mortalidade no país. As patologias que compreendem este sistema somaram 26,5 % das causas de mortalidade. Dentro deste grupo destacam-se o acidente vascular cerebral (AVC), a doença isquêmica do coração (infarto agudo do miocárdio), a hipertensão e a insuficiência cardíaca (Tabela 1).

**Tabela 1: As dez principais causas de óbito no Brasil no ano de 2005.**

<b>Ordem</b>	<b>Causas</b>	<b>Número de óbitos</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	Doenças cerebrovasculares	90.006	10
<b>2</b>	Doenças isquêmicas do coração	84.945	9,4
<b>3</b>	Homicídios	47.578	5,3
<b>4</b>	Diabetes Melittus	40.317	4,5
<b>5</b>	Influenza e pneumonia	36.053	4,0
<b>6</b>	Doenças crônicas respiratórias	36.555	4,1
<b>7</b>	Acidentes de transportes terrestres	35.994	4,0
<b>8</b>	Doenças hipertensivas	33.487	3,7
<b>9</b>	Insuficiência cardíaca	31.054	3,4
<b>10</b>	Afecções originadas no período perinatal	29.799	3,3

---

*Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.*

Apesar do progresso considerável nos domínios da cirurgia e da terapêutica, estima-se que as patologias cardiovasculares permanecerão na primeira posição entre as causas de mortalidade em todo o mundo em 2020 (Tabela 2).

**Tabela 2: Previsão de causas de mortalidade em 2020 em comparação com 1990 em nível mundial.**

<b>Doenças ou lesões em 1990</b>	<b>Ordem</b>	<b>Doenças ou lesões em 2020</b>
Doença cardíaca isquêmica (infarto)	<b>1</b>	Doença cardíaca isquêmica (infarto)
Doença cerebrovascular (AVC)	<b>2</b>	Doença cerebrovascular (AVC)
Acidentes rodoviários	<b>3</b>	Depressão unipolar
Cânceres de traquéia, brônquios e pulmões	<b>4</b>	Cânceres de traquéia, brônquios e pulmões
Lesões ao próprio corpo	<b>5</b>	Acidentes rodoviários
Afecções originada no período perinatal	<b>6</b>	Abuso do álcool
Infecções do trato respiratório inferior	<b>7</b>	Osteoartrites
Anomalias congênitas	<b>8</b>	Demências e outras disfunções do SNC
Cânceres do cólon e reto	<b>9</b>	Doença pulmonar obstrutiva crônica
Câncer de estômago	<b>10</b>	Lesões ao próprio corpo

*Fontes: Murray and Lopez. Global Burden of Disease Study, 1997.*

As pesquisas na área cardiovascular evoluíram bastante nos últimos vinte anos, principalmente no que se refere aos conhecimentos em biologia celular e molecular. Os trabalhos realizados permitiram identificar vários fatores envolvidos na homeostase vascular. Nestas investigações, o endotélio vascular, uma monocamada de células que reveste internamente o vaso, tem apresentado um papel crucial na regulação de vários processos vasculares fisiológicos e patológicos. Mais do que uma barreira física, ele representa um verdadeiro órgão capaz de produzir diversas substâncias que regulam o tônus vascular, bem como interferem nos processos de inflamação, coagulação e angiogênese. Assim, qualquer desequilíbrio na produção dos fatores endoteliais conduz à disfunção endotelial, um evento que caracteriza e geralmente precede as doenças cardiovasculares. A pesquisa de novos medicamentos que atuem diretamente

sobre o endotélio vascular e visem o restabelecimento da sua função é um foco importante dos estudos atuais relacionados ao sistema cardiovascular.

Neste contexto, vários estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo moderado de polifenóis (substâncias naturais vastamente distribuídas no reino vegetal e que integram a alimentação humana) está inversamente relacionado ao surgimento de doenças cardiovasculares, pois produzem efeitos benéficos como a melhora da função endotelial, redução da pressão arterial e diminuição da agregação plaquetária (Stoclet *et al.* 2004). A natureza exata destes efeitos protetores continua a ser investigada, mas pode estar relacionada em parte à sua ação antioxidante, bem como à ação direta dos compostos polifenólicos no endotélio vascular. Atualmente sabe-se que um importante alvo dos polifenóis é o endotélio. Essas moléculas são capazes de ativar diferentes vias de sinalização nas células endoteliais relacionadas à secreção de fatores vasorrelaxantes protetores e à inibição de fatores vasoconstritores, e isso pode contribuir para os demais efeitos benéficos atribuídos a estes compostos.

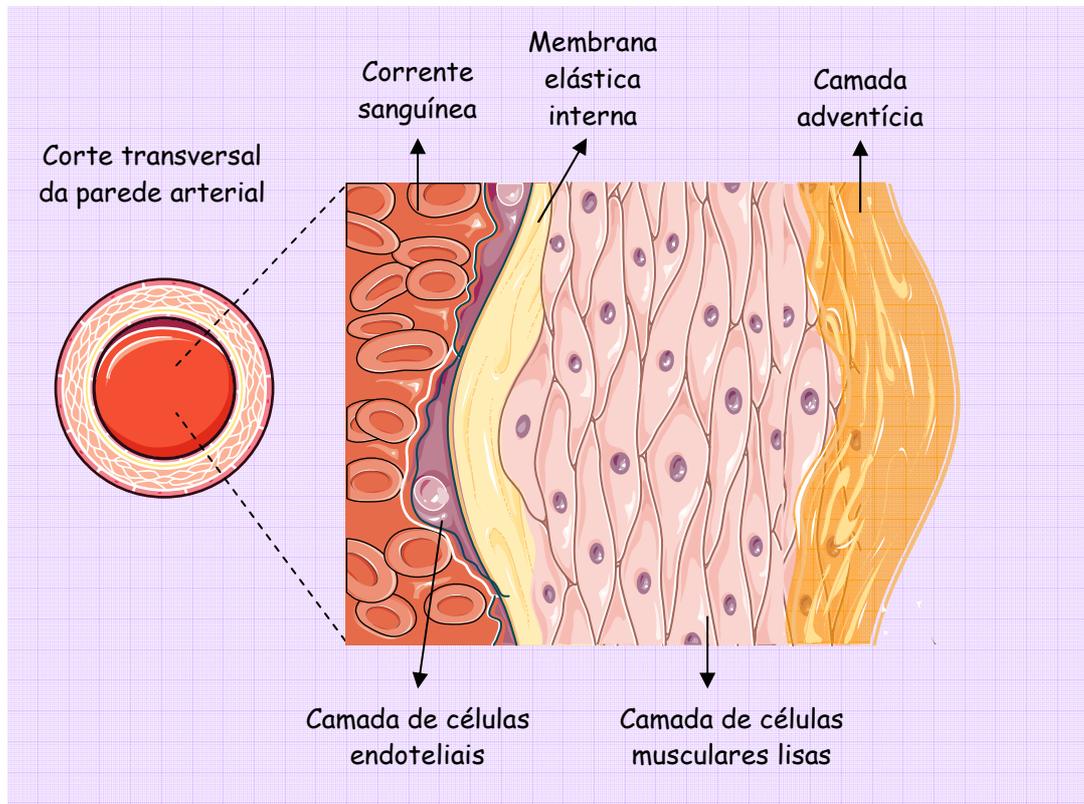
No decorrer deste trabalho foram investigados os efeitos protetores da planta *Dicksonia sellowiana* (popularmente conhecida como Xaxim) sobre o sistema vascular, através da análise do papel do endotélio na modulação do tônus vascular induzida pelos seus polifenóis.

## **1.1 Aspectos fisiológicos e patológicos do endotélio vascular**

### **1.1.1 Estrutura histológica dos vasos sanguíneos**

A parede vascular das artérias e das veias, exceto dos pequenos vasos, é composta por três camadas organizadas em torno de um canal central por onde

percorre o sangue. Do exterior até a luz do vaso distinguem-se a camada adventícia, a camada média (células musculares lisas) e a camada endotelial (Figura 2).



**Figura 2: Corte transversal da parede arterial** enfatizando a camada adventícia, a camada média, constituída por células musculares lisas, e a camada íntima ou endotelial, constituída por uma linha única de células endoteliais. Estas células desempenham um importante papel na regulação da homeostase vascular através da liberação de mediadores vasoativos (esquema modificado de Servier Medical Art – Powerpoint Image Bank).

A camada adventícia é a camada mais externa da parede vascular. Sua espessura varia de acordo com o tipo de vaso e localização. Ela é constituída de um tecido conjuntivo denso composto de fibroblastos e de macrófagos residentes, fibras colágenas, elásticas, e terminações nervosas que podem liberar diferentes fatores vasoativos. A camada adventícia das artérias de grande calibre contém vasos sanguíneos (arteríolas, vênulas, capilares, vasos linfáticos) chamados *vasa vasorum*, que fornecem oxigênio e nutrientes à camada média. Vários trabalhos demonstram que

a produção de fatores vasoativos pela camada adventícia não é limitada às terminações nervosas. Os fibroblastos da adventícia são capazes de produzir substâncias vasoativas como o NO (Kleschyov *et al.*, 1998; Kleschyov *et al.*, 2000b) ou ânions superóxido (Pagano *et al.*, 1997), podendo assim interferir no tônus vascular.

A camada média, a mais espessa, é composta basicamente por células musculares lisas e elastina. Esta camada é responsável pelo aumento ou redução do diâmetro do vaso, o que resulta respectivamente do relaxamento e da contração vasculares. Neste processo, suas células recebem os sinais químicos provenientes do endotélio, dos terminais nervosos ou do interstício. A contração das células musculares lisas ocorre como consequência do aumento da concentração citosólica do  $\text{Ca}^{2+}$ , devido à liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos estoques intracelulares e/ou entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  de origem extracelular. O  $\text{Ca}^{2+}$  livre, ao se ligar à calmodulina, ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) a qual fosforila a cadeia leve da miosina (MLC). Esta fosforilação permite a interação com os filamentos de actina e resulta na contração muscular (Walker, 1994). O relaxamento geralmente ocorre em consequência da diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, reduzindo a fosforilação das cadeias leves de miosina (MLC) pela miosina fosfatase. Diversos vasodilatadores agem sobre os níveis de adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico (AMPc) e de guanosina 3', 5' – monofosfato cíclico (GMPc) os quais ativam respectivamente a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase G (PKG). A PKA e a PKG fosforilam e inativam a MLCK, favorecendo a perda do tônus muscular. O estado de contração e relaxamento das células musculares lisas define assim o nível de pressão arterial e o aporte do fluxo sanguíneo em função das necessidades metabólicas (Michel, 1998).

A camada íntima, por sua vez, encontra-se em contato direto com o sangue e é composta por uma única camada de células endoteliais. Estas células sintetizam e

liberam diferentes mediadores (discutidos a seguir) que interferem em processos fisiológicos e patológicos relacionados à homeostase vascular.

### 1.1.2 Funções do endotélio vascular

O endotélio vascular não é somente uma monocamada de células que separa o sangue circulante da parede dos vasos, como se imaginava no passado, mas é um órgão dinâmico que responde a diversos estímulos físicos e humorais. A superfície total estimada do endotélio vascular nos humanos corresponde a 350 m<sup>2</sup> (Pries *et al.*, 2000). A sua vasta distribuição e a sua localização estratégica na interface sangue/tecido favorecem o desempenho de diversas funções relacionadas à homeostase vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980 ; Michiels, 2003).

As células endoteliais sintetizam e liberam vários fatores envolvidos em numerosos processos fisiológicos, dentre os quais a coagulação, a fibrinólise, a angiogênese e a manutenção do tônus vascular. Estes fatores são secretados principalmente quando o endotélio é ativado por agonistas que estimulam receptores acoplados a proteínas G e geram um aumento da concentração intracelular do Ca<sup>2+</sup> nas células endoteliais. São estes agonistas: (1) os neurotransmissores acetilcolina, noradrenalina, ATP e substância P, (2) os hormônios circulantes catecolaminas, vasopressina, angiotensina II, insulina; (3) os autacóides bradicinina, histamina, ADP, endotelina, (4) os produtos da coagulação sanguínea como a serotonina e a trombina. Além dos estímulos químicos, existe ainda um importante estímulo físico, o *shear stress*, ou estresse de cisalhamento, o qual corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce nas células endoteliais e que gera a síntese e liberação de mediadores vasorrelaxantes (Matlung *et al.*, 2009).

### 1.1.2.1 Envolvimento do endotélio na regulação da coagulação e da fibrinólise

A superfície de um endotélio sadio é anticoagulante e antitrombótica, pois o endotélio secreta uma variedade de moléculas que permitem regular a coagulação do sangue e a função plaquetária. A prostaciclina ( $PGI_2$ ), derivada do ácido araquidônico, e o NO são os principais agentes produzidos pelo endotélio que inibem a função plaquetária (Cines *et al.*, 1998). Esses dois fatores são continuamente sintetizados e liberados pelas células endoteliais. Além disso, certas moléculas envolvidas no processo de coagulação (ex: bradicinina e trombina) induzem a produção destes fatores como forma de limitar a formação do coágulo.

As células endoteliais expressam na superfície moléculas glicosaminoglicanas, que são polímeros de açúcares sulfatados e aminados como a heparina, as quais se ligam à antitrombina, um inibidor capaz de neutralizar a trombina (Bauer *et al.*, 1996). Além disso, o endotélio é capaz de catalisar a ativação da proteína C pela trombina (Esmon e Esmon 1988). A proteína C ativada irá se opor à coagulação inibindo dois importantes fatores de coagulação, os fatores Va e VIIIa.

O endotélio também pode secretar fatores pró-coagulantes, dentre os quais o fator ativador de plaquetas (PAF) e o fator de von Willebrand (vWF). O primeiro é liberado pelo endotélio logo que este é estimulado pela trombina, histamina ou por citocinas. O segundo é secretado constitutivamente no plasma e na matriz subendotelial e os seus níveis elevados têm sido relacionados ao risco de eventos cardiovasculares e choque isquêmico (Paulinska *et al.*, 2009).

### 1.1.2.2 Papel do endotélio vascular na angiogênese

A angiogênese é o processo fisiológico que permite a formação de novos vasos a partir de uma rede capilar pré-existente (Carmeliet, 2003). A angiogênese é indispensável a numerosos processos fisiológicos, tais como desenvolvimento embrionário, implantação da placenta, reparação de danos teciduais, durante a isquemia do miocárdio ou dos membros inferiores do corpo. Ela também participa de importantes processos patológicos tais como inflamação, isquemia, retinopatia diabética e poliartrite reumatóide (Ferrara e Alitalo 1999). Os vasos sanguíneos formados permitem assegurar a função essencial de nutrição e de aporte de oxigênio durante o crescimento. Por esta razão, a angiogênese é particularmente envolvida no crescimento dos tumores e no desenvolvimento das metástases.

O processo de formação de uma nova rede vascular requer uma série de etapas que envolvem ativamente as células endoteliais. A primeira etapa é a degradação da membrana basal em torno do vaso pré-existente, após a secreção de proteases pelas células endoteliais ativadas. As células endoteliais se desprendem e podem em seguida migrar para o espaço intersticial e proliferar para depois se diferenciarem em vasos sanguíneos maduros. Entre essas proteases, podem ser citadas as metaloproteinases da matriz (Conway, Collen *et al.* 2001).

O principal dentre os fatores angiogênicos é o fator de crescimento do endotélio vascular (em inglês *vascular endothelial growth factor* - VEGF), que reconhece os receptores distribuídos na superfície das células endoteliais. Sua fixação no receptor gera uma cascata de sinalização intracelular que conduz à divisão celular. Outro fator pró-angiogênico é o fator de crescimento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth*

*factor* - bFGF), o qual exerce um potente efeito mitogênico e quimiotático para as células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas dos vasos.

### **1.1.2.3 Fatores envolvidos na regulação do tônus vascular**

As células endoteliais produzem numerosos compostos vasodilatadores e vasoconstritores que participam da regulação do tônus vascular. Dentre os vasoconstritores liberados pelo endotélio podemos destacar alguns derivados do ácido araquidônico (Miller *et al.*, 1985), ânion superóxido (Vanhoutte, 1988), a endotelina-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988) e a angiotensina II (Veltmar *et al.*, 1991). O endotélio relaxa a musculatura lisa vascular por meio de três mediadores principais: o óxido nítrico (NO) (Furchgott, 1983; Hutchinson *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987a; Palmer *et al.*, 1987), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Moncada *et al.*, 1976) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Feletou & Vanhoutte, 1988).

#### **1.1.2.3.1 Fatores vasoconstritores**

##### *Derivados do ácido araquidônico e as espécies reativas de oxigênio (ROS)*

Foi demonstrado que o ácido araquidônico é capaz de induzir uma contração dependente do endotélio em veia femoral de cão e que esta resposta é bloqueada por inibidores da cicloxigenase (COX) (Miller & Vanhoutte, 1985). O ácido araquidônico também pode ser oxidado pelas COX para produzir os endoperóxidos que serão a origem das prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2</sub>), da PGI<sub>2</sub> e do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). O TXA<sub>2</sub> e a PGF<sub>2</sub> tem efeitos vasoconstritores. Entretanto, a produção destes não é suficiente para explicar a contração dependente do endotélio induzida pelo ácido araquidônico na veia femoral de cão. As espécies reativas de oxigênio (ROS),

especialmente os ânions superóxido, são formados durante a ativação da COX. Os ânions superóxido são capazes de diminuir a biodisponibilidade e a atividade biológica do NO e assim favorecer a vasoconstrição. O ácido araquidônico pode ainda ser oxidado pela lipoxigenase e gerar produtos como o ácido 15-s-hidroieicosatetraenóico (15-HETE) podendo ocasionar uma contração do vaso (Vanhoutte *et al.*, 1988).

### *Endotelina*

A endotelina (ET) é um vasoconstritor potente das células musculares lisas produzido pelo endotélio. Ela permite manter o tônus vascular basal, mas seus efeitos são modulados em função das localizações anatômicas e das condições fisiopatológicas. Ela é um peptídeo, ou melhor, designa uma família de peptídeos constituída de três diferentes isoformas de endotelina: ET-1, ET-2 e ET-3 (Kedzierski e Yanagisawa, 2001), que agem em dois tipos de receptores acoplados a proteínas G, situados nas células musculares lisas (receptor A da endotelina - ET<sub>A</sub>) e nas células endoteliais (receptor B da endotelina - ET<sub>B</sub>) (Sakurai *et al.*, 1992). A ação da ET-1 nos receptores A nas células musculares lisas ocasiona uma potente contração, enquanto que sua ação nos receptores B induz a produção do NO e da prostaciclina, opondo-se paradoxalmente à contração, e explicando assim a vasodilatação frequentemente observada antes da vasoconstrição. A expressão deste peptídeo é estimulada pela trombina, pelo Fator de Crescimento e transformação  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$*  - TGF $\beta$ ), adrenalina, éster de forbol e pelo ionóforo de cálcio A213187 (Perros & Humbert, 2005). Além disso, nas doenças cardiovasculares, é descrita uma importante interação entre a ET-1 e a Angiotensina II, outro importante mediador vascular, (D'Orléans-Juste *et al.*, 2008).

### *Angiotensina II*

A célula endotelial é um importante sítio de conversão da angiotensina I em angiotensina II, um octapeptídeo que é o principal peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina. Este sistema é ativado quando a baixa pressão sanguínea causa redução do fluxo sanguíneo pelos rins, estimulando a secreção renal da renina no sangue. Esta enzima converte uma proteína plasmática (substrato de renina) em angiotensina I, a qual, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), é convertida no produto biologicamente ativo, a angiotensina II (Peach, 1977). Esse hormônio promove a vasoconstrição e conseqüente retorno da pressão arterial aos níveis de referência. Além disso, a angiotensina II age nas glândulas supra-renais, induzindo a liberação de outro hormônio, a aldosterona, produzida no córtex destas glândulas. A aldosterona exerce efeito direto sobre os rins, aumentando a reabsorção de sódio e, portanto, aumentando o volume sanguíneo e a pressão arterial (Guyton, 1991). Portanto, a angiotensina II interfere na regulação da vasomotricidade e ainda no equilíbrio eletrolítico.

Uma das conseqüências funcionais da ação em longo prazo da angiotensina no sistema vascular é a hipertrofia da parede arterial e do ventrículo esquerdo, devido à sua ação hipertrófica e inibidora de apoptose (Schiffrin e Touyz, 2004).

#### **1.1.2.3.2 Fatores vasodilatadores**

##### *Óxido Nítrico (NO)*

O NO é um dos mediadores vasoprotetores mais importantes secretados pelo endotélio. Ele é um gás solúvel, radical livre, sintetizado de maneira contínua pelas células endoteliais através da enzima NO sintase (eNOS). Esta enzima catalisa a produção do NO a partir do aminoácido L-arginina. O relaxamento da musculatura lisa

adjacente resulta da ativação da guanilil ciclase solúvel pelo NO (Bian & Doursout, 2008) (maiores detalhes no item 1.2.3).

### *Prostaciclina*

A prostaciclina ( $PGI_2$ ) foi o primeiro mediador vasorrelaxante endotelial identificado e é o mais abundante produto do ácido araquidônico produzido pelo tecido vascular. Assim como o NO, a  $PGI_2$  representa um mecanismo de ação local importante para a regulação do tônus vascular. Seus efeitos na vasodilatação, bem como na inibição da agregação plaquetária estão bem caracterizados (Vane *et al.*, 1990).

A síntese da  $PGI_2$  é iniciada pela ação da enzima fosfolipase  $A_2$  sobre os fosfolipídios de membrana, promovendo a liberação do ácido araquidônico que os compõe. A ativação da fosfolipase D também foi descrita como uma via adicional para esta mobilização do ácido araquidônico (Wright & Malik, 1996; Ruan *et al.*, 1997). O ácido araquidônico liberado é oxidado pela enzima cicloxigenase dando origem à  $PGG_2$ , o qual é reduzida a  $PGH_2$ , ainda pela cicloxigenase. Por fim, a enzima prostaciclina sintase converte o  $PGH_2$  a  $PGI_2$  (Moncada *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1996; Vane *et al.*, 1998). Depois de sintetizada e liberada, a  $PGI_2$  exerce o seu efeito localmente, e é rapidamente convertida a um metabólito inativo através de um processo não enzimático (Moncada *et al.*, 1977; Vane *et al.*, 1998).

Em seu mecanismo de ação vasorrelaxante, a  $PGI_2$  produzida pelas células endoteliais promove a ativação de receptores acoplados à proteína G na membrana das células da musculatura lisa. A estimulação desses receptores aumenta a concentração citosólica do AMPc, segundo mensageiro que ativa a proteína quinase A (PKA) (Hopkins e Gorman, 1981). A ativação desta quinase impede a interação actina-miosina, ocasionando o relaxamento vascular (Bennett, 1995).

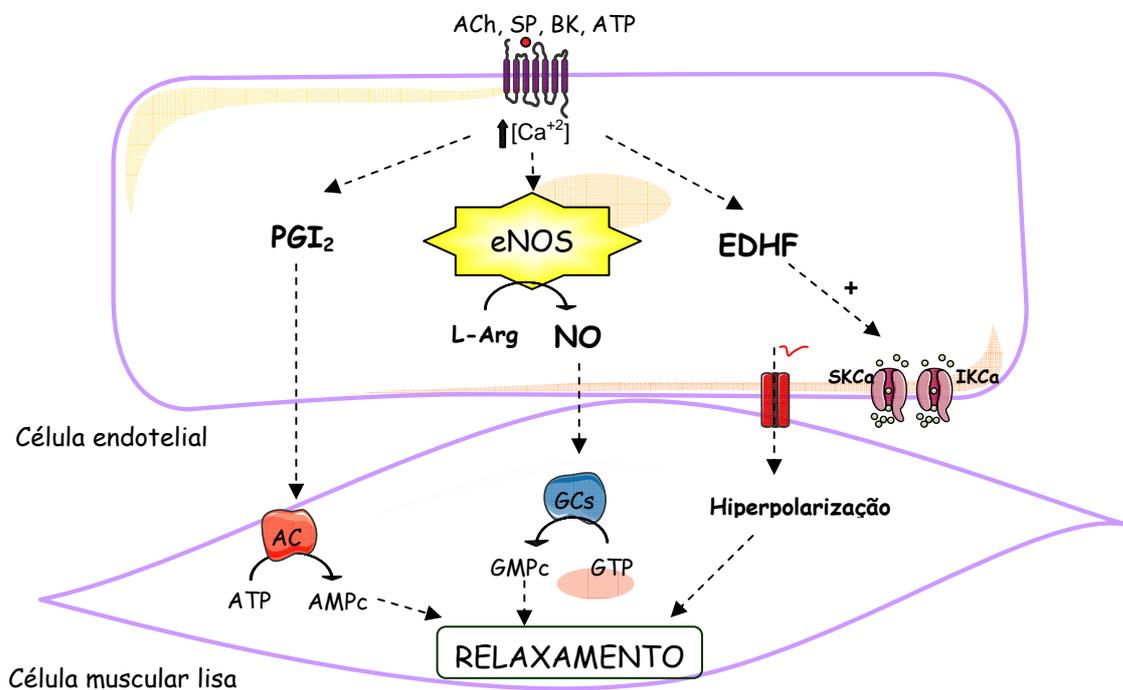
### *Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)*

Os mediadores mais bem caracterizados, produzidos pelas células endoteliais, são o NO e a PGI<sub>2</sub>, responsáveis pelo relaxamento vascular induzido por diversos agonistas e por processos mecânicos como o estresse de cisalhamento. Entretanto, mesmo na presença de inibidores da síntese de óxido nítrico, como os análogos da L-arginina (L-NAME e L-NMMA), ou de inibidores da síntese de prostaciclina (indometacina), muitos vasos sanguíneos (principalmente os de pequeno diâmetro) ainda respondem a estímulos químicos ou mecânicos com relaxamento vascular dependente do endotélio. Essa vasodilatação parece ser mediada por uma hiperpolarização celular, originalmente atribuída à liberação de um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), capaz de ativar canais de potássio presentes nas células do músculo liso vascular (Garland e McPherson, 1992; Nagao e Vanhoutte, 1992).

A natureza química deste fator endotelial ainda suscita várias interrogações. A vasodilatação induzida por este composto ocorre com participação ativa dos canais de potássio dependentes do Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca</sub>), especialmente os de condutância baixa e intermediária (Féléto, 2009). A transmissão da hiperpolarização gerada nas células endoteliais para as células musculares lisas parece ocorrer através das junções mioendoteliais. A baixa concentração do K<sup>+</sup> no espaço intercelular (entre o endotélio e as células musculares lisas) pode ativar a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e os canais de K<sup>+</sup> retificantes e assim contribuir para a hiperpolarização. A hiperpolarização impede a ativação os canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem e gera uma diminuição da concentração citosólica do Ca<sup>2+</sup> livre e o relaxamento vascular (para revisão, ver Busse *et al.*, 2002).

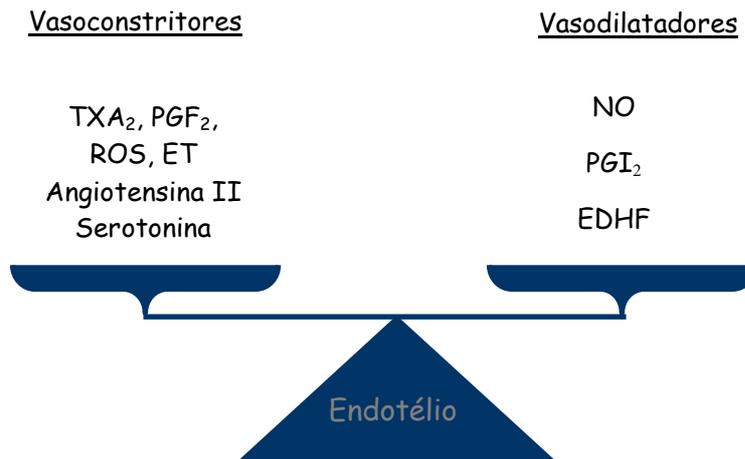
Os fatores responsáveis pela hiperpolarização atribuída ao EDHF são secretados após a ativação dos receptores de agonistas como a acetilcolina (ACh), a substância P (SP), a bradicinina (BK) e o ATP (Figura 3). Além disso, a força de cisalhamento, exercida pelo sangue sobre o endotélio vascular, é capaz de induzir uma vasodilatação pelo

aumento da secreção do NO, do EDHF e da prostaciclina, além de inibir a secreção da endotelina, um potente fator vasoconstritor (Cohen *et al.*, 1995). O aumento da produção do NO pode ser explicado pelo fato de que o fluxo gera uma rápida ativação da eNOS e, a médio prazo, um aumento da expressão gênica desta enzima por ativação da transcrição da eNOS endotelial (Xiao *et al.*, 1997). A vasodilatação, seja proveniente do estímulo químico (agonista) ou físico (estresse de cisalhamento), é abolida após a remoção do endotélio vascular.



**Figura 3: Fatores vasorrelaxantes produzidos pelo endotélio vascular.** São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$ . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização.

É importante salientar que a resposta vascular que permite obter um tônus basal fisiológico resulta da interação de todos os fatores, vasoconstritores e vasodilatadores (Figura 4), e que qualquer desequilíbrio na liberação destes fatores resulta numa situação patológica.



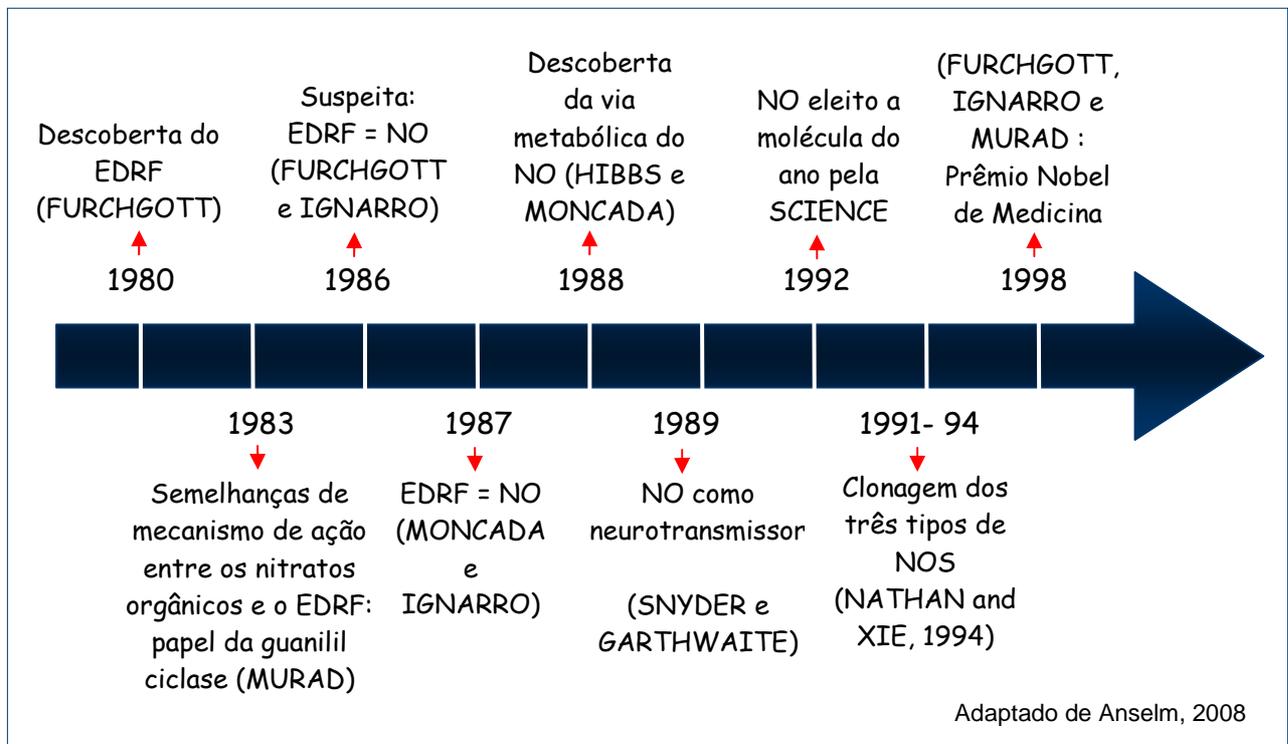
**Figura 4: Principais fatores vasoativos liberados pelo endotélio vascular.** Abreviações: PGF<sub>2</sub> - prostaglandinas F<sub>2</sub>; TXA<sub>2</sub> – tromboxano A<sub>2</sub>; ROS – espécies reativas de oxigênio; ET – endotelina; NO – óxido nítrico; PGI<sub>2</sub> – prostaciclina; EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio.

### 1.2.3 A via do NO

#### 1.2.3.1 Breve Histórico

Em 1980 a equipe de Furchgott mostrou que as células endoteliais tinham um papel central no relaxamento dos vasos estimulados pela acetilcolina e outros agonistas muscarínicos e que esse efeito resultava da liberação de um fator lábil e difusível que age sobre as células musculares lisas adjacentes e produzia seu relaxamento vascular. Este composto foi denominado fator relaxante derivado do endotélio (do inglês *endothelium-*

*derived relaxing factor*, EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980). Em 1983 Murad e equipe demonstraram que este fator é capaz de ativar a enzima guanilil ciclase solúvel nas células musculares lisas, gerando a produção de guanosina 3', 5' – monofosfato cíclico (GMPc), responsável pelo relaxamento (Rapoport & Murad, 1983). A descoberta deste fator estimulou numerosas pesquisas nos anos que se seguiram. Nos anos 1984-1986 técnicas de perfusão vascular permitiram determinar a meia-vida deste composto lábil, a qual foi estimada em 6 a 8 segundos, portanto, tratando-se de um composto instável e rapidamente degradado. Em 1987 Moncada e Ignarro demonstraram que o EDRF e o NO induziam um relaxamento vascular pelo mesmo mecanismo biológico e apresentam características químicas idênticas (Ignarro et al., 1987; Hutchinson *et al.*, 1987). Nesse momento, o EDRF foi caracterizado como sendo o NO. A seguir, a Figura 5 lista cronologicamente os principais eventos relacionados à descoberta do NO.

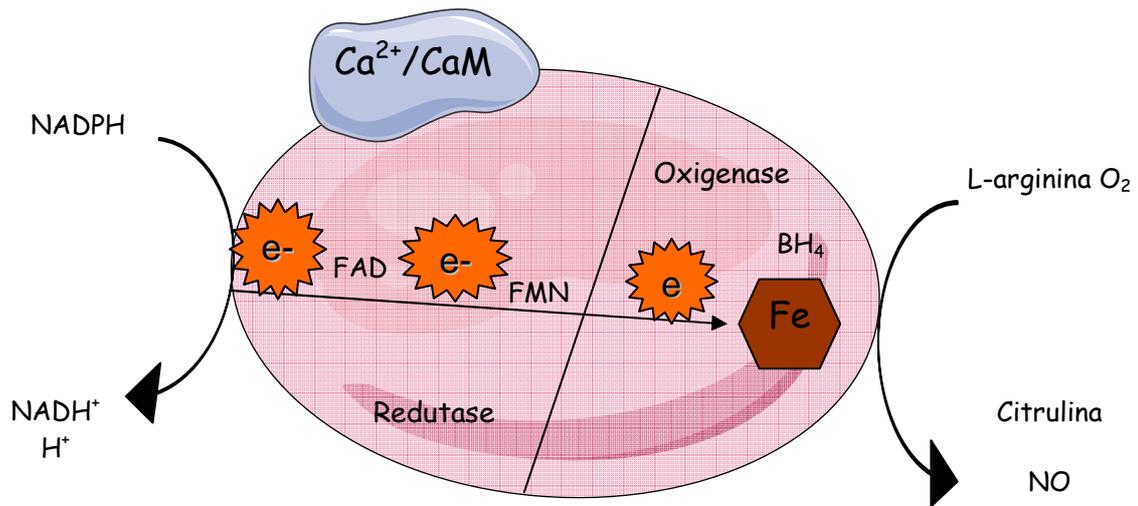


**Figura 5: Principais etapas da descoberta do papel fisiológico do NO.**

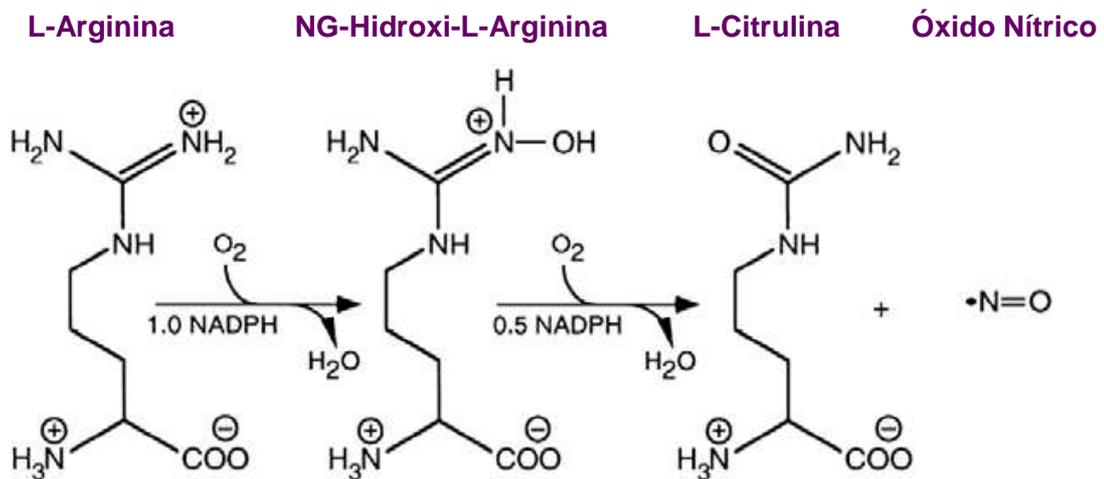
### 1.2.3.2 Sintases de NO

As NOS são enzimas que contêm um grupamento heme e cuja sequência de aminoácidos é próxima da do citocromo P450 redutase. Três isoformas de NOS foram descritas: duas são constitutivamente ativas, as isoformas neuronal (nNOS ou NOS I) e a endotelial (eNOS ou NOS III); e uma terceira isoforma foi denominada induzida (iNOS ou NOS II). As três isoformas são codificadas por três genes distintos, mas possuem em torno de 53% de homologia (Nathan and Xie, 1994). Para a produção de NO pelas NOS são necessários os seguintes co-fatores: NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida), O<sub>2</sub>, TH<sub>4</sub> (tetrahidrobiopterina), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e Ca<sup>+2</sup> (essencial para a atividade das formas constitutivas) (Bredt *et al.*, 1991; Stevens-Truss *et al.*, 1997). Todas as três isoenzimas de NOS são funcionalmente ativas como homodímeros (Baek *et al.*, 1993; Cubberley *et al.*, 1997; Siddhanta *et al.*, 1998).

Todas as isoformas ainda comportam uma molécula de heme complexada a um átomo de ferro. Os substratos L-arginina e o oxigênio geram a citrulina e o NO, tendo como doador de elétrons o NADPH. Estes elétrons são transmitidos via FAD e FMN ao ferro do heme em presença da BH<sub>4</sub>. O domínio oxigenase N-terminal contém os sítios de ligação do heme, da BH<sub>4</sub> e da L-arginina. Este domínio é acoplado ao domínio redutase, o qual contém os sítios de ligação para a FAD, FMN e NADPH (Alderton *et al.*, 2001) (Figuras 6 e 7).



**Figura 6: Estrutura e atividade catalítica das NOS.** Os elétrons são fornecidos pelo NADPH no domínio redutase. A proteína comporta vários sítios de ligação para o substrato L-arginina, o heme, o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (cálcio-calmodulina) e para os cofatores da reação: NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato),  $\text{BH}_4$  tetra-hidrobiopterina), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina –mononucleotídeo) (Stuehr *et al.*, 1991).



**Figura 7: Reações catalisadas pela eNOS para a biossíntese do NO a partir da L-arginina** (Stuehr *et al.*, 1991).

A primeira isoforma purificada e clonada foi a nNOS. Esta é expressa principalmente no cérebro, na medula espinhal e no sistema nervoso periférico, mas também no epitélio brônquico, traqueal, gastrintestinal e músculo esquelético (Moncada *et al.*, 1997; Mungrue *et al.*, 2002; Walford and Loscalzo, 2003). No sistema nervoso central a ativação da nNOS está envolvida nos processos de memória, regulação de funções neuro-endócrinas, mecanismos centrais de controle da pressão arterial, termorregulação, comportamento sexual, dor e agressividade (Garthwaite, 1991; Snyder and Bredt, 1992). O NO liberado pelos neurônios periféricos, não-adrenérgicos e não-colinérgicos, regula algumas funções gastrintestinais, respiratórias e genitourinárias importantes (Rand, 1992). A produção do NO pela eNOS é ativada pelo acoplamento do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina.

A enzima iNOS, é induzida em vários tipos celulares, principalmente nos macrófagos e nas células musculares lisas após a estimulação por agentes pró-inflamatórios como endotoxinas, a interleucina  $1\beta$ , o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o interferon  $\gamma$ . Portanto, a iNOS é induzida na presença de um processo inflamatório. Diferente da nNOS e da eNOS, a iNOS é regulada em nível transcriptional e sua ativação é independente da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  (Griffith & Stuehr, 1995; Ghosh & Salerno, 2003). Esta enzima tem como função principal produzir NO em grande quantidade para garantir as atividades antimicrobiana, citostática e imunorregulatória.

A eNOS é expressa principalmente nas células endoteliais e plaquetas, mas também ocorre em algumas populações de neurônios, no epitélio respiratório (Moncada *et al.*, 1997), no endotélio endocárdico e nos cardiomiócitos (Mungrue *et al.*, 2002), dentre outros locais. Ela pode ser ativada por diversos receptores acoplados à proteína G (acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina), ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , força de cisalhamento, dentre outros estímulos. Pode igualmente ter sua transcrição induzida

após estimulação por estrógenos ou após exercícios prolongados. O NO produzido pela eNOS é importante na regulação da pressão arterial, da distribuição do fluxo sanguíneo, inibição da adesão e da ativação das plaquetas e dos leucócitos, inibição da proliferação das células musculares lisas (Moncada e Higgs, 1993), e ainda é um importante fator de prevenção contra a aterosclerose, especialmente na circulação coronariana (Curtis e Pabla, 1997).

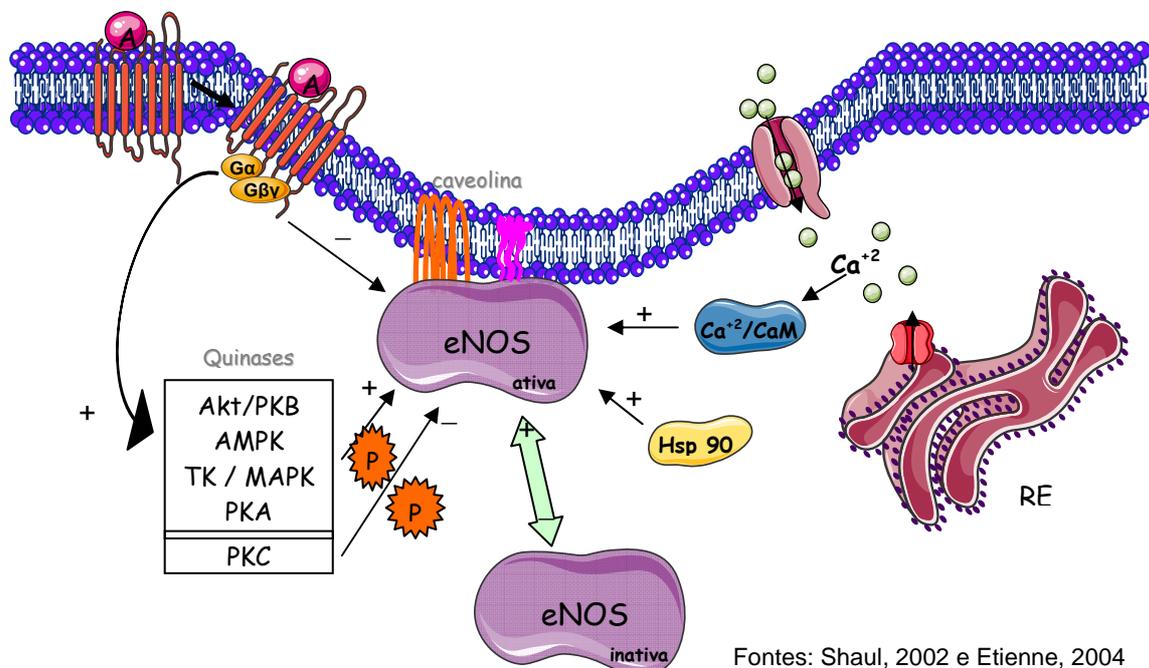
### **1.2.3.3 Regulação da eNOS**

Atualmente sabe-se que a ativação de muitas enzimas pode ser determinada pela sua localização celular e proximidade das moléculas que compõem a via efetora. Os monômeros que integram a eNOS ativa são miristoilados e palmitoilados e assim podem se associar com membranas intracelulares. A eNOS ativa pode ser detectada ao menos em três compartimentos membranares, na membrana plasmática, na cavéola e no aparato de Golgi. Esta associação é necessária para a fosforilação e ativação da eNOS em resposta aos estímulos (Fleming e Busse, 2003).

A regulação da atividade das eNOS é intimamente relacionada às cavéolas, as quais são invaginações da membrana plasmática (50 a 100 nm), compostas de colesterol, esfingolípídios e proteínas de membrana chamadas de caveolinas, cuja principal é a caveolina-1 (Cav-1). As cavéolas têm sido implicadas em processos de transporte celular através da membrana, mas também em muitos processos de sinalização, como os envolvidos na ativação da eNOS. Estas estruturas são ainda constituídas por receptores acoplados à proteína G, proteínas G heterotriméricas, receptores do tipo tirosina quinase, componentes da via das MAP quinases, família tirosina quinase Src e eNOS. Como consequência, a cavéola funciona como um centro de integração de sinais de transdução que regulam diferentes funções celulares. A co-

localização do sinal de transdução e proteínas que compreendem o “complexo de sinalização da eNOS” facilita a ativação da eNOS, a estimulação da via efetora e a conseqüente produção do NO (Li *et al.*, 2001).

A adesão da eNOS à cavéola ocorre por interação com as caveolinas (proteínas integrantes da cavéola) e por meio dos processos bioquímicos de miristoilação e palmitoilação. Diferentes quinases regulam a atividade da eNOS (Figura 8). Os seus efeitos podem ser de ativação ou de inibição, dependendo dos aminoácidos fosforilados (Govers & Rabelink, 2001; Marletta, 2001).

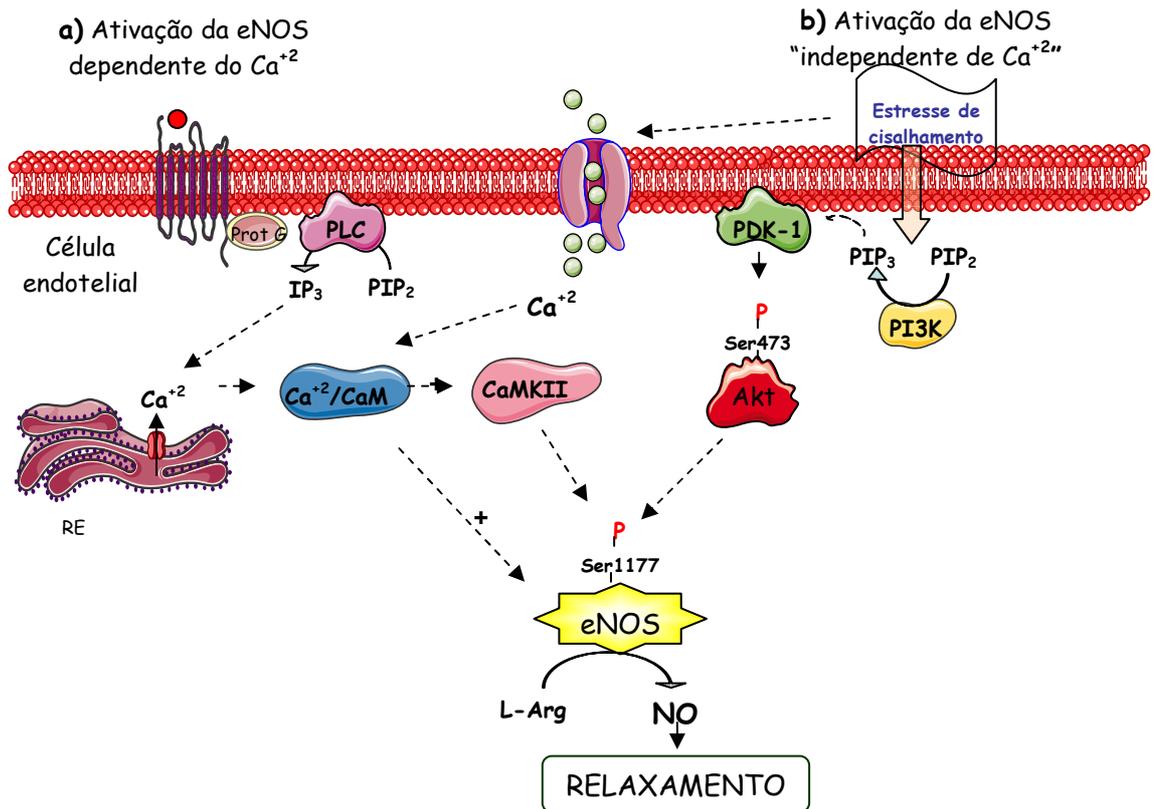


**Figura 8: Regulação da eNOS nas cavéolas.** A eNOS funcional é prioritariamente localizada nas cavéolas cuja membrana é enriquecida com colesterol (rosa). A interação com a caveolina (laranja) inibe, ao menos em parte, a atividade da eNOS. Classicamente a fixação de um agonista (A) a um receptor na cavéola pode estimular uma ou várias quinases envolvidas na fosforilação da eNOS. Estas fosforilações podem estimular (+) ou inibir (-) a atividade da eNOS em função do aminoácido alvo. Além disso, a ativação necessita da formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (calmodulina), sendo o  $\text{Ca}^{2+}$  originado dos estoques intracelulares (retículo endoplasmático-RE) próximos da cavéola ou provenientes do meio extracelular. A atividade da eNOS pode ainda ser aumentada pela proteína Hsp90 (*heat shock protein 90*) e diminuída pela interação com o domínio C-terminal de certos receptores acoplados à proteína G.

### 1.2.3.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ e atividade da eNOS

Classicamente, a isoforma eNOS tem sido caracterizada no quanto ela é constitutivamente expressa e no quanto sua ativação é dependente do aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e da ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaM) à enzima. A eNOS é constitutivamente expressa nas células endoteliais, particularmente nas artérias de condutância e, entre as três isoformas, é a mais sensível às modificações da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  livre. Por exemplo, quando um agonista como a acetilcolina ou a bradicinina são usados para estimular o endotélio vascular, tanto a quelação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular como a adição de um antagonista da calmodulina (CaM) abolem a produção do NO e o relaxamento dependente do endotélio (Busse & Mulsch, 1990; Luckhoff *et al.*, 1988). Mecanicamente, a CaM liga-se ao seu sítio específico, desloca uma alça adjacente autoinibitória da eNOS (e da nNOS também), facilitando o fluxo de elétrons do domínio redutase para o domínio oxidase da enzima e a conseqüente produção do NO (Figura 9-a). A eNOS pode, entretanto, ser ativada por certos estímulos que dispensam uma concentração aumentada e sustentada de  $\text{Ca}^{2+}$ . O mais importante destes estímulos é a força de cisalhamento (ou *shear stress*) gerada pelo atrito da corrente sanguínea sobre as células endoteliais. O estresse de cisalhamento, especialmente a aplicação do fluxo às células endoteliais em cultura ou vasos isolados mantidos por um tempo na ausência de qualquer fluxo, ainda podem gerar transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ayajiki *et al.*, 1996; Kanai *et al.* 1995). Entretanto, existe uma discrepância temporal entre a resposta ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a produção do NO, o primeiro evento sendo transitório e o segundo, mantido. Dessa forma, essas observações conduziram à sugestão de que o aumento da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  não é essencial para a ativação da eNOS induzida pelo estresse de cisalhamento (Ayajiki *et al.*, 1996). A aplicação do estresse de cisalhamento nas células endoteliais resulta na ativação da

fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K), Akt e proteína quinase A (PKA), as quais fosforilam eNOS no resíduo de serina 1177 e estimulam a sua atividade (Dimmeler *et al.*, 1999; Fisslthaler *et al.*, 2000). Este processo tem sido descrito como “ativação da eNOS independente do  $\text{Ca}^{2+}$ ” (Figura 9-b). Entretanto é descrito que a quelação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular também abole a atividade da eNOS induzida pelo estresse de cisalhamento, sugerindo que o aumento da produção de NO é ainda dependente da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$ , mas que a enzima pode ser ativada a níveis basais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dimmeler *et al.*, 1999). Existem outros estímulos (ex. bradicinina e histamina) que também interferem na fosforilação da eNOS, mas a cascata de sinalização requer um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esta aparente contradição pode ser explicada pelo fato de que as quinases que fosforilam a eNOS em resposta ao estresse de cisalhamento ou à administração de um agonista indutor do aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular apresentam diferentes sensibilidades ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Por exemplo, a ativação da proteína quinase II dependente da Calmodulina (CaMKII) é extremamente dependente do aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, enquanto que a ativação da Akt não é afetada pela remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  (Dimmeler *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 2001).



**Figura 9: Produção do NO e do relaxamento vascular após a estimulação da eNOS pelas principais vias de ativação denominadas dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  e independente do  $\text{Ca}^{2+}$ .** **a)** Nesta via ocorre a estimulação de receptores acoplados à proteína G na membrana das células endoteliais, os quais estimulam a produção do trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) pela enzima fosfolipase C (PLC). O  $\text{IP}_3$  estimula a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático (RE), ocorre a formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Este complexo pode ativar diretamente a produção do NO pela eNOS, a partir da L-Arginina, ou ainda estimular proteínas dependentes do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , como a proteína quinase II dependente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (CaMKII). Esta quinase pode ativar a eNOS por meio da fosforilação do resíduo de serina 1177. **b)** Em condições basais de concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, alguns estímulos como o estresse de cisalhamento podem ativar a eNOS via fosforilação em Ser1177 após a ativação da via PI3K – Akt. Além disso, é descrito que o estresse de cisalhamento é capaz de abrir canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana, contribuindo para a ativação da eNOS.

A eNOS pode ainda ser ativada em nível transcriptional pelos fatores de crescimento, como o VEGF, a insulina, o bFGF (*basic fibroblast growth factor*) e estrógenos, os quais aumentam a expressão da eNOS. O inverso ocorre por ação da

hipóxia e do LDL oxidado, que tendem a diminuir a expressão da eNOS (Michel *et al.*, 1997; Fleming e Busse, 1999; Govers e Rabelink, 2001)

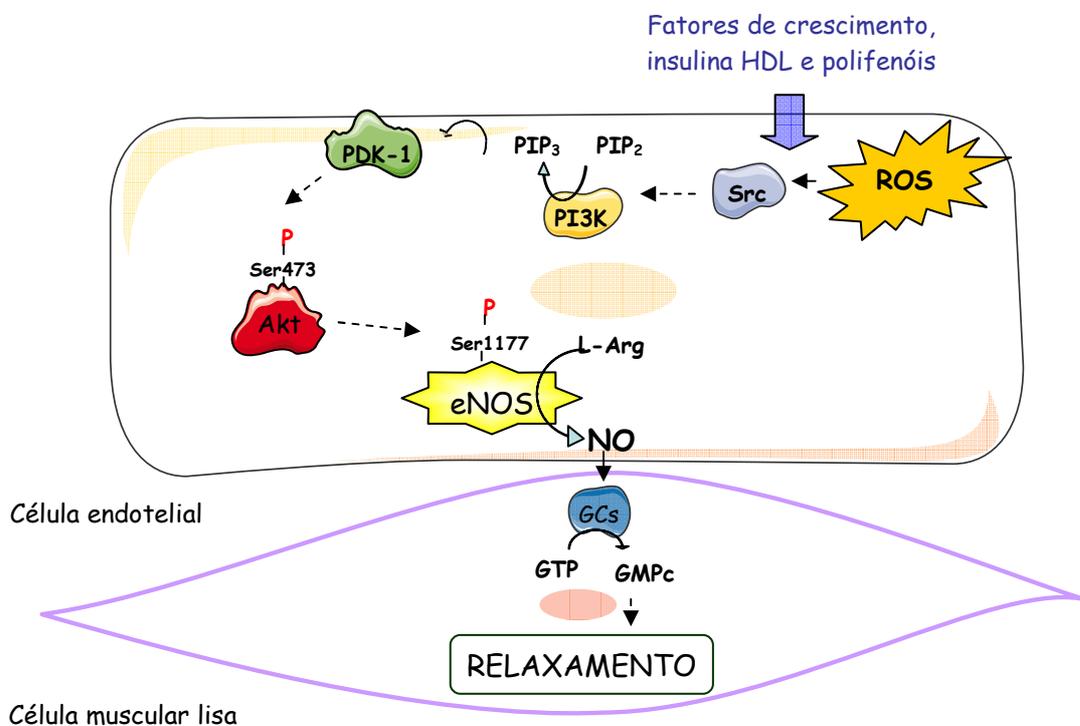
#### 1.2.3.3.2 Fosforilação da eNOS

A e-NOS pode ser fosforilada nos resíduos de serina, treonina e tirosina (Fleming *et al.*, 1998). Existem numerosos sítios possíveis de fosforilação na estrutura da eNOS, mas a fosforilação da serina 1177 (ex: humanos e porcos) ou 1179 (em bovinos) tem sido a mais explorada no que se refere às conseqüências funcionais nas células endoteliais e a estimulação da produção do NO (Fleming e Busse, 2003).

Em células endoteliais não estimuladas, a Ser1177 encontra-se não fosforilada, mas é rapidamente fosforilada após o estresse de cisalhamento (Dimmeler *et al.* 1999; Gallis *et al.*, 1999), estrogênio (Lantinho *et al.*, 1997), VEGF (Dimmeler *et al.*, 1999), insulina (Kim *et al.*, 2001), ou bradicinina (Fleming *et al.*, 2001). As quinases envolvidas neste processo variam de acordo com o estímulo. Por exemplo, o estresse de cisalhamento pode gerar a fosforilação da Ser1177 através da ativação da Akt (Dimmeler *et al.* 1999, Fisslthaler *et al.*, 2000), mas também da PKA (Boo *et al.*, 2002); o estrógeno e o VEGF fosforilam principalmente a eNOS via Akt; a insulina parece ativar ambas as vias da Akt e da AMPK (proteína quinase ativada pelo AMP), enquanto que a fosforilação da Ser1177 induzida pela bradicinina é mediada pela CaMKII (Quinase II dependente da calmodulina) (Fleming *et al.*, 2001). Quando a Ser1177 é fosforilada, o fluxo de elétrons através do domínio redutase e, conseqüentemente, a produção do NO são triplicados (McCabe *et al.*, 2000).

Ao contrário, a fosforilação no resíduo de treonina 495 da eNOS pela PKC inibe esta enzima (Fleming *et al.*, 2001). Existe outro sítio de fosforilação da eNOS na serina 847, a qual, quando está fosforilada por quinases dependentes da calmodulina, gera

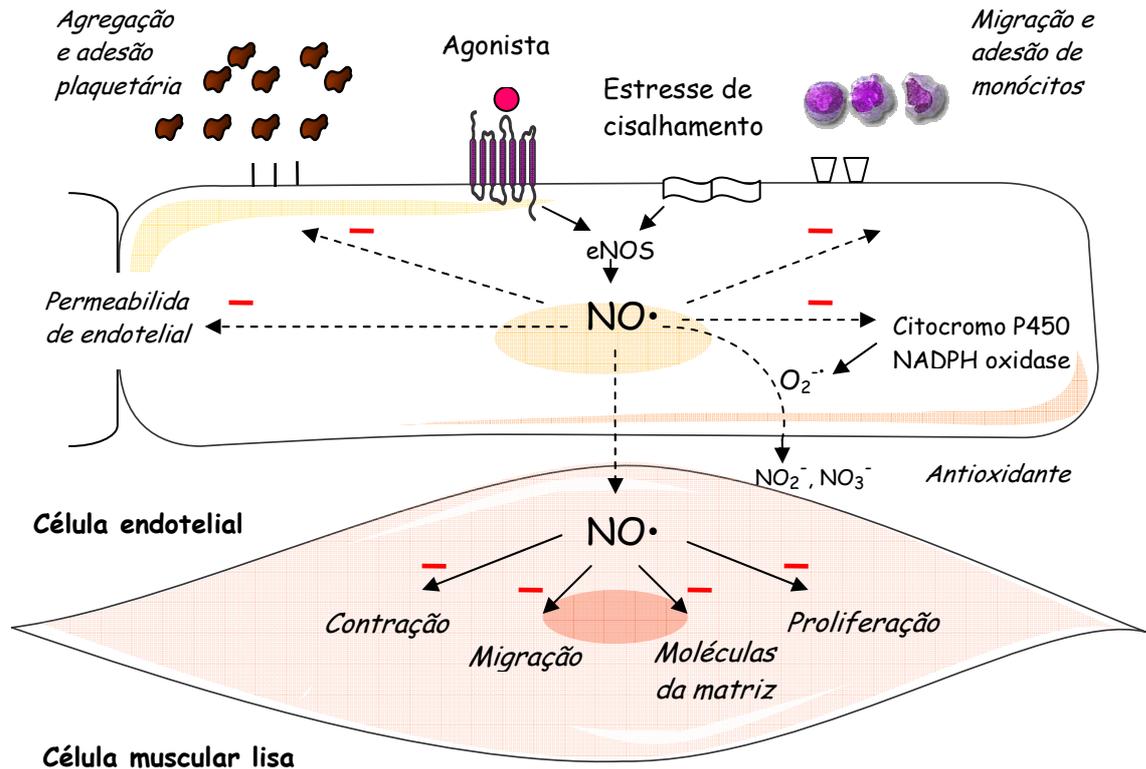
uma diminuição da ativação da eNOS (Hayashi *et al.*, 1999; Nakane *et al.*, 1991). Mais recentemente, foi demonstrado que o HDL (lipoproteína de alta densidade) é capaz de estimular a eNOS através da ativação da quinase Src, seguida pela PI3 quinase e subsequente ativação da proteína Akt, a qual é responsável pela fosforilação da eNOS na Ser1177 e sua ativação (Mineo *et al.*, 2003). A ativação da Src tem sido descrita por ser ativada ainda por fatores de crescimento, insulina e polifenóis vegetais. Adicionalmente, a via da Src é considerada sensível ao balanço redox intracelular (Ndiaye *et al.*, 2004) (Figura 10).



**Figura 10: Ativação da eNOS mediada pela ativação da Src e da via PI3K/Akt.** Diversos fatores de crescimento, a insulina, o HDL e os polifenóis são descritos por ativarem a Src (proteína tirosina quinase), a qual induz a conversão do fosfatidil inositol 4,5- difosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) pela fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K). O PIP<sub>3</sub> é necessário para a reação de fosforilação (P) da Ser473 da Akt pela quinase PDK-1. A Akt, por sua vez, fosforila a Ser1177 da eNOS e inicia a produção do NO. Vários estudos têm demonstrado que as ROS estão envolvidas na ativação da via Src – PI3K/Akt pelos polifenóis vegetais (Anselm *et al.*, 2007).

#### 1.2.3.4 Papel fisiológico do NO de origem endotelial

O NO de origem endotelial exerce localmente diversos efeitos (Figura 11). Ele pode se difundir para as camadas celulares adjacentes e inibir o tônus vascular, a migração e a proliferação de células musculares lisas, bem como a síntese de proteínas da matriz extracelular (Schini-Kerth, 1999). O NO pode também se difundir para o lúmen do vaso sanguíneo onde contribuirá na manutenção da fluidez sanguínea. O NO inibe a adesão das plaquetas sanguíneas e dos leucócitos às células endoteliais. Além disso, ele previne a agregação plaquetária e facilita a dissolução de agregados plaquetários. O NO exerce seu papel regulador da homeostase vascular unicamente na interface da superfície luminal das células endoteliais e do sangue, pois é rapidamente captado pela hemoglobina dos eritrócitos e é inativado pelos radicais livres, tais como o ânion superóxido. O NO pode igualmente afetar o sistema fibrinolítico, regulando a liberação do ativador do plasminogênio (t-PA) e de seu inibidor, o PAI-1, mas também inibir a expressão de diversos genes pro-ateroscleróticos como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e o fator tissular (Marumo *et al.*, 1999).



Adaptado de Schini-Kerth, 1999

**Figura 11: Múltiplos efeitos do NO endotelial.** A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular.

### 1.2.3.5 Via de sinalização envolvida no efeito vasodilatador do NO

Nos vasos, o mecanismo de síntese do NO inicia-se com a ligação de um agonista a um receptor específico localizado na membrana das células endoteliais. Esse estímulo provoca ativação da fosfolipase C (PLC), por intermédio de uma proteína G. A PLC, uma vez ativada, promove a hidrólise dos fosfolípidos fosfatidil-inositol-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) presentes na membrana celular, originando o inositol 1, 4, 5, trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG) (Griffith *et al.*, 1984). O IP<sub>3</sub> age nos estoques intracelulares de Ca<sup>+2</sup> induzindo a liberação deste íon, o qual, ligado à calmodulina, estimula a sintase

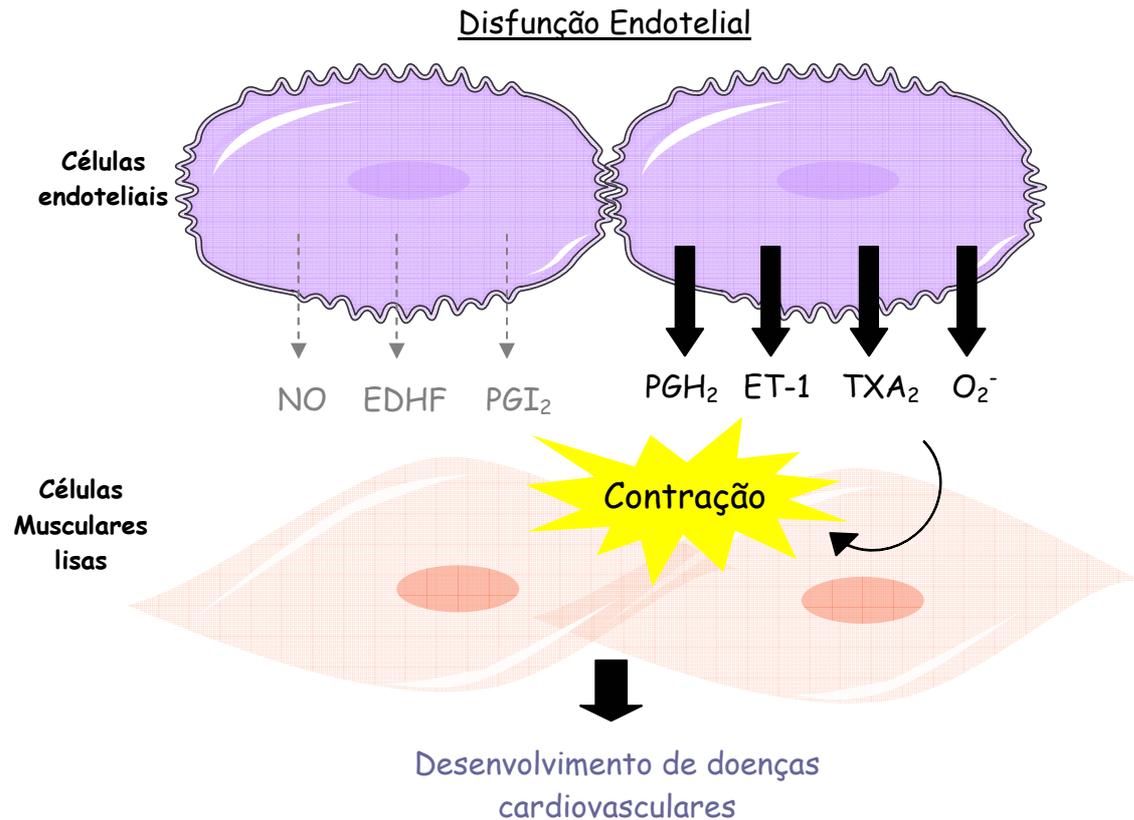
de óxido nítrico, dando início à síntese do NO (Moncada *et al.*, 1989). O DAG induz a estimulação da proteína quinase C (PKC), que pode fosforilar a NOS das células endoteliais, causando uma forte diminuição na sua atividade catalítica e na produção de NO (Bredt *et al.*, 1992), podendo funcionar como um mecanismo regulatório da função da eNOS. Isto pode explicar a inibição do relaxamento vascular pela histamina em artéria pulmonar de cobaias após a ativação da PKC pelo éster de forbol (ativador direto da PKC) (Weinheimer *et al.*, 1986).

O NO, após sintetizado, difunde-se para a camada muscular lisa do vaso causando a estimulação da guanilil ciclase solúvel ou citosólica (GCs), provavelmente por se ligar ao grupo heme dessa enzima (Stone & Marletta, 1995). A ativação da GCs gera um aumento da concentração citosólica do GMPc (Ignarro *et al.*, 1987). Este nucleotídeo ativa a proteína quinase G (PKG) que, dentre outras funções, parece fosforilar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) tornando-a inativa e provocando um relaxamento (Rapoport *et al.*, 1983; Rapoport & Murad, 1983). Uma segunda via de ação da PKG é a ativação de canais de  $K^+$ , ocasionando hiperpolarização e conseqüente relaxamento vascular (Archer *et al.*, 1994). A exemplo da acetilcolina, diversos agonistas provocam vasodilatação através da ativação da via L-arginina-óxido nítrico. Dentre eles estão a histamina (Van de Voorde & Leusen, 1983), a serotonina (Cohen *et al.*, 1983), a bradicinina e a substância P (Furchgott, 1983).

## **1.2.4 Disfunção endotelial**

### **1.2.4.1 Considerações gerais**

O endotélio desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase vascular e do tônus vascular através da produção e secreção dos mediadores descritos anteriormente. Na maioria das patologias vasculares, este equilíbrio é rompido e ocorre uma atenuação da função vasodilatadora do endotélio devido à redução da síntese e liberação do NO, da PGI<sub>2</sub> e do EDHF. Esta é a principal característica da disfunção endotelial (Figura 12). A disfunção endotelial é considerada um denominador comum de todas as patologias cardiovasculares, tais como a hipertensão arterial, hipercolesterolemia (John e Schmieder, 2000), a aterosclerose, a insuficiência cardíaca (Busse e Fleming, 1996; Davignon e Ganz, 2004) e as doenças isquêmicas (John e Schmieder, 2000). A disfunção endotelial é também associada aos fatores de risco que predis põem às patologias cardiovasculares, tais como o tabagismo (Hutchison, 1998), o diabetes (Angulo *et al.*, 2003) e o envelhecimento (Andrawis *et al.*, 2000). A etiologia exata deste processo não é clara, embora sabe-se da participação efetiva do estresse oxidativo como um dos eventos desencadeadores.



**Figura 12: A disfunção endotelial.** Alteração considerada precursora das doenças cardiovasculares e caracterizada pela redução da liberação dos mediadores vasodilatadores. Flechas pontilhadas = diminuição da secreção; flechas espessas = aumento da secreção.

Experimentalmente, a função endotelial pode ser avaliada por meio das respostas vasorrelaxantes induzidas por agonistas que estimulam receptores endoteliais, como a acetilcolina (o carbacol ou a metacolina) ou a bradicinina. Esses estudos são realizados *ex vivo*, sobre artérias de animais (em certos casos sobre artérias de origem humana) e servem como modelo para as patologias humanas. A função endotelial pode ser avaliada *in vivo* nos humanos após a injeção de acetilcolina ou metacolina na artéria braquial. Qualquer que seja o modelo, o efeito de um doador de NO (nitroprussiato de sódio ou o trinitrato) deve ser estudado em paralelo, a fim de avaliar a resposta da musculatura lisa ao NO exógeno.

Nestes modelos, a análise dos mecanismos envolvidos na disfunção endotelial permitem colocar em evidência de um lado o papel da redução da biodisponibilidade do NO endotelial (por deficiência da produção devido alterações na expressão e da atividade da eNOS, alterações de interação NOS/caveolina, alterações da via GMPc, ou ainda a redução do NO devido ao aumento da sua degradação) e de outra parte o papel do estresse oxidante nestas alterações (para revisão, ver Maxwell, 2002).

#### **1.2.4.2 Participação das espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS) na disfunção endotelial**

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são constituídas principalmente pelos radicais livres oxigenados, cuja produção encontra-se aumentada durante o estresse oxidativo. Os principais radicais livres oxigenados são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ). Outras ROS, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), o dióxido de nitrogênio ( $N_2O$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) não são considerados *per se* como radicais livres, mas eles têm poder oxidante e contribuem assim para o estresse oxidativo. Em uma condição normal, o ânion superóxido se forma de maneira contínua na cadeia respiratória mitocondrial, como resíduo da redução imperfeita do oxigênio. Ele surge também durante o funcionamento de certas enzimas tais como as monoamino oxidases e as prostaglandinas sintases em concentrações que normalmente deveriam ser reduzidas pelas enzimas superóxido dismutases (SOD) (Ducrocq *et al.*, 2001). As SOD dismutam o ânion superóxido em  $H_2O_2$ , o qual pode ser degradado em  $H_2O$  pelo sistema da glutathiona ou pela enzima catalase. Pode ainda originar o  $OH^\bullet$  através da reação de Fenton em presença do ferro.

Em certas condições patológicas, além da cadeia respiratória mitocondrial, das enzimas da via do ácido araquidônico (lipoxigenase e cicloxigenase) e da xantina oxidase, duas fontes particularmente importantes de ROS tem sido bem estudadas no sistema cardiovascular. São elas a NADPH oxidase e a NOS desacoplada (Cai e Harrison, 2000). Vários estudos demonstram que a NADPH oxidase é uma importante fonte de ânion superóxido em vasos humanos e animais com patologias vasculares (Griendling *et al.*, 2000). Além disso, o nível de produção de ânions superóxido pela NADPH oxidase determina a severidade da disfunção endotelial e pode permitir caracterizar experimentalmente e clinicamente o perfil do risco cardiovascular (Guzik *et al.*, 2000).

Paradoxalmente, uma fonte potencial de espécies reativas de oxigênio é a própria eNOS, quando funciona na forma “desacoplada”. Estudos realizados com enzimas purificadas ou recombinantes demonstraram que a eNOS (assim como a iNOS e nNOS) é capaz de gerar ânions superóxido nas situações de déficit de substrato, a L-arginina, ou de cofatores de ativação, em particular a tetrahydrobiopterina (BH4). Inversamente, a suplementação do BH4 aumenta a produção do NO e diminui a liberação dos ânions superóxido (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1998). Quando a eNOS funciona de modo alternado desacoplado/acoplado, as alterações simultâneas na produção local de ânions superóxido e de NO podem conduzir à uma produção significativa de outra espécie reativa de oxigênio, o peroxinitrito. Este, independente das fontes enzimáticas envolvidas na sua produção (NADPH oxidase e/ou NOS), também contribui para a disfunção endotelial (Kawashima e Yokoyama, 2004).

A produção celular de ROS pode gerar a formação de várias outras através de reações em cascata. Por exemplo, a reação desses radicais com os ácidos graxos poliinsaturados pode formar os radicais peróxidos (R-COO) que, por ataque radicalar

dos ácidos graxos adjacentes, ocasiona a peroxidação lipídica, cujo acúmulo nas células acarreta muitas consequências citotóxicas (Cai e Harrison, 2000).

Através de modelos experimentais de detecção de ROS, como técnicas de imunofluorescência, é possível determinar a localização de ROS na parede vascular nos modelos patológicos. Muitos estudos demonstram a presença de ROS em todos os tipos celulares nos vasos, em particular nos fibroblastos da camada adventícia, células musculares lisas e endoteliais (Munzel *et al.*, 2002). A localização vascular destas espécies reativas depende da natureza do estímulo e da patologia associada (Wolin *et al.*, 2002). De fato, uma produção importante de ROS foi observada no endotélio vascular em modelos animais de diabetes, mas também em pacientes diabéticos (Hink *et al.*, 2001; Guzik *et al.*, 2002), também em modelos de hipertensão arterial, como o “DOCA-salt” (Cai e Harrison, 2000), e modelos de infusão contínua de angiotensina II, nos quais os fibroblastos da adventícia foram considerados como uma fonte importante de ROS (Wang *et al.*, 1998). Uma produção aguda de ROS pelas células musculares lisas foi relatada nos modelos de aterosclerose em coelho (Miller *et al.*, 1998). Estas diferenças de localização da produção de ROS podem refletir a heterogeneidade das fontes enzimáticas envolvidas.

Em discordância com a idéia convencional de que as ROS agem principalmente nos processos patológicos induzindo danos a estruturas biológicas, em baixas concentrações, as ROS têm sido relacionadas à regulação fisiológica de vários mecanismos moleculares, inclusive nas células endoteliais (Ndiaye *et al.*, 2004; Anselm *et al.*, 2007).

### 1.2.5 Opções farmacológicas para o aumento da biodisponibilidade do NO

Na clínica humana, numerosos recursos farmacológicos são utilizados com a finalidade de restaurar a função endotelial (Bell *et al.*, 1998; Abeywardena e Head, 2001; Adamopoulos *et al.*, 2002) e incluem a administração de moléculas doadoras de NO (como o nitroprussiato de sódio e a nitroglicerina) (Ignarro *et al.*, 2002), da L-arginina (Andrasi *et al.*, 2003; Ahlers *et al.*, 2004), de hipocolesterolemiantes, ácido fólico ou de agentes antioxidantes como as vitaminas C e E, suplementação de BH<sub>4</sub> e polifenóis (Fang *et al.*, 2002; Hornig, 2002;).

Dentre estes recursos, o mais utilizado ao longo do tempo, mesmo antes do NO ser identificado, foram os doadores do NO (exemplos: o nitroprussiato de sódio, isossorbida, nitroglicerina, SIN-1). O termo “doador de NO” se refere a compostos de diferentes famílias químicas que liberam o NO ativo, seja diretamente ou após metabolismo enzimático (Ignarro *et al.*, 2002). Muitos estudos experimentais e clínicos demonstraram a importância dos efeitos biológicos induzidos por estes compostos, justificando a sua utilização ainda hoje para restaurar os efeitos cardiovasculares do NO (Megson e Webb, 2002). Porém, após utilização prolongada de alguns doadores de NO (nitratos orgânicos), os efeitos podem ser limitados pelo fenômeno de tolerância. Os mecanismos sugeridos para explicar a tolerância são complexos e parecem envolver respostas locais nos vasos, como alterações na via NO/GMPc e aumento do estresse oxidativo (De Garavilla *et al.*, 1996), além de alterações sistêmicas de origem neuro-humoral, todas capazes de se contraporem aos efeitos hemodinâmicos dos doadores de NO (Parker *et al.*, 1991).

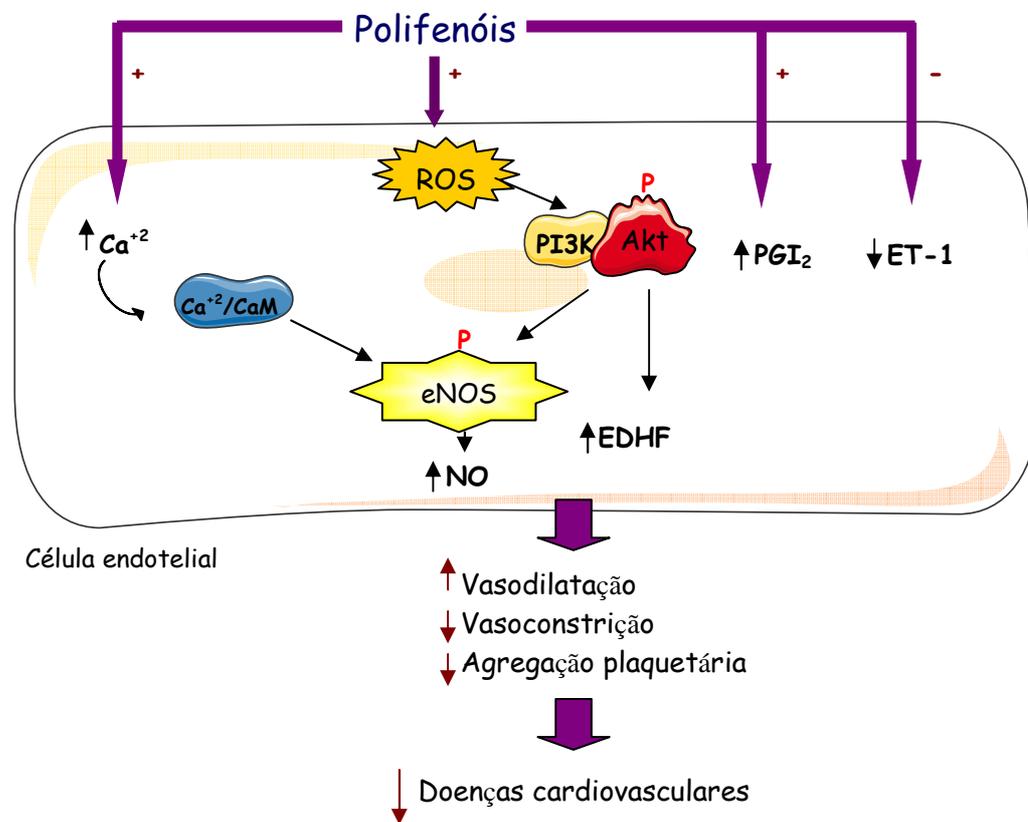
### 1.2.6 Importância dos compostos polifenólicos

Os polifenóis são fitomicronutrientes sintetizados pelos vegetais particularmente abundantes nas frutas e legumes. Muitos estudos favorecem o impacto positivo do seu consumo sobre a saúde, pois podem prevenir numerosas doenças degenerativas (German e Walzem, 2000; Yang e Wang, 1993; Ahmad e Mukhtar, 1999; Lambert e Yang, 2003). Quanto à natureza química, a classe dos polifenóis compreende mais de 8000 compostos: flavonóides, taninos (estes são produtos da polimerização dos flavonóides) e as lignanas ou fitoestrógenos. Mais da metade dos polifenóis é composta por flavonóides, cujos efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular, e também suas propriedades anticancerígenas, antivirais e antialérgicas são vastamente relatadas na literatura científica (Pasten *et al.*, 2007). Atualmente, o encorajamento ao consumo de uma alimentação “natural” contendo vegetais tem sido uma das principais recomendações de saúde pública no mundo inteiro.

Portanto, os compostos polifenólicos despontam como opções promissoras e têm despertado interesse crescente por serem capazes de desempenhar muitas atividades benéficas no sistema cardiovascular (Mehendale *et al.*, 2006; Yamada, 2007). Estudos epidemiológicos têm indicado que uma alimentação rica em polifenóis está associada à redução do risco de doenças cardiovasculares (Yamada, 2007; Morila-Ruiz *et al.*, 2006). Os seus efeitos protetores são relacionados às propriedades antioxidantes dos polifenóis, as quais permitem o aumento da biodisponibilidade do NO endotelial e impede sua degradação pelas espécies reativas de oxigênio (Orallo *et al.*, 2002; Ndiaye *et al.*, 2003).

Além do efeito indireto na preservação do NO, os polifenóis também são descritos por ativar diretamente diferentes vias de sinalização responsáveis pela produção e liberação do NO das células endoteliais (Figura 13). Dentre estas,

encontra-se a via mediada pela ativação da PI3K/Akt (Ndiaye *et al.*, 2005). Nesta via, os polifenóis induzem uma resposta pró-oxidante intracelular que culmina na ativação da proteína Akt, a qual estimula a eNOS (Ndiaye *et al.*, 2003). Outros efeitos ocasionados pelos polifenóis nas células endoteliais são a ativação da via do EDHF, também mediada pelas ROS e Akt (Ndiaye *et al.*, 2003), aumento da produção da PGI<sub>2</sub> (Aldini *et al.*, 2003) e redução da produção da ET-1 (Khan *et al.*, 2002). Além disso, os polifenóis podem aumentar a expressão da eNOS (Wallerath *et al.*, 2002).



Adaptado de Anselm, 2008

**Figura 13: Efeitos dos polifenóis vegetais na função endotelial.** Os polifenóis ativam as vias de sinalização intracelular que levam ao aumento da produção do NO, do EDHF e da PGI<sub>2</sub> e inibem a via de produção do contracturante endotelina (ET-1). Esses efeitos contribuem para a prevenção de doenças cardiovasculares

Neste contexto, temos investigado continuamente os efeitos de produtos naturais especialmente sobre os vasos (Rattmann *et al.*, 2005; Rattmann *et al.*, 2006; Rattmann *et al.*, 2008). Dentre as plantas estudadas, as mais efetivas apresentaram atividade dependente do NO, a qual foi diretamente relacionada à existência de flavonóides e numerosos outros polifenóis nos extratos. Um exemplo recente é o extrato hidroalcoólico padronizado das folhas da planta *Dicksonia sellowiana*, o qual apresentou efeito vasodilatador mais potente quando comparado aos outros extratos, frações e compostos isolados já estudados no laboratório.

### **1.2.7 *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook**

A *D. sellowiana* (Figura 14) é uma planta pteridófita pertencente à família Dicksoniaceae e conhecida popularmente como xaxim ou samambaiçu. É uma espécie muito primitiva, cujos registros fósseis sugerem sua origem nos períodos jurássico e cretáceo. Apresenta-se amplamente distribuída nos países da América Central e da América do Sul, especialmente no México, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai, Uruguai e na floresta Atlântica remanescente do Brasil (Sehnem, 1978; Tryon e Tryon, 1982).



**Figura 14:** *Dicksonia sellowiana* (Exemplares do Jardim Botânico de Curitiba – PR).

Durante muitos anos, o tronco da *D. sellowiana* foi comercializado como matéria prima para a confecção de vasos, estacas, placas e substratos para plantas ornamentais (Mielke, 2002). O extrativismo intenso desta planta levou à sua inclusão no Apêndice II da CITES (MMA, 1998), uma lista oficial de espécies sob risco de extinção no Brasil.

As partes aéreas da *D. sellowiana* são usadas entre as populações indígenas principalmente para tratar doenças de pele, doenças parasitárias e asma (Marquesini, 1995). Em relação ao sistema cardiovascular, Pio Corrêa (1984) descreve o uso da *D. sellowiana* como hemostático e Hort *et al* (2006) relata o uso popular e a ação vasodilatadora de uma outra espécie de xaxim, a *Cyathea phalerata* Mart (*Cyathea*). Atualmente um fitoterápico patenteado obtido das folhas de *D. sellowiana* (o mesmo extrato padronizado utilizado neste trabalho) tem sido testado em voluntários para tratar asma, entretanto tem se mostrado benéfico em várias outras doenças crônicas, inclusive algumas do sistema cardiovascular, por exemplo a hipertensão arterial.

A *D. sellowiana*, assim como outras espécies de *Dicksonia*, tem sido raramente mencionada na literatura científica em relação às suas atividades biológicas. Recentemente, Bora e colaboradores (2005) demonstraram a presença de compostos polifenólicos em concentrações elevadas no extrato e nas frações obtidas a partir da *D. sellowiana* e ainda relatam que o extrato possui uma atividade antioxidante diretamente relacionada à concentração de compostos polifenólicos encontrada nas suas frações.

Em nosso estudo, vários compostos fenólicos foram identificados através de HPLC-DAD no extrato hidroalcoólico da *D. sellowiana*. São eles os ácidos gálico, protocatecúico, clorogênico, cumárico, ferúlico, sinápico e cinâmico, bem como outros compostos em fase de identificação e purificação. A existência destes compostos corrobora com os efeitos antioxidantes.

A importância atribuída aos compostos polifenólicos no que concerne aos efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares, aliada à descrição de grandes quantidades destes componentes nas partes aéreas da *Dicksonia sellowiana* nos incentivou a investigar os efeitos do extrato hidroalcoólico padronizado das folhas da *Dicksonia sellowiana* (proveniente de um plantio sustentável) sobre o sistema cardiovascular (vasos de condutância, resistência e cultura de células endoteliais), assim como verificar sua capacidade antioxidante.

## II OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico padronizado da *Dicksonia sellowiana* (EHDS) em artéria de condutância (aorta de rato) **(A)**, seus efeitos antioxidante *in vitro* e *in vivo* **(B)**, e ainda os efeitos do EHDS em vaso de resistência (artéria coronária de porco) e células endoteliais **(C)**.

### 2.2 Objetivos específicos

#### **A – Efeitos da *Dicksonia sellowiana* em vaso de condutância:**

- Caracterizar o relaxamento vascular induzido pelo EHDS e frações;
- Investigar o envolvimento das vias endoteliais do NO/GMPc e da via PGI<sub>2</sub>/AMPc na obtenção do efeito vascular;
- Investigar a participação dos canais de potássio na vasodilatação;
- Verificar a ativação dos receptores endoteliais muscarínico (M<sub>3</sub>) e histaminérgico (H<sub>1</sub>);
- Verificar se a via de sinalização identificada *in vitro* resulta num efeito hipotensor do EHDS *in vivo* em ratos anestesiados.

**B – Efeitos antioxidantes da *Dicksonia sellowiana* *in vitro* e *in vivo*:**

- Verificar a ação antioxidante do EHDS contra os radicais DPPH (2,2-Difenil-2-picril hidrazil, espécie reativa sintética), o  $O_2^-$  (ânion superóxido),  $\cdot OH$  (radical hidroxila) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em sistemas reacionais *in vitro*;
- Investigar os efeitos do EHDS contra o estresse oxidativo induzido pelo  $H_2O_2$  em cultura de células endoteliais de aorta de coelho;
- Determinar os efeitos *in vivo* do EHDS sobre a atividade da enzima catalase e sobre a peroxidação lipídica.

**C- Efeitos da *Dicksonia sellowiana* em artéria coronária de porco (vaso de resistência) e em cultura de células endoteliais:**

- Caracterizar o relaxamento vascular induzido pelo EHDS e pelos compostos fenólicos identificados neste extrato padronizado;
- Verificar a participação das vias endoteliais do NO, da  $PGI_2$  e do EDHF no efeito vasorrelaxante;
- Investigar a participação da calmodulina e da quinase II dependente da calmodulina (CaMKII), no efeito vasorrelaxante induzido pelo EHDS;
- Verificar a participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e da via Src quinase e PI3K/Akt no relaxamento induzido pelo EHDS;
- Investigar o sítio de fosforilação da eNOS responsável pela ativação desta enzima em resposta ao EHDS;
- Avaliar os efeitos do EHDS sobre as respostas contráteis induzidas pelo U46619 em artérias coronárias.

### III MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Botânico

As folhas de *Dicksonia sellowiana* foram coletadas na região metropolitana de Curitiba e identificadas pelo Professor Dr. Gert Hatschbach do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Exemplares desta espécie estão depositados no herbário do mesmo departamento sob número 46579.

#### 3.2 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico das folhas de *Dicksonia sellowiana*

O extrato hidroalcoólico das folhas de *D. sellowiana* (e as frações investigadas neste estudo) foi produzido pela *Humanus Biobotânica Indústria e Comércio LTDA* e fornecida pela *Natureza Pura Laboratório de Pesquisas Científicas LTDA* (lote 0236/5). No procedimento inicial da preparação do extrato foram utilizados 100 gramas das folhas secas e moídas da *D. sellowiana*, as quais foram submetidas ao processo de extração por maceração em um aparelho de Soxhlet modificado, no qual foram adicionados 2 L de etanol a 85% durante 3 horas. O extrato bruto foi concentrado e submetido ao processo de *spray drier* (para liofilização e estabilização). O cálculo do rendimento correspondeu a 0,0341 g/mL. A concentração de compostos polifenólicos totais foi determinada através do método de Folin Ciocalteu e correspondeu a 494,2 mg/g em equivalência ao ácido gálico (Bora *et al.*, 2005).

A padronização de espécies vegetais e de seus insumos é uma das condições previstas na Resolução n.º 17 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para o registro de Medicamentos Fitoterápicos (Secretaria de Vigilância Sanitária), uma vez validado o seu uso tradicional. A padronização de insumos por cromatografia necessita

o uso de marcadores que podem ser substâncias isoladas ou identificadas a partir de extratos do vegetal em questão. Portanto, a qualidade e manutenção do padrão de obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas da *Dicksonia sellowiana* é realizado pela determinação da concentração do ácido protocatecúico em sua composição, a qual corresponde a 8,7%.

No processo de fracionamento, pesou-se 50 g de extrato bruto processado por *spray drier* e este foi diluído em 30 mL de etanol. Esta solução foi diluída lentamente com 120 mL de água destilada, determinando uma solução de 0,334 g/mL. A solução foi submetida ao fracionamento em Soxhlet, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, respectivamente. Em seguida as frações foram levadas à secura.

Para identificar os compostos fenólicos existentes no extrato hidroalcoólico padronizado da *D. sellowiana* (EHDS), amostras foram submetidas à análise por HPLC-DAD (*Diode Array Detection*). Brevemente, a análise foi realizada em um aparelho Merck-Hitachi (Alemanha) composto por bomba 1.7100, Solvent Degasser 1.7812, Diode Array Detection L7450, Interface L7000 e uma válvula injetora manual (modelo 7725i) com capacidade para 20 µL de amostra. A separação cromatográfica foi realizada à temperatura ambiente usando coluna analítica ODS (RP-18, 5µm, 250 mm x 4,0 mm ID) a 25°C, fornecida pela Merck (Alemanha). A detecção foi feita em comprimentos de onda entre 210 a 420 nm. A análise foi realizada em quintuplicata. A identificação dos componentes de cada amostra de solução foi realizada por comparação com o tempo de retenção relativo das soluções padrão injetadas nas mesmas condições no HPLC-DAD.

A análise por HPLC-DAD revelou a presença de sete compostos fenólicos principais no EHDS (Figuras 15 A e B). Os compostos, seus tempos de retenção e as porcentagens estimadas encontram-se a seguir na Tabela 3.

De acordo com esta análise, o composto fenólico identificado em maior quantidade é o ácido cumárico (pico em 23,33 minutos). Foram ainda detectados outros compostos, os quais estão em fase de identificação.

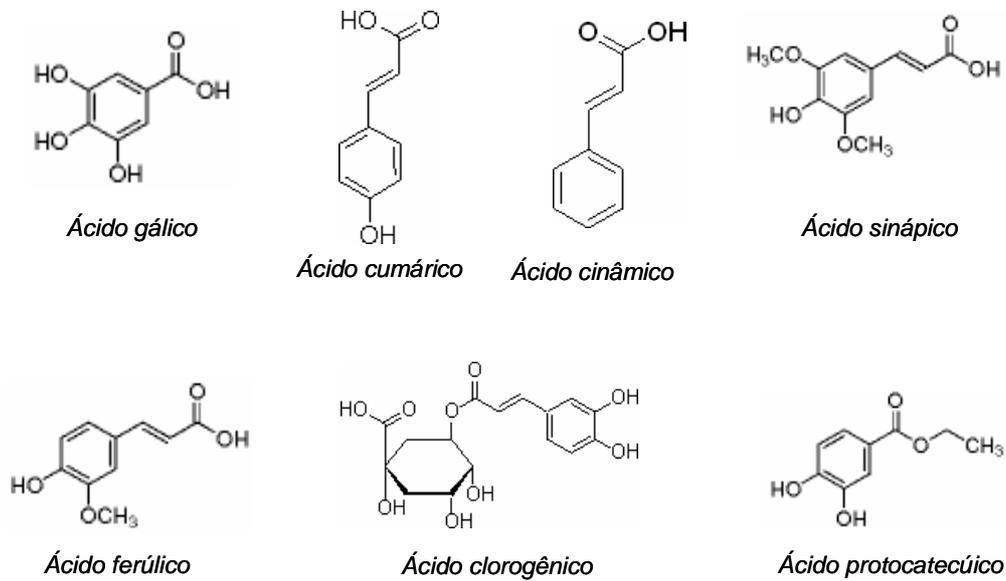


Figura 15 A: Estruturas químicas dos compostos fenólicos majoritários identificados no extrato hidroalcoólico da *Dicksonia sellowiana* (EHDS)

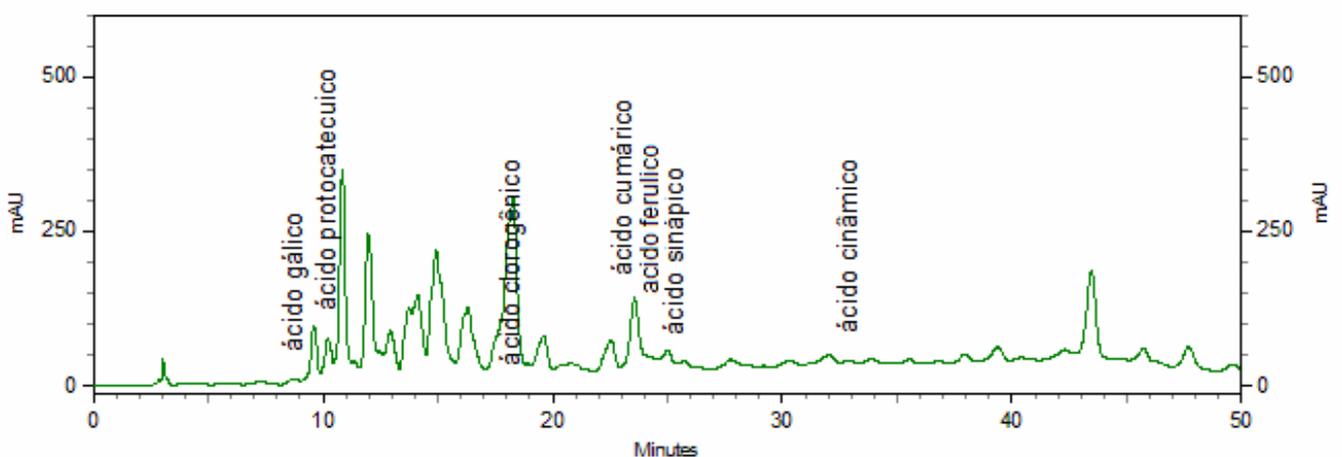


Figura 15 B: Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico da *Dicksonia sellowiana* (EHDS) em HPLC-DAD.

**Tabela 3. Compostos identificados por HPLC-DAD no EHDS, seus tempos de retenção e porcentagens estimadas no extrato**

Compostos	Tempos de retenção	Porcentagens estimadas
Ácido gálico	8,82	(6,3%)
Ácido protocatecúico	10,84	(8,7%)
Ácido clorogênico	17,81	(17,1%)
Ácido cumárico	23,33	(28,0%)
Ácido ferúlico	24,67	(12,9%)
Ácido sinápico	25,29	(8,45%)
Ácido cinâmico	32,57	(18,3%)

### 3.3 Protocolos experimentais

Para facilitar a descrição, os três estudos realizados nesta tese serão abordados separadamente neste item. Inicialmente serão descritos os experimentos em **(1)** artéria de condutância (aorta) de rato, com a respectiva confirmação *in vivo* dos efeitos observados, seguido pelo **(2)** estudo da capacidade antioxidante da *D. sellowiana* e pelos **(3)** estudos realizados em vaso de resistência (artéria coronária de porco) e em cultura primária de suas células endoteliais.

### 3.4 Efeitos da *Dicksonia sellowiana* em vaso de condutância: experimentos em aorta isolada de rato e confirmação do efeito *in vivo*

#### 3.4.1 Drogas

Fenilefrina, acetilcolina, indometacina, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), KT 5720 (9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-hidroxi-9-metil -1 -oxo-9,12- epoxi-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pirrolo[3,4-i][1,6] benzodiazocina - 10- ácido carboxílico

hexil éster), ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-alfa]quinoxalin-1-ona), atropina, pirilamina, tetraetilamônio, glibenclamida, 4-aminopiridina, apamina e caribdotoxina (todos Sigma Chemical; EUA). Os sais foram solubilizados em água destilada e as diluições das drogas, a partir das soluções estoques, foram preparadas com líquido nutritivo de Krebs-Henseleit. A solução estoque da KT 5720 foi dissolvida em metanol, a indometacina em bicarbonato de sódio (0,5%) e a glibenclamida em dimetil sulfóxido (DMSO).

### **3.4.2 Animais**

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar albinos, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, todos machos e adultos (3 a 4 meses), pesando entre 180 e 250 g, mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas), e com livre acesso à água e ração (Nuvital®, Brazil) até o momento do experimento. Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de ética de Experimentação Animal da UFPR sob o número 287.

### **3.4.3 Procedimento para isolamento da aorta torácica de rato**

Os ratos foram mortos por deslocamento cervical e, imediatamente após, a aorta torácica foi cuidadosamente retirada e colocada em um recipiente (placa de Petri) contendo solução nutritiva previamente aquecida. Após remoção do tecido conectivo, o vaso foi seccionado em anéis medindo aproximadamente 4 mm de comprimento. Estes anéis foram acondicionados, por meio de hastes, em cubas de vidro contendo 3 mL de solução nutritiva de Krebs-Henseleit, sob temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$ , aerada com

solução carbogênica, 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Uma das extremidades da haste foi conectada a um transdutor de força que, acoplado a um sistema computadorizado, permitiu o registro de contrações isométricas. Em seguida, os anéis de aorta foram submetidos a uma tensão basal de 1 g durante 60 minutos, período reservado para a estabilização da preparação antes do início dos protocolos experimentais (o tempo de 60 minutos também foi respeitado nos intervalos entre as curvas). Neste período, o líquido nutritivo foi renovado a cada 15 minutos. Ao término do período de estabilização, foi adicionado fenilefrina (agonista seletivo de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos; 1  $\mu$ M) para induzir uma contração sustentada, sobre a qual foi adicionada a acetilcolina (agonista muscarínico; 1  $\mu$ M) para confirmar a presença ou ausência de endotélio nas preparações estudadas. Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento induzido pela acetilcolina foi igual ou superior a 90% da contração. Para a execução dos protocolos experimentais em artérias sem endotélio vascular, esta camada foi removida mecanicamente por meio da fricção de uma cânula metálica no lúmen da artéria.

A solução nutritiva de Krebs-Henseleit utilizado nestes experimentos apresentava a seguinte composição (concentrações em mM): NaCl (133), KCl (5,0), CaCl<sub>2</sub> (2,5), MgSO<sub>4</sub> (1,3) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), NaHCO<sub>3</sub> (20) e Glicose (10). Foi adicionado ácido acético (10%) suficiente para ajuste do pH da solução em torno de 7,4.

#### **3.4.4 Avaliação dos efeitos vasculares do EHDS e investigação dos mecanismos envolvidos**

A avaliação da capacidade do EHDS em causar relaxamento vascular foi realizada em anéis de aorta de rato com e sem endotélio vascular, previamente contraído com fenilefrina (1  $\mu$ M). Durante a contração tônica induzida pela fenilefrina,

os vasos foram expostos a concentrações cumulativas crescentes de EHDS (3, 5, 10, 30 e 50 µg/mL). Em grupos experimentais adicionais (usando somente anéis com endotélio íntegro), o procedimento de adição do extrato foi realizado na presença de diferentes inibidores incubados durante 15 minutos, antes do início da exposição ao EHDS, e na presença deste. Os inibidores utilizados foram o L-NAME (10 µM; um inibidor não seletivo das NOS), ODQ (10 µM; um inibidor da guanilil ciclase), indometacina (10 µM; um inibidor da ciclooxigenase), KT 5720 (1 µM; um inibidor seletivo da proteína quinase A, PKA), tetraetilamônio (TEA, 10 mM; um inibidor não seletivo dos canais de K<sup>+</sup>), glibenclamida (GLB, 10 µM; um bloqueador de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP), a 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM; bloqueador de canais de K<sup>+</sup> sensíveis a voltagem), apamina (0,1 µM; bloqueador de canais de K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup> de baixa condutância), caribdotoxina (0,1 µM; bloqueador de canais de K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup> de alta e intermediária condutância), atropina (1 µM e 10 µM; antagonista de receptores muscarínicos), ou pirilamina (10 µM; antagonista de receptores H1 histaminérgicos). Por fim, para verificar qualquer efeito residual não reversível produzido pelo EHDS na contração e no relaxamento da aorta, os anéis foram lavados com solução nutritiva e, após um intervalo de 60 minutos, induziu-se uma nova contração por fenilefrina (1 µM) e repetiu-se a adição da acetilcolina (1 µM) na fase sustentada desta contração.

Após estes experimentos, as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e etanólica, obtidas a partir do EHDS, foram testadas em anéis de aorta com endotélio vascular, contraídos com fenilefrina (1 µM). As concentrações utilizadas foram 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL, para todas as frações.

### **3.4.5 Avaliação dos efeitos do EHDS na pressão arterial de ratos anestesiados**

Neste procedimento, os ratos Wistar foram inicialmente anestesiados com uma mistura de quetamina/xilazina (100/20 mg/Kg, i.m.) para a cirurgia de introdução de um cateter heparinizado de polietileno (PE 50) na veia femoral, através do qual foram injetadas as drogas em estudo, e de um segundo cateter, o qual foi inserido na artéria carótida e conectado a um transdutor de pressão arterial acoplado a um sistema PowerLab para permitir o registro das alterações na pressão arterial média (PAM). Uma cânula foi introduzida na traquéia para facilitar a respiração espontânea dos animais durante os experimentos. Após a cirurgia, um intervalo de 20 minutos foi respeitado para a estabilização da PAM antes da administração de qualquer substância.

O primeiro protocolo experimental consistiu na administração i.v. da salina isotônica (0,1 mL; grupo controle) ou do EHDS (dissolvido em salina) nas doses de 10, 20 e 40 mg/Kg. Cada dose subsequente do EHDS foi administrada 20 min após a injeção precedente. Este intervalo foi suficiente para garantir o retorno da PAM aos níveis basais após cada injeção. Este mesmo procedimento foi repetido em grupos de animais previamente tratados com pirilamina (antagonista de receptores H1 da histamina; 15 mg/Kg, i.v.) ou atropina (antagonista de receptores muscarínicos; 2 mg/Kg, i.v.), 15 minutos antes da administração do EHDS. Nestes experimentos, os agonistas histamina (10 nmol/Kg, i.v.) e acetilcolina (30 nmol/Kg, i.v.) foram utilizados como controles positivos para verificar a eficácia da pirilamina e da atropina, respectivamente. A hipotensão causada pelos agonistas e pelo extrato foram quantificadas diretamente no registro experimental, obtendo-se os valores da PAM basal (antes da adição dos agonistas e do extrato) em relação ao valor correspondente à queda da PAM após a adição dos mesmos. A diferença entre estes valores (o  $\Delta$ ) foi

usada na confecção dos gráficos. Na sequência, os efeitos do EHDS sobre a pressão arterial média antes e depois do tratamento com a atropina e a pirilamina foram, portanto, comparados.

### **3.4.6 Equipamentos de registro**

Todos os experimentos foram registrados por meio de um sistema composto por transdutores de força isométricos (modelos TRI 210 da Letica Scientific Instruments e F 1202 da CB Sciences, EUA) e de transdutores de pressão (MLT0380/D, ADInstruments, Austrália) acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, Austrália), conectados a um computador Apple contendo um software específico de integração (Chart v3.6.8, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, EUA).

## **3.5 Efeitos antioxidantes da *Dicksonia sellowiana* *in vitro* e *in vivo***

Visto que o EHDS induz relaxamento vascular mediado pelo NO, nesta etapa buscou-se investigar se as mesmas concentrações e doses dos polifenóis da *D. sellowiana* utilizadas no bloco anterior de experimentos apresentam uma ação antioxidante significativa, a qual pode contribuir, ao menos em parte, para os seus efeitos vasculares benéficos.

### **3.5.1 Drogas e reagentes**

Ácido ascórbico, 2,2-Difenil-2-picril hidrazil (DPPH), cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT), dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADH), metassulfato de fenazina (PMS), 2-desoxi-D-ribose, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido

tiobarbitúrico (TBA), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), cloreto férrico ( $FeCl_3$ ), manitol, 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), rutina, albumina sérica bovina, e catalase de eritrócitos humanos, todos da Sigma (St. Louis, MO, USA). 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) obtido da Molecular Probes (Eugene, USA). Duodecil sulfato de sódio (SDS) e kit de Bradford para quantificação de proteínas obtido da Bio-Rad Laboratories (Califórnia - USA). Todo o material utilizado nos experimentos que envolvem cultura celular foi adquirido da Cultilab (Campinas, Brazil).

### **3.5.2 Animais**

Foram usados ratos wistar machos adultos (270 – 300 g), mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, livre acesso à água e alimentação. Todos os protocolos experimentais foram planejados visando envolver um número mínimo de animais. Os procedimentos adotados foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria (onde os experimentos *in vivo* desta fase da pesquisa foram realizados).

### **3.5.3 Cultura celular**

Em um dos protocolos experimentais foram utilizadas células endoteliais imortalizadas de aorta de coelho (RAEC) (Buonassisi and Venter, 1976), as quais foram mantidas em incubadora com atmosfera umedecida, 5%  $CO_2$ / 90 % ar, a 37 °C. O meio de cultura foi o F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 20 mM de HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano-ácido sulfônico) e antibiótico gentamicina (100 µg/mL).

### **3.5.4 Protocolos experimentais *in vitro***

#### **3.5.4.1 Avaliação da capacidade seqüestradora do radical DPPH pelo EHDS**

A atividade sequestradora geral realizada pelo EHDS foi verificada pelo método descrito por Brand-Williams (1995), o qual é baseado na redução do radical DPPH em solução metanólica, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (por exemplo os polifenóis). A solução do DPPH tem uma faixa de absorção a 517 nm e tem uma cor fortemente violeta. A coloração decresce quando o DPPH é reduzido por compostos antioxidantes. A coloração remanescente corresponde inversamente à atividade sequestradores do antioxidante.

No procedimento, uma solução de DPPH (100 µM) foi preparada e 1,0 mL desta solução foi adicionado a 3,0 mL de diferentes soluções: controle negativo (contendo metanol), ácido ascórbico (AA, 50 µg/mL, controle positivo), e as diferentes concentrações do EHDS (0,1, 1,0, 10, 30, 50 e 100 µg/mL). Após 30 minutos, a absorbância foi determinada a 517 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em termos da porcentagem de redução da absorbância inicial do DPPH no grupo controle. A concentração do extrato que causou 50% de redução da atividade do DPPH (coloração) foi determinada.

#### **3.5.4.2 Determinação da capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pelo EHDS**

A atividade sequestradora do ânion superóxido foi verificada pelo método descrito por Nishimiki *et al.*, (1972), com algumas modificações. A mistura reacional consistiu de Tris-HCl (16 mM, pH 8.0), NADH (3.38 µM), NBT (72 µM), e PMS (30 µM). A mistura do metassulfato de fenazina com o NADH, em pH 8.0 gera ânions superóxido, os quais

podem ser quantificados pela sua capacidade de reduzir o NBT. A análise foi realizada em triplicata, usando o ácido ascórbico (AA, 50 µg/mL) como controle positivo. A reação foi acompanhada a 560 nm durante 5 minutos na ausência (grupo controle) ou em presença do EHDS (0,1, 1,0, 30, 50 ou 100 µg/mL). A capacidade sequestradora dos ânions superóxido foi calculada usando a equação abaixo e o valor de  $Cl_{50}$  foi determinado.

$$Efeito\ sequestrador\ (\%) = \left( 1 - \frac{Absorbância\ da\ Amostra}{Absorbância\ do\ Controle} \right) \times 100$$

[Qi *et al.*, 2005]

#### 3.5.4.3 Avaliação da capacidade seqüestradora do radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) pelo EHDS

A habilidade do EHDS sequestrar  $\cdot OH$  foi verificada através do ensaio de degradação da desoxirribose descrito por Halliwell *et al.* (1999). Quando o complexo ferro/EDTA é incubado com um agente redutor e  $H_2O_2$ , o radical  $\cdot OH$  que é gerado na solução ataca a desoxirribose e a fragmenta gerando TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O TBARS gerado reflete a quantidade de  $\cdot OH$  gerada, sendo que a presença de antioxidante compete com desoxirribose pelo  $\cdot OH$ , diminuindo a produção do TBARS. A mistura reacional conteve tampão fosfato (20 mM), desoxirribose (pH 7,4; 3,75 mM),  $FeCl_3$  (100 mM), EDTA (100 mM) e  $H_2O_2$  (1 mM), na ausência ou presença do EHDS (0,1, 1,0, 10, 30, 50 e 100 µg/mL). A reação foi iniciada pela adição de 100 mM de ácido ascórbico. As amostras foram incubadas em banho, sob agitação, durante 60 minutos a 37 °C, e em seguida foi realizado o ensaio do TBARS conforme descrito por Halliwell & Gutteridge (2007). A absorbância da mistura foi mensurada a 532 nm contra um branco. O manitol (1 mM), um conhecido

sequestrador de  $\cdot\text{OH}$ , foi utilizado como controle positivo. O ensaio foi realizado em triplicata e a porcentagem da ação foi calculada usando a mesma equação descrita no item anterior. A  $\text{IC}_{50}$  foi determinada.

#### **3.5.4.4 Avaliação da capacidade sequestradora do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pelo EHDS**

A atividade sequestradora de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo extrato foi determinada pelo método descrito por Ruch e colaboradores em 1989. Diferentes concentrações (0,1, 1,0, 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do EHDS foram adicionadas a uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4 mM em tampão fosfato, pH 7.4) e a absorbância a 230 nm foi determinada, após 10 min, contra um branco contendo tampão fosfato e as diferentes concentrações do extrato na ausência do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O ácido ascórbico (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi usado como controle positivo. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem sequestradora do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em relação ao controle sem o extrato. A  $\text{CI}_{50}$  foi também determinada.

#### **3.5.4.5 Efeito do EHDS nas células endoteliais expostas ao $\text{H}_2\text{O}_2$**

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um importante agente oxidante, o qual induz a formação de ROS em muitos tipos celulares (Coyle *et al.*, 2006). Neste experimento, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi usado para induzir o estresse oxidativo em uma cultura estável de células endoteliais de aorta de coelho para verificar se o EHDS exerce proteção antioxidante em sistemas biológicos. Nestas células, a geração de ROS foi verificada com o auxílio da sonda 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), um composto lipossolúvel, originalmente não fluorescente, que após ser oxidado pelas ROS intracelulares é convertido em 2',7'-

diclorofluoresceína (DCF), tornando-se insolúvel em meio lipídico (mantendo-se no interior da célula) e fluorescente (Royall & Ischiropoulos, 1993).

Nesses experimentos, as células endoteliais foram cultivadas em placas durante 7 dias (até atingir a quantidade de  $10^4$  células, quantificadas em câmara de Neubauer) e foram em seguida tratadas com o veículo (PBS), EHDS 10, 30 e 50  $\mu\text{g/mL}$  ou com rutina 70  $\mu\text{g/mL}$  (utilizada como controle antioxidante positivo) durante 1 hora a 37 °C. Após este procedimento, as células foram lavadas e então expostas ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) durante 15 min. Um grupo controle (em ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi providenciado para comparação. Em seguida as células foram novamente lavadas com PBS (para remover o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e expostas à sonda DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ). As células foram incubadas com a sonda durante 5 minutos a 37 °C e esta foi removida após uma nova troca de meio. Para obter uma fluorescência nuclear e confirmar a existência de células nas imagens sem fluorescência da DCF, as células foram incubadas durante 5 minutos com o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole; 300 nM diluído em PBS).

A fluorescência da DCF foi captada em microscópio confocal (Confocal Radiance 2100, Bio Rad Hercules, CA, USA) acoplado a um Nikon-Eclipse E800 com objetivas Plan-Apochromatic (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, NY, USA) a 525 nm de emissão e 488 nm de excitação. As imagens foram analisadas com software específico (Laser Sharp 2000) e as intensidades da fluorescência foram quantificadas por densitometria de pixels, usando o software Scion Image e representam a média de três imagens obtidas em experimentos independentes.

### **3.5.5 Protocolos experimentais *in vivo***

#### **3.5.5.1 Determinação da atividade da catalase**

A catalase protege as células dos efeitos nocivos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell, 1990). Neste experimento, a salina (0.9 % NaCl, 1 mL/Kg, i.p.) ou o EHDS (10, 20 or 40 mg/Kg, i.p.) foram injetados em ratos trinta minutos antes destes animais serem mortos por decapitação. Amostras de sangue foram coletadas imediatamente após o sacrifício e acondicionadas em tubos. Em seguida foram diluídas 1:10 em 50 mM de tampão fosfato/potássio. A atividade da catalase foi determinada de acordo com a decomposição de 30 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 50 mM de tampão fosfato/potássio (pH 7.0) a 240 nm durante 120 s (Aebi, 1984) por espectrofotômetro (Hitachi U-2001 com termostato a 37 °C). A atividade específica da catalase foi expressa pela constante k [(1/min) x mg de proteína] (Hirrlinger *et al.*, 2002). O conteúdo protéico foi quantificado colorimetricamente pelo método de Bradford (1976). Controles apropriados para a decomposição não-enzimática do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram incluídos no ensaio.

#### **3.5.5.2 Ensaio de peroxidação lipídica – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica é uma consequência bem caracterizada do estresse oxidativo, a qual conduz ao dano tecidual (Hirrlinger *et al.*, 2002). Para avaliar a peroxidação lipídica, diferentes grupos de animais foram tratados com salina (0.9 % NaCl, 1 mL/Kg, i.p.) ou com diferentes doses do EHDS (10, 20 ou 40 mg/Kg, i.p.). Trinta minutos depois os animais foram mortos e amostras do sangue foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos para a obtenção do plasma sanguíneo.

O conteúdo do TBARS foi determinado em meio contendo 0,1 mL de plasma, 0,1 mL de SDS (8,1%), 0,4 mL de tampão ácido acético (500 mM, pH 3,4), e 0,75 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,81%). A mistura foi ajustada para um volume total de 2 mL com água ultrapura aquecida a 95 °C. Após resfriamento à temperatura ambiente, a absorbância foi determinada no sobrenadante a 532 nm. O conteúdo do TBARS foi expresso em nmol de malonaldeído (MDA), um produto da decomposição dos peróxidos lipídicos, que serve como indicador da peroxidação lipídica (Hirrlinger *et al.*, 2002). O conteúdo de proteínas foi determinado colorimetricamente pelo método de Bradford (1976).

### **3.6 Efeitos da *Dicksonia sellowiana* em artéria coronária de porco (vaso de resistência) e em cultura de células endoteliais**

Nesta etapa, buscou-se determinar o efeito protetor do EHDS em artéria coronária de porco, um importante modelo de vaso de resistência, alvo de importantes doenças cardiovasculares como a aterosclerose e o infarto do miocárdio. Foram também realizados experimentos em cultura primária de células endoteliais da coronária de porco para caracterizar o mecanismo molecular ativado para a produção e liberação do NO endotelial em resposta ao EHDS.

#### **3.6.1 Reagentes**

Apamina, caribdotoxina, calmidazólio, atropina, superóxido dismutase (SOD), catalase, PEG-catalase, indometacina, bradicinina, dihidroetidina, N $\omega$ -nitro-L-arginina (L-NA), KN-93 (2-[N-(2-Hydroxietil)]-N-(4-metoxibenzenesulfonil)] amino-N-(4-clorocinamil)-N-metilbenzilamina) e N-acetil-L-cisteína (NAC), provenientes da Sigma.

Wortmaninaa, e MnTMPyP (Mimético da superóxido dismutase Mn(III)tetraquis(1-metil-4-piridil)porfirina) da Alexis Chemicals. U46619 (9,11-dideoxi- 9 $\alpha$ -metanoepoxi prostaglandina F2 $\alpha$ ) da Cayman Chemical, e PP2 (4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolo [3,4-d]pirimidina) da Calbiochem. As substâncias testadas foram preferencialmente dissolvidas em Krebs- bicarbonate ou 10% (vol/vol) dimetilsufóxido (DMSO) quando necessário. Na diluição final o conteúdo de DMSO foi inferior a 0.05% (vol/vol), o qual não interferiu na tensão vascular. A solução do EHDS foi preparada em solução de Krebs-bicarbonato imediatamente antes do uso.

### **3.6.2 Preparação dos anéis de artéria coronária de porco**

Corações de porcos de ambos os sexos foram coletados em um abatedouro da cidade de Strasbourg – França e as artérias coronárias descendentes esquerdas foram dissecadas, limpas do tecido conectivo e seccionadas em anéis de 4 mm. Os anéis foram então acondicionados em cubas de vidro por meio de hastes metálicas. Uma das extremidades das hastes foi conectada a transdutores de tensão isométrica, acoplados a um amplificador e a um computador com programa específico para registro das contrações isométricas (U-vessels; Université Luis Pasteur - Strasbourg). Nos experimentos que necessitaram da ausência de endotélio, o lúmen do vaso foi removido mecanicamente utilizando uma pinça. Os anéis foram mantidos a 37 °C em solução oxigenada (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>) de Krebs – bicarbonato (composição em mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.18, CaCl<sub>2</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 25, and D-glucose 11, pH 7.4) e a uma tensão basal de 5 g. Foi permitido um período de 60 minutos para estabilização da preparação, durante os quais a solução nutritiva foi periodicamente trocada e a tensão reajustada.

### 3.6.3 Estudos de reatividade vascular

Após o período de estabilização, a viabilidade de cada anel de coronária de porco foi verificada através de uma contração inicial com KCl (80 mM). Após trocas sucessivas de solução nos 30 minutos seguintes, os anéis foram contraídos com U46619 (1–60 nM), um mimético do tromboxano A<sub>2</sub>, até atingir 80% da contração máxima. Na fase sustentada desta contração, a bradicinina (0,3 µM) foi administrada para verificar a presença ou ausência do endotélio vascular. Após a remoção dessas drogas por lavagem do vaso e um novo período de estabilização, as propriedades relaxantes do EHDS (0,1 a 100 µg/mL) foram avaliadas. Em vários protocolos experimentais, os anéis foram previamente expostos aos inibidores durante os 30 minutos que precederam a administração do U46619 e a nova exposição ao EHDS. Os inibidores utilizados foram a indometacina (10 µM), a caribdotoxina (100 nM), a apamina (100 nM), a atropina (1 µM), o L-NA (100 µM; um inibidor não seletivo das NOS), calmidazólio (10 µM; inibidor da calmodulina), KN-93 (10 µM, inibidor da calmodulina quinase II, CaMKII), enzima SOD (500 U/mL), MnTMPyP (100 µM; análogo permeável da SOD), enzima catalase (500 U/mL), Peg-catalase (500 U/mL; catalase associada ao polietileno glicol, o qual permite permear as células), PP2 (10 µM; inibidor da Src quinase), ou wortmanina (30 nM; inibidor da via PI3K/Akt).

Em outro protocolo experimental, contrações cumulativas induzidas pelo U46619 (1 nM a 1 µM) foram induzidas na ausência ou presença do EHDS (100 µg/mL) em diferentes condições de tempo: (a) EHDS incubado durante 5, 30, 60 ou 180 minutos (3 horas) antes da curva com o U46619 em presença do extrato; (b) EHDS incubado somente durante 5 minutos antes da remoção do extrato pela troca do líquido nutritivo e subsequente espera até os tempos de 25, 55 ou 175 minutos antes da curva de

contração pelo U46619 em ausência do extrato, e (c) ambas condições anteriores em presença do L-NA (100  $\mu$ M; 30 min).

Além destes experimentos, foram investigadas as capacidades vasorrelaxantes do ácido gálico, do ácido protocatecúico, do ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico e ácido cinâmico, compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD no extrato hidroalcoólico da *D. sellowiana* (EHDS). Todos estes compostos foram testados nas concentrações entre  $10^{-8}$  e  $10^{-1}$  M, adicionadas em anéis de artéria coronária de porco, com e sem endotélio vascular, previamente contraídos com o U 46619.

#### **3.6.4 Determinação da formação vascular de ROS em presença do EHDS**

A sonda diidroetidina (DHE) foi usada para avaliar *in situ* a formação de ROS através do método descrito por Miller e colaboradores em 1998. O DHE penetra livremente nas células e, em presença de ROS, é oxidado a brometo de etídio, o qual é capaz de se intercalar ao DNA das células e emitir fluorescência. Anéis de artéria coronária de porco (5 a 6 mm) dos grupos controle, grupo tratado com o EHDS (100  $\mu$ g/mL), ou EHDS mais SOD (500 U/mL), catalase (500 U/mL), MnTMPyP (100  $\mu$ M), Peg-catalase (500 U/mL), ou com o antioxidante NAC (10 mM) foram embebidos em composto OCT (resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato; Tissue-Tek<sup>®</sup>; Qaigen, Hilden, Alemanha), e congelados imediatamente em nitrogênio para posterior secção em micrótomo criostato. Estes anéis de artérias coronárias congeladas e não fixados foram então seccionados a 25  $\mu$ m de espessura e aderidos a lâminas de vidro. O DHE (2,5  $\mu$ M) foi aplicado a todos os tecidos das lâminas, os quais foram incubados em câmara umidificada, ao abrigo da luz, a 37 °C durante 30 minutos antes de selar com a lamínula. As imagens foram obtidas com um microscópio confocal

(Bio-Rad MRC-1024) equipado com laser criptônio/argônio. A aquisição das imagens foi realizada sob os padrões de calibragem idênticos para o controle ou tratados com o EHDS, com e sem inibidores. O brometo de etídio foi excitado a 488 nm com espectro de emissão de 610 nm. A fluorescência foi detectada com filtro de 585 nm.

### **3.6.5 Determinação da fosforilação da eNOS por imunohistoquímica**

Artérias coronárias foram isoladas, embebidas em composto OCT e congeladas em nitrogênio líquido. As artérias congeladas foram seccionadas em criostato na espessura de 14  $\mu\text{m}$ . As lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4%, e tratadas com albumina em PBS, contendo 0,1% de BSA e 0,05% de Tween-20 durante 45 minutos para bloquear qualquer sítio de ligação não específico. Em seguida, as secções foram incubadas durante a noite, a 4  $^{\circ}\text{C}$  com a albumina sem anticorpo ou com um anticorpo específico contra eNOS. Utilizou-se o anticorpo policlonal purificado de coelho contra a eNOS fosforilada na serina 1177 (Santa Cruz, SC-21871, diluição 1:100). As secções foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (anti-rabbit IgG ligado a peroxidase, diluição 1:200; Cell Signaling Technology). As preparações foram mantidas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e lavadas em PBS antes da colocação das lamínulas e verificação no microscópio confocal.

### **3.6.6 Cultura primária de células endoteliais de coronária de porco**

Segmentos longos de artéria coronária de porco foram lavados internamente com PBS sem cálcio, para remover o sangue remanescente. Em seguida, as células endoteliais foram isoladas por meio do tratamento com colagenase (tipo I, Worthington, 1 mg/ml durante 15 min a 37  $^{\circ}\text{C}$ ) e cultivadas em placas contendo meio MCDB 131

(Invitrogen) e 15% de soro fetal bovino suplementado com penicilina, (100 U/ ml), estreptomicina (100 U/ml), fungizona (250 µg/ml), e L-glutamine (2 mM) (todos da Cambrex). A confluência era atingida entre as 48 a 72 horas que se seguiam. Todos os experimentos foram realizados em culturas celulares confluentes e de primeira passagem. As células foram expostas ao meio de cultura contendo 0,1 % de soro fetal bovino (QBiogene) durante 6 horas antes do tratamento das células.

### **3.6.7 Análise por Western Blot**

As fosforilações da eNOS, Akt e Src foram determinadas em cultura de células endoteliais de coronária de porco através da técnica de Western Blot, exatamente como descrito por Anselm e colaboradores (2007). Para este experimento, as células foram previamente tratadas durante 30 minutos com PBS (controle negativo), ou com os inibidores calmidazólio (10 µM), o KN-93 (10 µM), SOD (500 U/mL), MnTMPyP (100 µM), catalase (500 U/mL), Peg-catalase (500 U/mL), PP2 (10 µM) ou wortmaninaa (30 nM). Após o tratamento, os inibidores foram removidos com a troca do meio e as células foram tratadas com o EHDS (100 µg/mL). Alguns experimentos foram realizados exclusivamente com o EHDS para investigar o efeito das diferentes concentrações e dos tempos de incubação sobre a fosforilação das proteínas investigadas. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com o PBS gelado e então lisadas com uma mistura contendo Tris/HCl 20 mM (pH 7.5; QBiogene), NaCl 150 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, fosfato de sódio 10 mM, NaF 20 mM, ácido ocadáico 0.01 mM (Sigma), inibidor de protease (Roche) e 1% Triton X-100 (QBiogen). O total de proteínas usado por amostra foi 20 µg. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida SDS 8% (Sigma) a 70 V durante 2 horas. Em seguida foram transferidas eletroforeticamente, a 100 V durante 120 minutos, para membranas (difluoreto de

polivinilidina da Amersham), as quais foram bloqueadas com meio contendo 3 % de albumina sérica bovina, Tris (Biorad) e 0,1% de Tween-20 (Sigma) (TBST) durante 1 hora. Para detecção das proteínas fosforiladas, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários (p-Src Tyr418, Biosource; p-Akt Ser473 e p-eNOS Ser1177, Cell Signaling Technology; diluição de 1:1000), a 4 °C durante a noite. Após a lavagem em PBS, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (anticorpo anti-rabbit IgG ligado à peroxidase, diluição de 1:5000; Cell Signaling Technology), em temperatura ambiente, durante 60 minutos. Marcadores específicos (Invitrogen) foram utilizados para a determinação do peso molecular e identificação das proteínas na membrana. As bandas imuno-reativas foram detectadas pelo aumento da quimioluminescência (Amersham). Frequentemente uma solução de Ponceau foi utilizada para verificar a qualidade da transferência das proteínas.

### **3.7 Análise estatística** (aplicada nos três estudos)

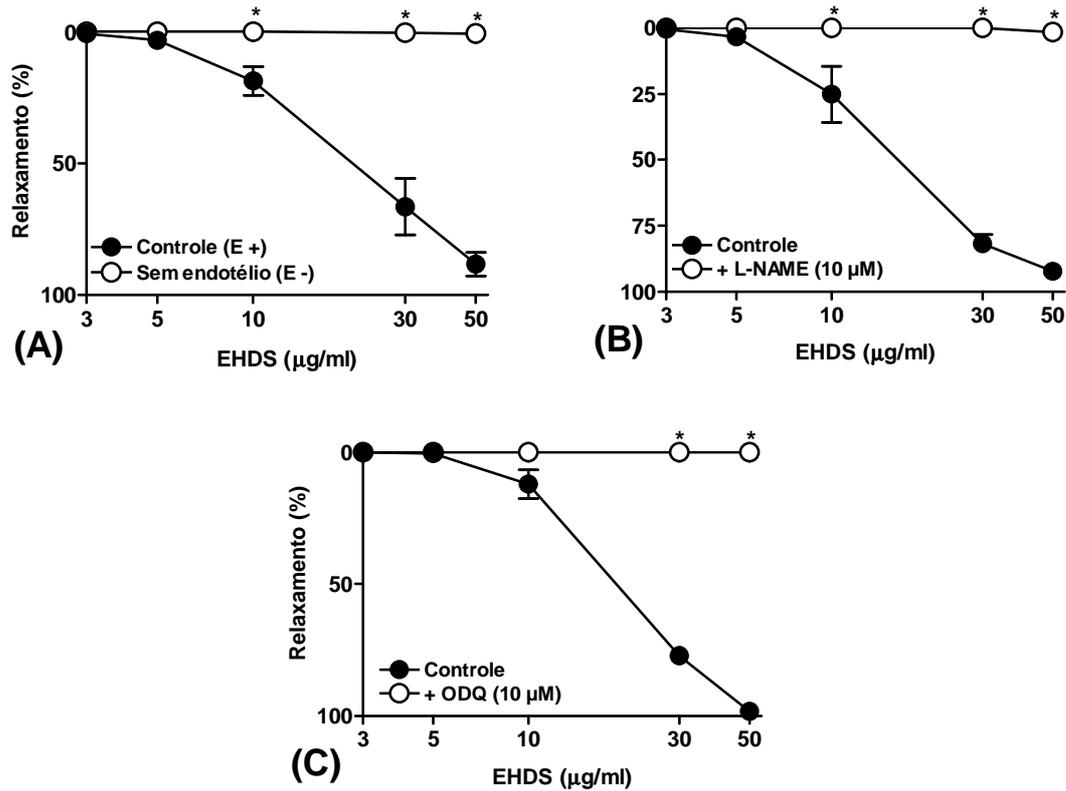
Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 a 6 experimentos (em cultura de células e misturas reacionais) ou 5 a 8 experimentos (com animais e artérias isoladas). As avaliações estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou pelo teste *t* de Student, para amostras não pareadas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os gráficos e as análises estatísticas foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Efeito relaxante da *Dicksonia sellowiana* em vaso de condutância: experimentos em aorta isolada de rato e confirmação *in vivo*

#### 4.1.1 Participação da via NO/GMPc no efeito vasorrelaxante do EHDS em aorta de rato

Nos experimentos que investigaram a participação do endotélio e o envolvimento da via NO/GMPc nos efeitos vasculares do EHDS, a adição cumulativa do extrato nas concentrações de 3, 5, 10, 30 e 50 µg/ml ocasionou um potente relaxamento vascular ( $E_{max} = 90,2 \pm 2,3\%$ ) em anéis de aorta de rato contendo endotélio pré-contraídos com fenilefrina, mas não em anéis cujo endotélio foi removido (Figura 16 A). A  $CE_{50}$  (juntamente com o limite de confiança para 95 %) foi de 25,3 (17,5–33,1) µg/ml. Sessenta minutos após a remoção do EHDS das cubas, os efeitos da fenilefrina e da acetilcolina foram similares àqueles obtidos antes da adição do EHDS. A incubação prévia com L-NAME (inibidor das NOS) ou com ODQ (inibidor da guanilil ciclase), foi capaz de prevenir completamente o relaxamento induzido pelo EHDS em aorta de rato (Figura 16 B e C, respectivamente).

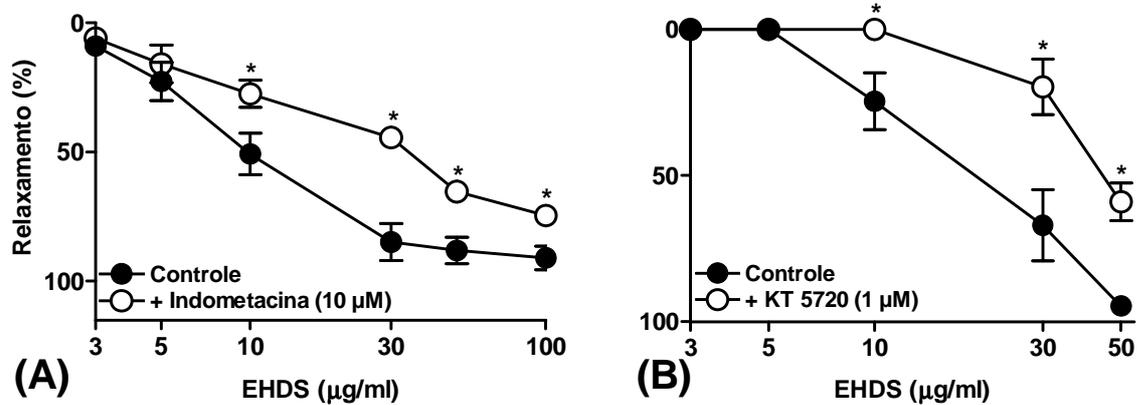


**Figura 16: O EHDS induz relaxamento vascular dependente do endotélio e da via óxido nítrico/GMPc** (A) Atividade relaxante do EHDS (3, 5, 10, 30 e 50  $\mu\text{g/ml}$ ) em anéis de aorta de rato com endotélio (indicado por E+) e sem endotélio (indicado por E-). (B) Inibição do relaxamento induzido pelo EHDS em anéis de aorta de rato por incubação com o L-NAME (inibidor da eNOS) ou (C) do ODQ (um inibidor da enzima guanilil ciclase). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 5–7 experimentos. \*  $p < 0.05$  em comparação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.1.2 Envolvimento da via $\text{PGI}_2/\text{AMPC}$ no efeito vasorrelaxante do EHDS em aorta de rato

Nos experimentos que investigaram o envolvimento da via endotelial da  $\text{PGI}_2/\text{AMPC}$ , a incubação com indometacina (10  $\mu\text{M}$ ; inibidor da ciclooxygenase) ou com KT 5720 (1  $\mu\text{M}$ ; inibidor da proteína quinase A – PKA) reduziu parcialmente a resposta vasorrelaxante induzida em anéis de aorta com endotélio pelo EHDS (Figura 17 A e B). A incubação com indometacina resultou em um deslocamento à direita no relaxamento

dependente da concentração produzido pelo EHDS, aumentando sua  $CE_{50}$  de 15,5 (8,2-26,8) para 33,7 (28,2-39,3)  $\mu\text{g/ml}$ . Em ambos os casos, houve redução proporcional da resposta relaxante máxima.

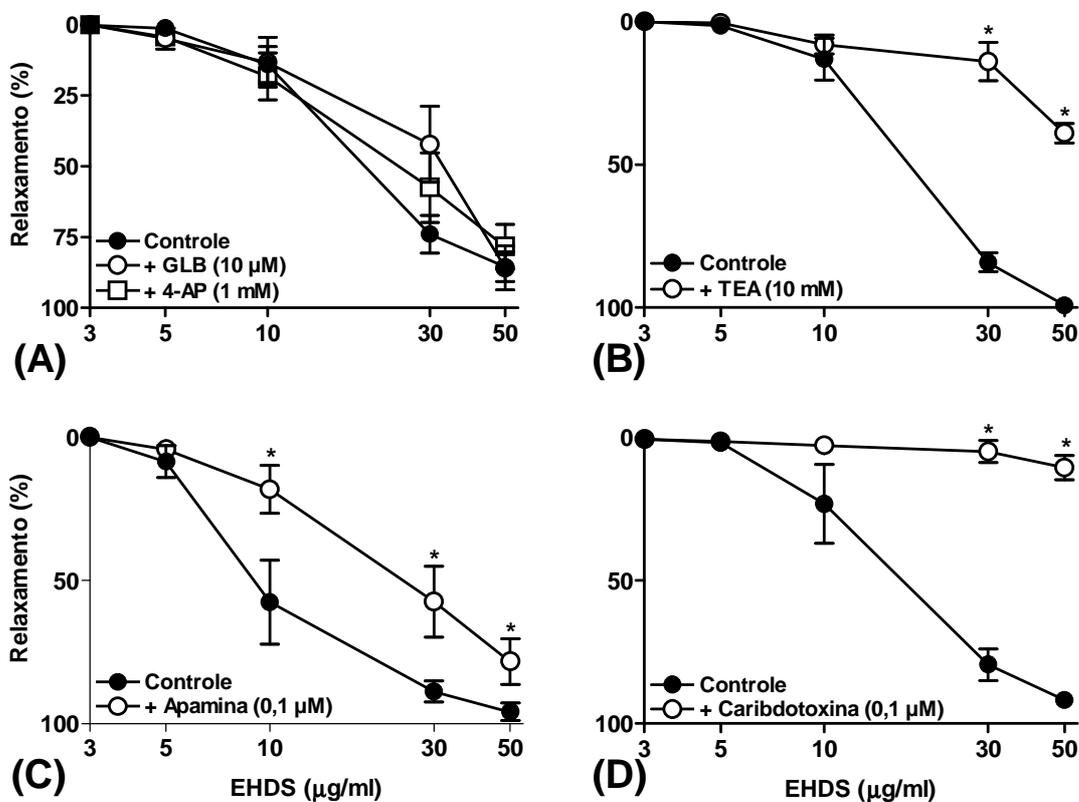


**Figura 17: Os inibidores da ciclooxygenase (COX) e da proteína quinase A (PKA) inibiram parcialmente o relaxamento induzido pelo EHDS. (A)** Efeito do EHDS na ausência e presença da indometacina (inibidor da COX), e **(B)** na ausência e presença do KT 5720 (inibidor da PKA). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 5-7 experimentos. \*  $p < 0.05$  em comparação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.1.3 Participação dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante do EHDS em aorta de rato

Na investigação de qual o canal de  $K^+$  estaria envolvido nos efeitos vasculares do EHDS, a glibenclamida (GLB; bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP; 10  $\mu\text{M}$ ) e a aminopiridina (4-AP; bloqueador de canais de potássio sensíveis a voltagem; 1 mM) não interferiram de forma significativa (Figura 18 A). Entretanto, o efeito vasorrelaxante do EHDS foi reduzido em aproximadamente 70% após incubação com o tetraetilamônio (TEA; bloqueador não seletivo de canais de potássio; 10 mM) (Figura 18 B). Além disso, a exposição dos anéis de aorta à apamina (bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância; 0,1  $\mu\text{M}$ ) deslocou a curva

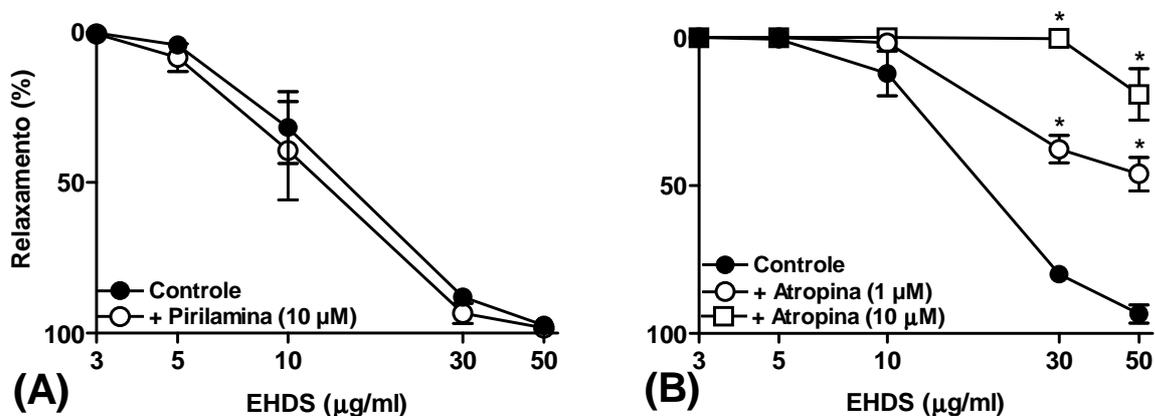
do efeito do EHDS para a direita, modificando a  $CE_{50}$  de 14,5 (8,4 – 20,6)  $\mu\text{g/ml}$  para 29,4 (19,9 – 38,8)  $\mu\text{g/ml}$ , e ainda reduziu o relaxamento máximo (Figura 18 C), enquanto que a caribdotoxina (bloqueador de canais de potássio de condutância intermediária e alta; 0,1  $\mu\text{M}$ ) aboliu a resposta vasorrelaxante induzida pelo EHDS (Figura 18 - D). É importante salientar que não foram observadas alterações significantes na contração dos anéis de aorta em resposta à fenilefrina após a incubação dos bloqueadores de canais de  $K^+$  utilizados.



**Figura 18: Efeito inibitório dos bloqueadores de canais de potássio no relaxamento vascular induzido pelo EHDS.** O relaxamento produzido pelo EHDS (1 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) foi testado na ausência e presença da glibenclamida (GLB, bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP) e 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador de canais de potássio sensíveis a voltagem) (A), do tetraetilamônio (TEA, bloqueador não seletivo de canais de potássio) (B), da apamina (bloqueador de canais de potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância) (C), ou da caribdotoxina (bloqueador de canais de potássio de condutância intermediária e alta) (D). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 5-7 experimentos. \*  $p < 0.05$  em comparação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.1.4 Envolvimento dos receptores muscarínicos endoteliais no efeito vasodilatador induzido pelo EHDS

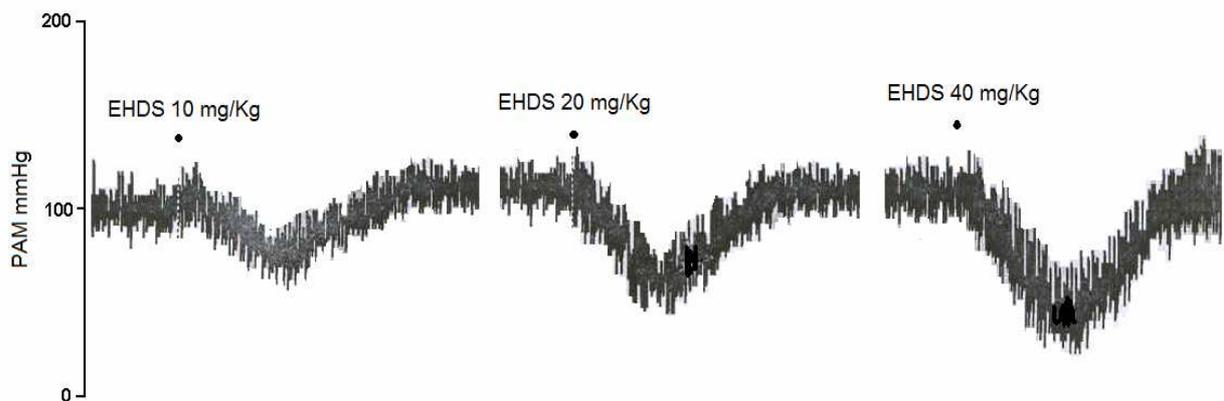
Nos experimentos que buscaram investigar se algum receptor existente na membrana das células endoteliais poderia ser ativado e ocasionar a vasodilatação, observou-se que o relaxamento vascular induzido pelo EHDS não foi alterado após incubação da pirilamina (um antagonista seletivo de receptores  $H_1$  da histamina; 10  $\mu\text{M}$ ) (Figura 19 A), mas foi significativamente reduzido, e de forma concentração dependente, na presença de atropina (antagonista de receptores muscarínicos; 1 e 10  $\mu\text{M}$ ) (Figura 19 B). As concentrações utilizadas da pirilamina e da atropina impediram as respostas vasorrelaxantes promovidas pela histamina e pela acetilcolina (dados não mostrados), comprovando a eficácia dos antagonistas neste procedimento.



**Figura 19: O relaxamento vascular induzido pelo EHDS envolve a ativação de receptores muscarínicos em aorta de rato.** Os gráficos mostram o relaxamento vascular induzido pelo EHDS (1 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) em anéis de aorta incubados ou não com pirilamina (antagonista de receptores  $H_1$ ) (A) ou com a atropina (antagonista de receptores muscarínicos) (B). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 5-7 experimentos. \*  $p < 0,05$  em comparação aos respectivos controles (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

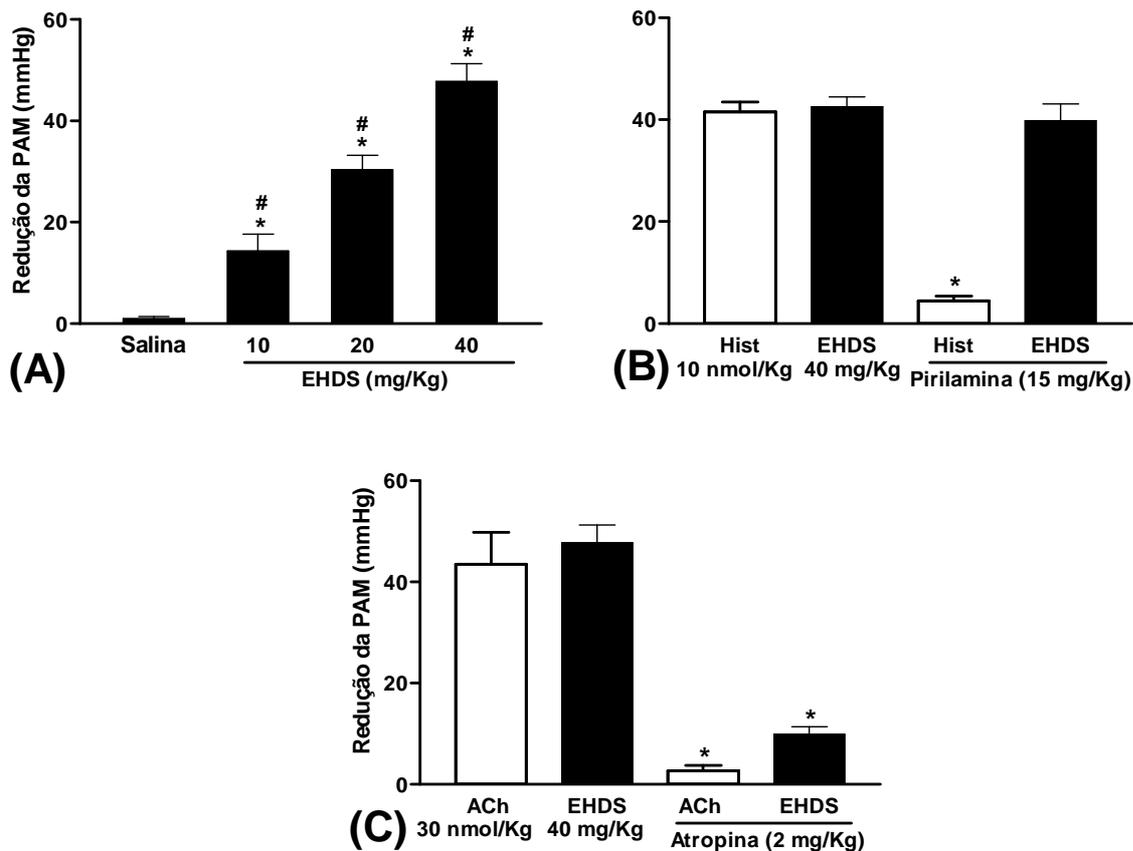
#### 4.1.5 Efeito hipotensor do EHDS em ratos anestesiados

Nos ensaios *in vivo* que buscavam verificar a ocorrência de hipotensão através dos mecanismos sugeridos pelos testes *in vitro*, verificou-se que a administração do EHDS (10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) em ratos anestesiados reduziu a pressão arterial média (PAM) de forma dependente da dose (Figura 20 e Figura 21 A). O efeito hipotensor da dose de 40 mg/Kg não foi modificado nos animais previamente tratados com a pirilamina (antagonista de receptores H<sub>1</sub>; 15 mg/Kg, i.v.) (Figura 21 B), mas foi reduzido substancialmente pela atropina (antagonista de receptores muscarínicos; 2 mg/Kg, i.v.) (Figura 21 C).



**Figura 20. Registro típico do efeito hipotensor dependente da dose induzido pelo EHDS (10, 20, e 40 mg/Kg) administrado pela via endovenosa em ratos anestesiados.**

PAM = pressão arterial média.



**Figura 21. O efeito hipotensor do EHDS em ratos anestesiados é dependente da ativação de receptores muscarínicos.** O EHDS (10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) reduziu da pressão arterial média (PAM) de forma dependente da dose **(A)**. Este efeito não foi alterado pela pirilamina, antagonista H1 (15 mg/Kg, i.v.) **(B)**, mas foi bloqueado pela atropina (2 mg/Kg, i.v.) **(C)**. A hipotensão induzida pela histamina (Hist, 2 µg/Kg, i.v.) e pela acetilcolina (ACh, 30 nmol/Kg, i.v.) correspondem aos controles positivos e confirmam a eficácia dos antagonistas. Os resultados mostram a média ± EPM de 6 experimentos. \*  $p < 0.05$  em comparação aos respectivos controles; #  $p < 0,05$  na comparação entre as diferentes doses do EHDS (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.1.6 Efeito vasorrelaxante das frações obtidas a partir do EHDS

Na investigação de qual fração do EHDS apresentaria o maior efeito vasorrelaxante, as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e etanólica (polaridade crescente) foram testadas nas concentrações entre 1 e 1000 µg/mL e

induziram efeitos vasorrelaxantes parciais nos anéis de aorta com endotélio vascular e pré-contraídos com fenilefrina (Tabela 4). Foram determinadas as porcentagens de relaxamento das frações e do EHDS, bem como as concentrações nas quais os efeitos máximos foram obtidos.

**Tabela 4: Efeito vasorrelaxante das frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Dicksonia sellowiana* (EHDS) em anéis de aorta de rato.**

Frações	Relaxamento máximo (%)	Concentração	N (número de experimentos)
Hexânica	NS	1000 µg/mL	4
Clorofórmica	7,2 ± 1,3 %	1000 µg/mL	4
Acetato de etila	33,7 ± 3,2 %	300 µg/mL	5
Etanólica	44,2 ± 2,7 %	300 µg/mL	5
<b>EHDS</b>	<b>92,4 ± 2,7%</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>5</b>

Os anéis de aorta de rato com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina (1 µM) e as frações foram testadas nas concentrações de 1 a 1000 µg/mL. Os valores mostram as porcentagens totais de relaxamento e as concentrações nas quais o efeito máximo foi obtido. NS = não significativa.

## 4.2 Efeitos antioxidantes da *Dicksonia sellowiana* *in vitro* e *in vivo*

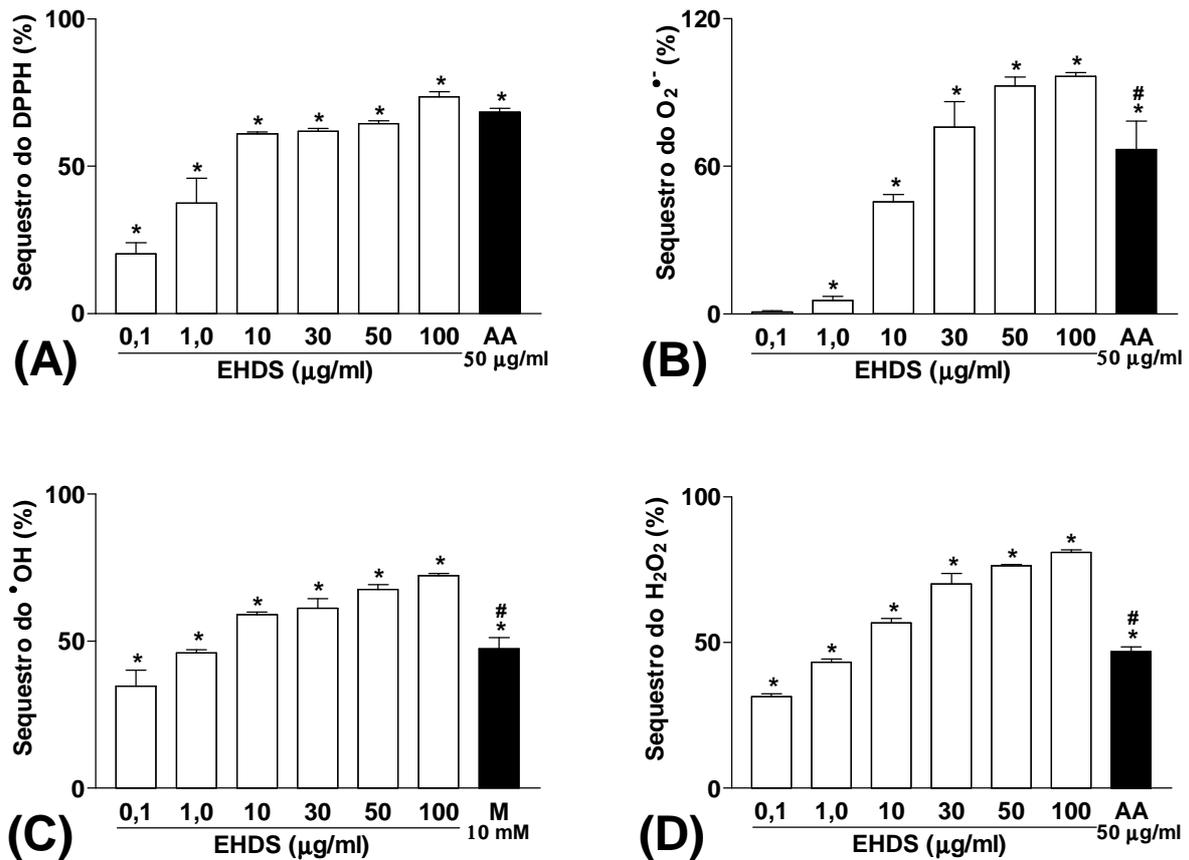
### 4.2.1 Atividade antioxidante do EHDS contra os radicais DPPH, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O EHDS (0,1, 1,0, 10, 30, 50 e 100 µg/mL) reduziu os níveis de DPPH de forma dependente da concentração. As porcentagens de inibição corresponderam a 20,3; 37,4; 61,1; 63,0 e 73,6 %, respectivamente (Figura 22 A), com valor de Cl<sub>50</sub> correspondente a 6,83 ± 2,05 µg/mL do extrato. O ácido ascórbico (AA, 50 µg/mL) foi usado como controle positivo e inibiu significativamente o DPPH disponível (~68,4 %).

A Figura 22 B mostra que o EHDS (0,1 a 100 µg/mL) foi muito efetivo no sequestro do  $O_2^{\cdot-}$ . As porcentagens de inibição foram respectivamente 0,75, 5,44, 45,6, 75,9, 92,7 e 96,6%, com valor de  $CI_{50}$  de  $11,6 \pm 5,4$  µg/mL. O ácido ascórbico (AA, 50 µg/mL), foi usado como controle positivo e inibiu 67% da geração de  $O_2^{\cdot-}$  pelo sistema.

O EHDS também mostrou uma importante habilidade de inibir a degradação da desoxirribose mediada pelo radical hidroxila, a qual serve como indicativo da capacidade seqüestradora do  $\cdot OH$ . O EHDS 0,1 a 100 µg/mL inibiu significativamente a degradação da desoxirribose de maneira dependente da concentração (34,6; 46,1; 59,1; 61,3; 67,7 e 74 %) com um valor de  $CI_{50}$  correspondente a  $2.03 \pm 0.4$  µg/mL. O controle positivo utilizado foi o manitol (10 mM; um sequestrador clássico do  $\cdot OH$ ), o qual inibiu a degradação da ribose em aproximadamente 50 % (Figura 22 C).

A Figura 22 D demonstra a capacidade seqüestradora do EHDS contra o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O EHDS 0,1, 1,0, 10, 30, 50 ou 100 µg/mL seqüestrou o  $H_2O_2$  de forma dependente da concentração, cujos valores corresponderam a 31,5; 43,3; 56,8; 70,1; 76,3 e 80,9 %, respectivamente. O valor de  $CI_{50}$  correspondeu a  $4,8 \pm 0,4$  µg/mL. O ácido ascórbico (50 µg/mL) foi usado como controle positivo e produziu 46,9 % de redução da concentração de  $H_2O_2$  livre.



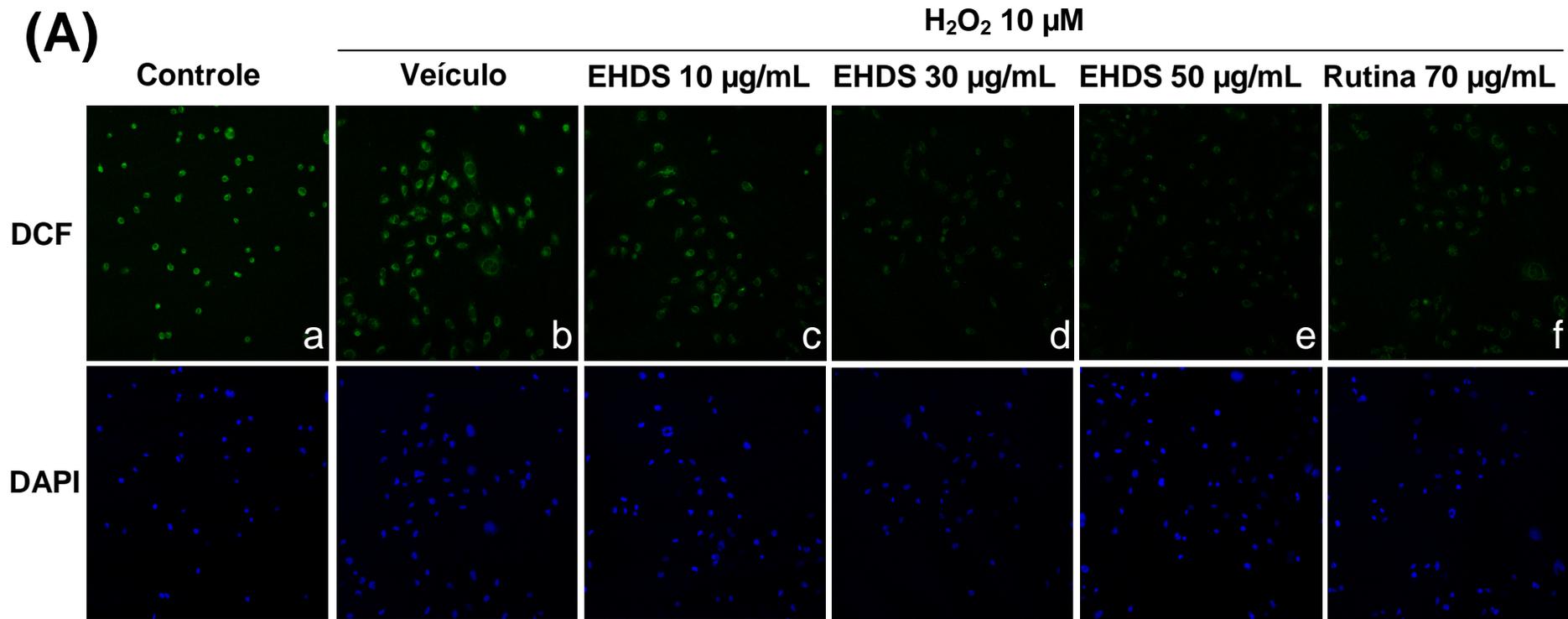
**Figura 22: Atividade antioxidante do EHDS sobre espécies reativas de oxigênio.** Os gráficos correspondem às porcentagens do sequestro do radical estável DPPH (A), do ânion superóxido (B), do radical hidroxila (C) e do peróxido de hidrogênio (D) pelo EHDS (0,1 a 100 µg/mL). Todas as barras correspondem à diferença, em porcentagem, da absorvância das misturas reacionais contendo o extrato ou os controles positivos ácido ascórbico (AA) e manitol (M) em relação à absorvância do veículo. Os resultados correspondem à média ± EPM de 3 a 4 experimentos. \*  $p < 0,001$  em relação aos controles sem extrato e #  $p < 0,05$  na comparação entre o controle positivo e o EHDS 100 µg/mL (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.2.2 Efeito protetor do EHDS nas células endoteliais contra a ação oxidante do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

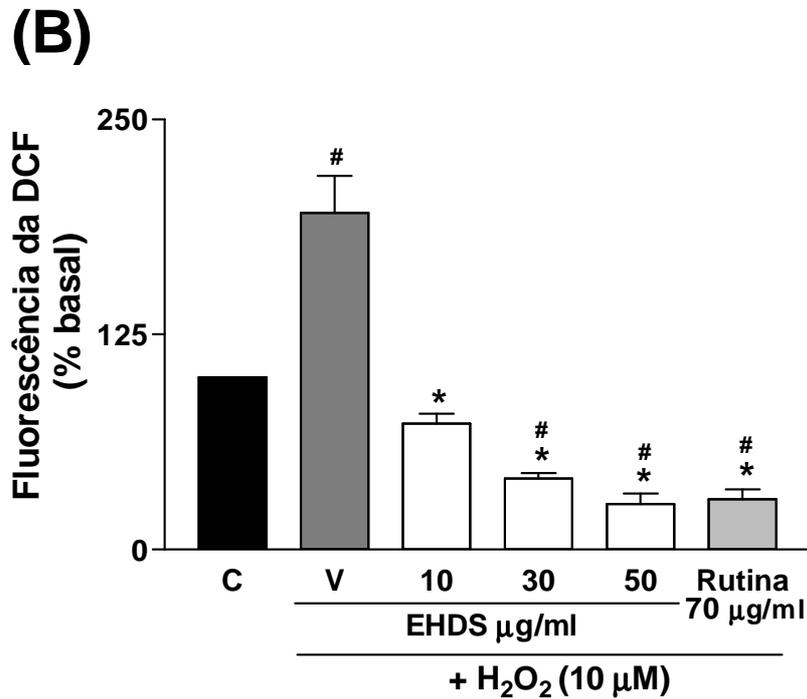
Neste experimento, uma cultura de células endoteliais de aorta de coelho foi utilizada para investigar as propriedades antioxidantes do EHDS contra o estresse

oxidativo induzido pelo  $H_2O_2$ , um insulto químico que mimetiza condições patológicas vasculares. Os níveis de ROS foram quantificados através da diclorofluoresceína (DCF) em células tratadas ou não com o EHDS. A redução da fluorescência indica a diminuição do  $H_2O_2$  disponível e a consequente atividade protetora do extrato.

A Figura 23, painel A representa as células endoteliais controle (não expostas ao agente pró-oxidante  $H_2O_2$ , 10  $\mu$ M) (a). A adição do  $H_2O_2$  nas células tratadas com o veículo (PBS) resultou num aumento da produção intracelular de radicais livres (representada pela fluorescência) de 100% (valor do controle basal) para 195,7% (veículo) (b). O tratamento prévio das células com o EHDS 10 (c), 30 (d) e 50  $\mu$ g/mL (e) preveniu os efeitos do  $H_2O_2$ , cujos valores de redução da fluorescência foram 122,5%, 154,3% e 169,2% em comparação ao veículo, respectivamente. Além disso, em relação ao controle não tratado (a) observou-se que o EHDS não apenas preveniu os efeitos do  $H_2O_2$  como conseguiu reduzir a fluorescência a níveis inferiores aos basais. Estes resultados indicam que o EHDS exerce uma forte proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo  $H_2O_2$ . Similarmente, a rutina (70  $\mu$ g/mL) usada como controle positivo, provocou uma forte redução da fluorescência (166,5 %) gerada pelo  $H_2O_2$  (f). A coluna das imagens inferiores representa as mesmas populações de células marcadas com o DAPI (que evidencia o núcleo das células), usado como controle comparativo do número de células em cada amostra. Todos os resultados foram ainda representados na forma de gráfico (Figura 23, painel B). Nossos dados demonstram que, em condições *in vitro*, o EHDS 10, 30 e 50  $\mu$ g/mL exerce uma importante ação protetora contra o estresse oxidativo gerado pelo  $H_2O_2$ .



**Figura 23 A: O EHDS protege as células endoteliais contra o estresse oxidativo produzido pelo  $H_2O_2$ .** As culturas de células endoteliais de aorta de coelho foram previamente tratadas com o Veículo (PBS) (b), com o EHDS 10  $\mu$ g/mL (c), 30  $\mu$ g/mL (d) ou 50  $\mu$ g/mL (e) ou com a rutina 70  $\mu$ g/mL, usada como controle positivo antioxidante (f). Em seguida, todos estes grupos foram expostos ao  $H_2O_2$  (10  $\mu$ M), durante 15 minutos, para indução do estresse oxidativo. Para efeitos de comparação, um grupo de células sem nenhum tipo de tratamento foi reservado (grupo basal “Controle”) (a). A geração de ROS foi avaliada através de fluorescência da sonda 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) em microscopia confocal. As amostras foram também marcadas com o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para obtenção de uma fluorescência nuclear (aumento X 20).



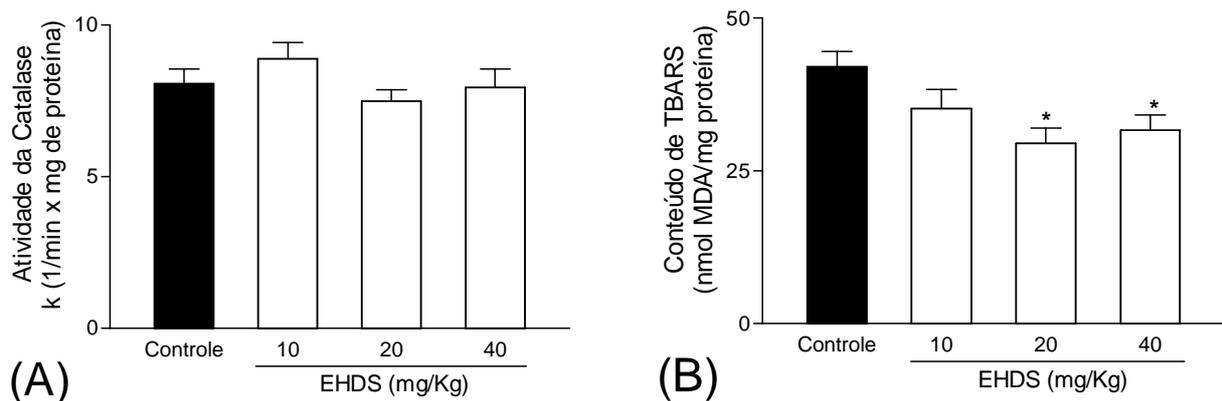
**Figura 23 B:** Representação gráfica das médias, em porcentagem, de fluorescência da 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) obtidas nas imagens das culturas de células endoteliais tratadas ou não com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ ), previamente tratadas com o veículo (V), com o EHDS 10, 30 e 50  $\mu\text{g/mL}$  ou com a Rutina 70  $\mu\text{g/mL}$  (controle antioxidante positivo). As barras correspondem à média  $\pm$  EPM das porcentagens determinadas pela densitometria de pixels nas imagens confocais das culturas celulares ( $n = 3$ ). \*  $p < 0,001$  quando comparado ao veículo (V); #  $< 0,05$  quando comparado ao controle basal, sem exposição ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.2.3 Efeitos *in vivo* do EHDS na atividade da catalase e na peroxidação lipídica

Para verificar se a atividade protetora do EHDS contra o estresse oxidativo exercido pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células endoteliais ocorria devido ao aumento da atividade da enzima catalase, amostras de sangue de ratos pré-tratados com EHDS 10, 20 ou 40  $\text{mg/Kg}$  (i.p.) foram usadas na avaliação da atividade da catalase. Entretanto, os dados apresentados na Figura 24 A demonstram que o tratamento dos animais com o EHDS

não alterou a atividade da catalase quando comparados com os dados do grupo controle.

Em relação à peroxidação lipídica, nossos resultados mostram que o EHDS, utilizado no mesmo esquema de tratamento descrito anteriormente, causou um efeito inibitório significativo na peroxidação lipídica (Figura 24 B). As concentrações de 20 e 40 mg/Kg inibiram a peroxidação lipídica em aproximadamente 29,8% e 24,5%, respectivamente. Seus conteúdos de TBARS (nmol MDA/ mg de proteína) foram  $42,0 \pm 2,62$  para o veículo (salina),  $31,17 \pm 3,2$ ,  $29,5 \pm 2,5$  e  $31,67 \pm 2,5$  para os grupos EHDS 10, 20 e 40 mg/Kg (i.p), respectivamente.

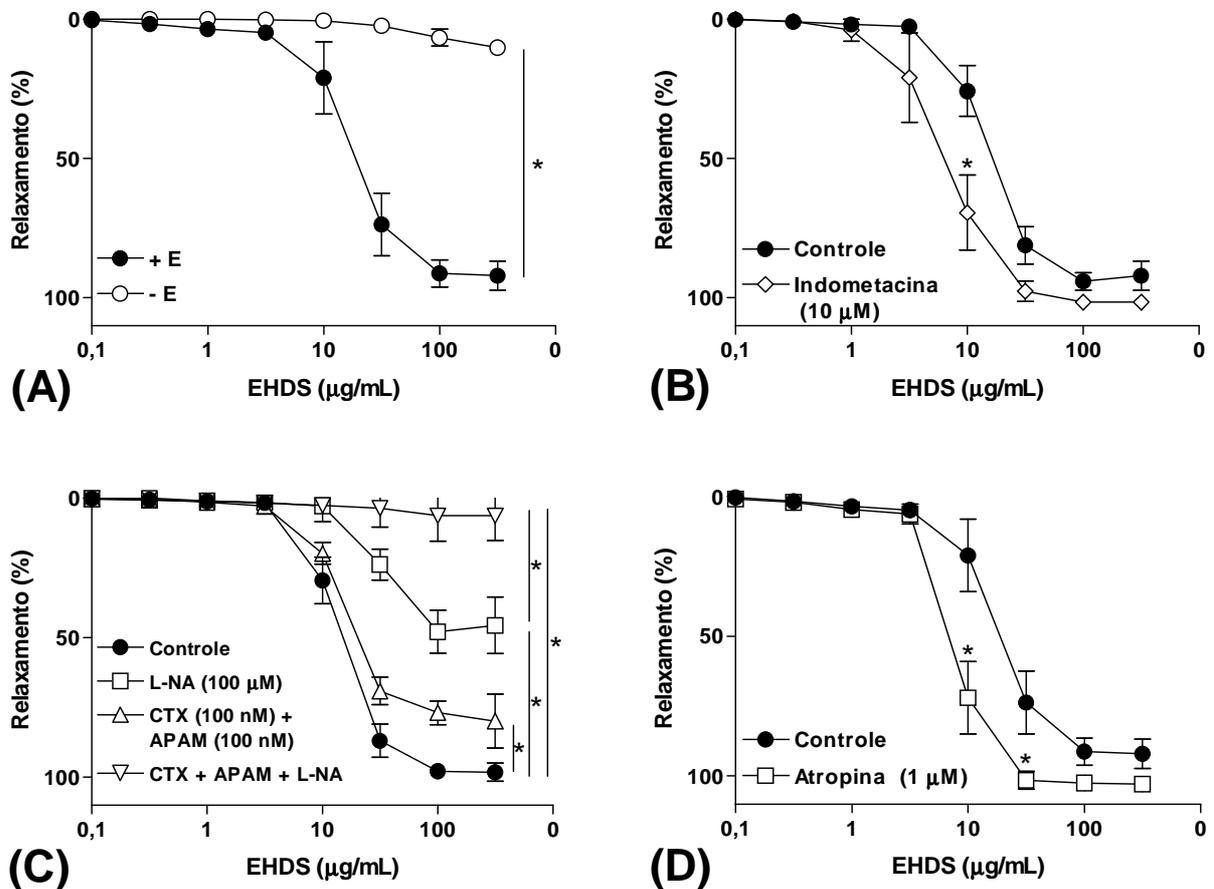


**Figura 24: Efeitos *in vivo* do extrato hidroalcoólico da *Dicksonia sellowiana* (EHDS) na atividade da enzima catalase e na peroxidação lipídica.** Os ratos foram inicialmente tratados com salina (Controle) ou EHDS (10, 20 ou 40 mg/Kg). Trinta minutos depois, os animais foram mortos e as amostras de sangue e de plasma foram obtidas, respectivamente, para os ensaios da catalase (determinada pela decomposição do peróxido de hidrogênio) (A) e da peroxidação lipídica (B), através da determinação do conteúdo de TBARS, expressos em nmol do seu principal produto de decomposição, o malondialdeído (MDA). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 5 a 8 experimentos. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *t* de Bonferroni).

### 4.3 Efeitos da *Dicksonia sellowiana* em artéria coronária de porco (vaso de resistência) e em cultura de células endoteliais

#### 4.3.1 Efeito vasorrelaxante do EHDS em artéria coronária de porco

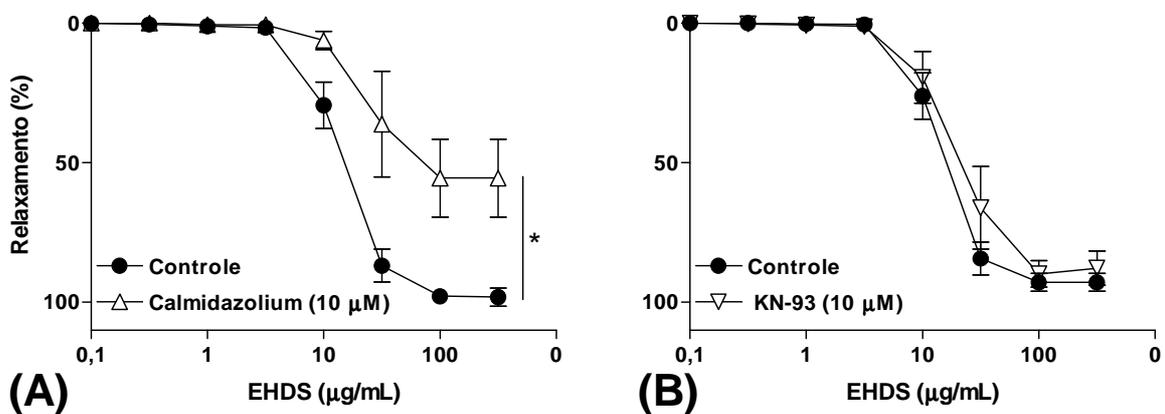
Para investigar os efeitos do EHDS também sobre um vaso de resistência, foram realizados diversos experimentos em artéria coronária de porco. Neste modelo, a adição de concentrações cumulativas do EHDS 0,1 a 300 µg/mL nos anéis de artéria coronária de porco resultaram em um relaxamento dependente da concentração das artérias com endotélio preservado mas não na ausência do endotélio (Figura 25 A). O valor da  $CE_{50}$  correspondeu a 21,5 (14,2 – 28,8) µg/ml. O efeito relaxante máximo foi atingido na concentração de 100 µg/mL, com  $E_{MAX} = 95,2 \pm 3,2\%$ . O relaxamento do EHDS foi abolido na ausência do endotélio vascular (88,8 % de inibição), na presença do L-NA, um inibidor da eNOS (100 µM; aproximadamente 53% de inibição); minimamente afetado pela combinação das toxinas caribdotoxina (100 nM) mais apamina (100 nM) que inibe o EDHF (redução de 18,3% no relaxamento vascular), e fortemente reduzido pela combinação dos inibidores L-NA com a caribdotoxina e a apamina (93,6 % de inibição) (C). A intensidade do relaxamento induzido pelo EHDS foi potencializada pela indometacina (10 µM) inibidor da ciclooxigenase (B). De forma semelhante, a incubação da atropina (1 µM), antagonista de receptores muscarínicos, aumentou o efeito vasodilatador induzido pelo EHDS (D), sem interferir no relaxamento máximo em ambos casos. Estes resultados indicam que o EHDS causa um relaxamento dependente do endotélio, envolvendo predominantemente o NO, mas com participação menos, porém importante, do EDHF. Entretanto, diferente do ocorrido em aorta de rato, esses resultados descartam o envolvimento de prostanóides e dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante do EHDS.



**Figura 25: Caracterização do efeito vasorrelaxante induzido pelo EHDS em anéis de artéria coronária de porco.** Os gráficos mostram: Anéis com e sem endotélio foram contraídos com U46619 antes da adição de concentrações crescentes do EHDS. Os gráficos mostram: **(A)** o relaxamento dependente do endotélio produzido pelo EHDS; **(B)** o efeito da indometacina (10  $\mu\text{M}$ ) em anéis de coronária providos de endotélio vascular; **(C)** o efeito do L-NA (100  $\mu\text{M}$ ), apamina (100 nM) e caribdotoxina (100 nM) e suas combinações sobre o relaxamento induzido pelo EHDS; **(D)** o efeito relaxante do EHDS na presença de atropina (1  $\mu\text{M}$ ) em artéria com endotélio preservado. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 6 experimentos. \* $p < 0,05$  para o efeito inibitório em relação ao controle (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.3.2 Participação da calmodulina, mas não da quinase II dependente de calmodulina (CaMKII), no efeito vasorrelaxante dependente do NO induzido pelo EHDS

A eNOS é classificada como uma enzima constitutiva muito dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  para ser ativada de forma direta ou através da fosforilação por enzimas dependentes do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulina}$ , como a CaMKII. (Fleming *et al.* 2001 ; Busse & Mulsch 1990). A incubação do calmidazólio (10  $\mu\text{M}$ , um inibidor de calmodulina), causou uma redução parcial do relaxamento produzido pela EHDS (aproximadamente 40 % de inibição) (Figura 26 A), mas o tratamento prévio dos anéis de coronária com um inibidor seletivo da CaMKII não interferiu no efeito relaxante do EHDS (Figura 26 B). Estes resultados indicam que o efeito vasodilatador do EHDS envolve parcialmente a ativação da eNOS pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , mas descarta o envolvimento da CaMKII.

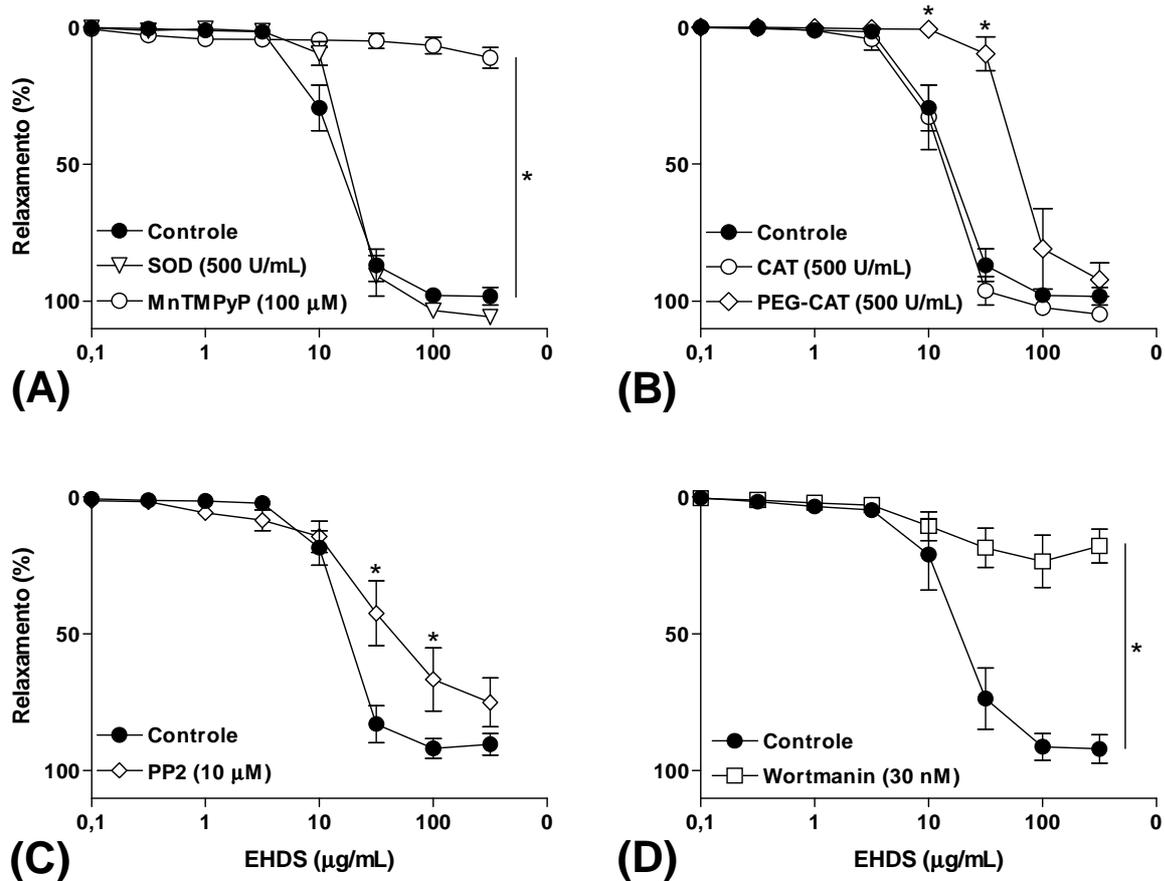


**Figura 26: Envolvimento da Calmodulina, independente da ativação da CaMKII, no relaxamento dependente do NO induzido pelo EHDS em artéria coronária de porco.** Diferentes anéis desta artéria foram incubados com **A** calmidazólio (10  $\mu\text{M}$ ) ou **B** KN-93 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos antes da contração com U46619 e subsequente adição do EHDS. Os resultados são mostrados representam a média  $\pm$  EPM de 6 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  para o efeito inibitório em relação ao controle (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

### 4.3.3 Participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e da via Src quinase e PI3K/Akt no relaxamento induzido pelo EHDS

Vários estudos têm demonstrado que o aumento da produção endotelial de ROS pode preceder o relaxamento vascular (Anselm *et al.*, 2007). Neste estudo, o efeito vasorrelaxante induzido pelo EHDS (0,1 – 300 µg/mL) em artéria coronária de porco foi inibido significativamente pela PEG-catalase (polietilenoglicol-catalase; PEG-CAT, 500 U/mL, permeante da membrana) e bloqueado pelo MnTMPyP (um mimético da SOD, permeável à membrana; 100 µM), com aproximadamente 90 % de inibição, enquanto que a SOD (SOD, 500 U/mL) e a catalase (CAT, 500 U/mL) nativas não apresentaram qualquer efeito sobre o relaxamento vascular (Figura 27 A e B, respectivamente).

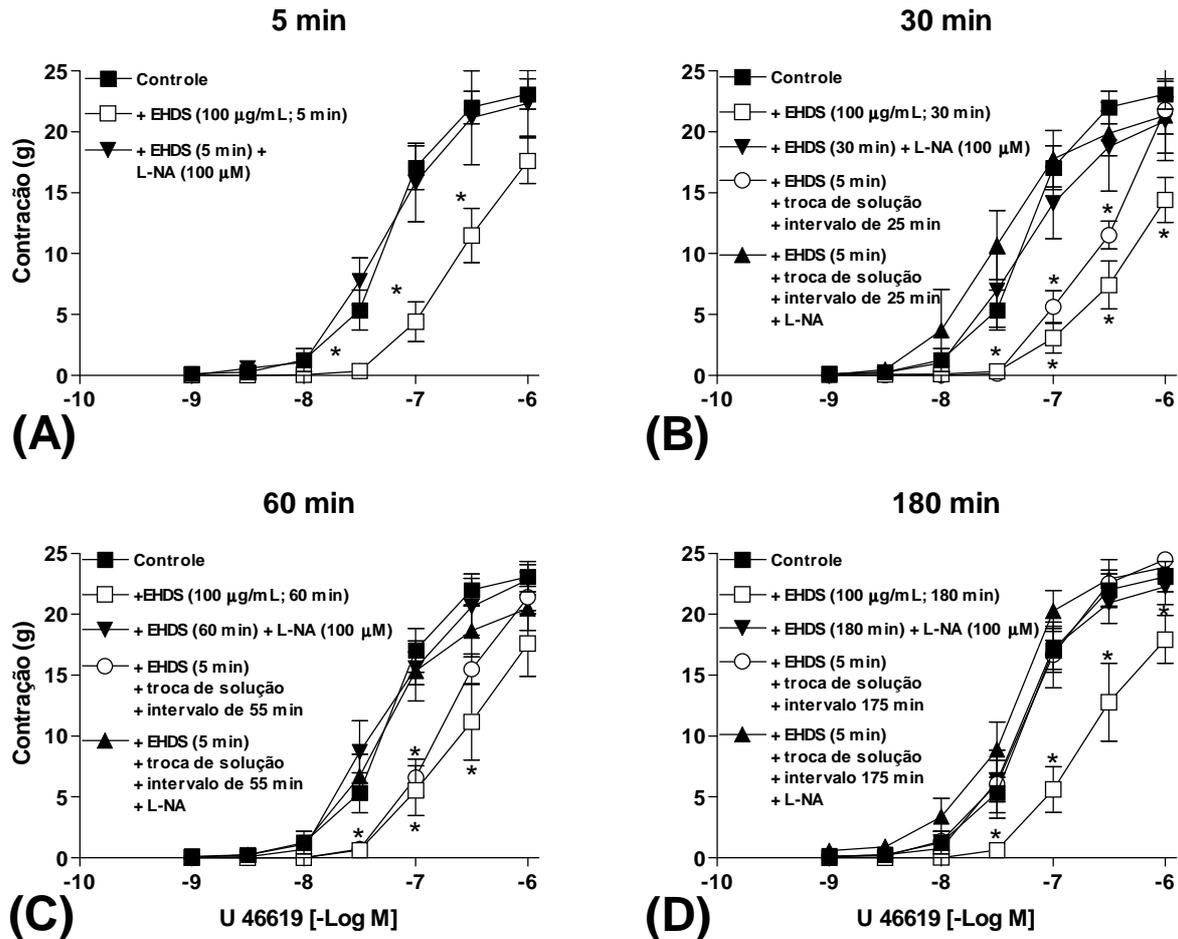
Tem sido demonstrado que a ativação da Src pelos eventos redox gera a ativação da via PI3K/Akt nas células endoteliais (Haynes *et al.* 2003; Yoshizumi *et al.* 2000). Portanto, foram realizados experimentos visando investigar o papel da Src no relaxamento produzido pelo EHDS. O PP2 (10 µM), um inibidor da Src, reduziu significativamente o relaxamento produzido por 30 e 100 µg/mL de EHDS (Figura 27 C). O wortmanina (30 nM), inibidor da via PI3K/Akt, praticamente aboliu o relaxamento induzido pelo EHDS (80 % de inibição) (Figura 27 D).



**Figura 27: Participação da ativação da quinase redox-sensível Src e da via PI3K/Akt no relaxamento dependente de endotélio induzido pelo EHDS.** O relaxamento dos anéis de artérias coronárias de porco não foi alterado pela incubação com SOD nativa (500 U/mL) **(A)**, ou catalase nativa (CAT, 500 U/mL) **(B)**. Entretanto houve redução significativa do relaxamento na presença do mimético permeante da SOD, o MnTMPyP (100 µM) **(A)** e do análogo da catalase permeável à membrana, a PEG-catalase (500 U/mL) **(B)**. O inibidor de Src, PP2 (10 µM) **(C)** e o wortmaninaa, inibidor da PI3K, (30 nM) **(D)**, também inibiram o efeito vasorrelaxante do EHDS. Todos os compostos foram incubados durante 30 minutos antes da contração com U46619 e posterior relaxamento com o EHDS. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 6 diferentes experimentos. \*  $p < 0,05$  para o efeito inibitório em relação ao controle (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### **4.3.4 Efeito do EHDS sobre as resposta contráteis induzidas pelo U46619 em artérias coronárias de porco**

Verificou-se que a exposição dos anéis das artérias coronárias ao EHDS (100 µg/mL) durante 5, 30, 60 ou 180 minutos (3 horas) antes da adição de concentrações cumulativas do U46619 (1 nM to 1 µM; análogo do TXA<sub>2</sub>) reduziu significativamente as contrações nos anéis com endotélio preservado, causando um deslocamento da curva de contração à direita em todos os tempos avaliados (Figura 28). Quando o EHDS foi incubado somente durante 5 minutos, seguido pela troca do líquido nutritivo (consequente remoção do extrato), este efeito inibitório permaneceu durante os 55 minutos seguintes (após a remoção do extrato pela troca do líquido) (Figura 28 C). Em todos os casos, o efeito inibitório do EHDS foi prevenido pelo L-NA (100 µM; 30 min), indicando que este efeito ocorre devido ao aumento da formação endotelial do NO (Figura 28 A, B, C e D).

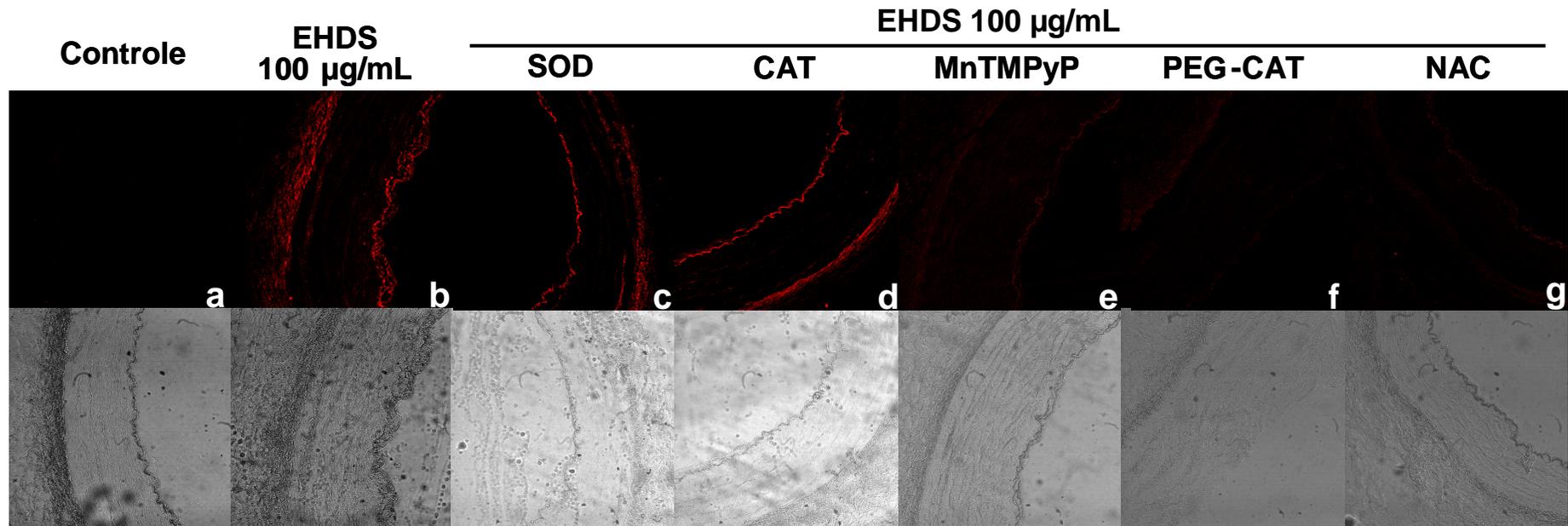


**Figura 28: O efeito do EHDS nas contrações induzidas pelo U46619 em anéis de artéria coronária de porco com endotélio.** Os gráficos representam a curva cumulativa do U 46619 em presença ou ausência do EHDS (100 µg/mL), com ou sem L-NA (100 µM, 30 min), em diferentes tempos de avaliação: 5 min (A), 30 min (B), 60 min (C) e 180 min (D). Como indicado, alguns anéis foram expostos ao EHDS durante somente os primeiros 5 minutos, e o EHDS foi removido através de três trocas sucessivas de solução nutritiva. Foram aguardados diferentes intervalos de tempo antes da contração pelo U46619 (indicadas nas legendas de cada gráfico), para verificar a duração do efeito na ausência do EHDS. Os resultados são mostrados como a média  $\pm$  SEM de 6 experimentos distintos. \*  $p < 0,05$  para o efeito inibitório da contração em relação ao controle (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

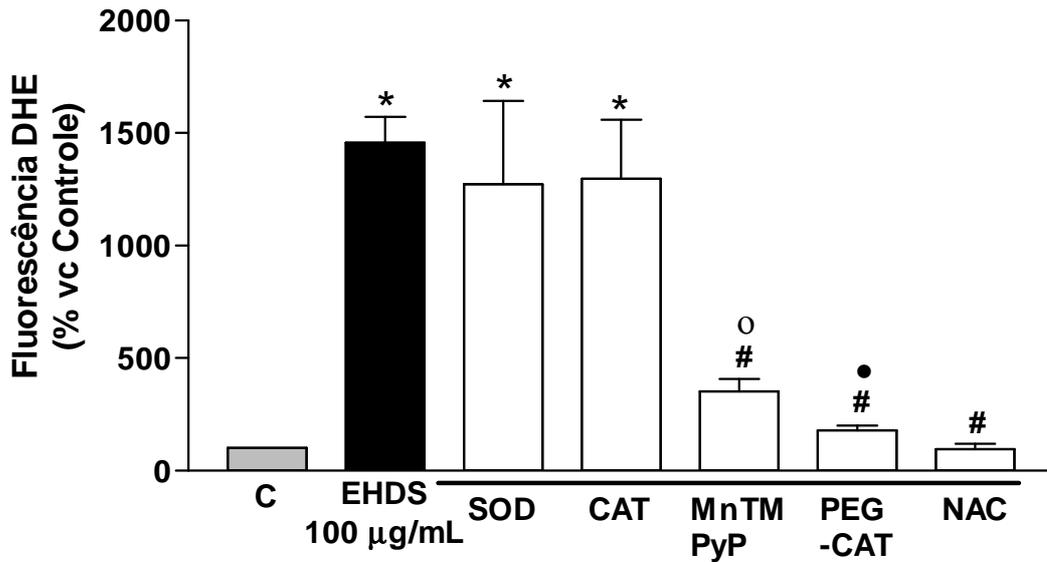
#### 4.3.5 Efeito do EHDS na formação de ROS em secções de artéria coronária de porco

Tem sido demonstrado que os compostos fenólicos causam uma resposta pró – oxidante que causa a ativação da via PI3K/Akt e o aumento da formação do NO (Stoclet *et al.* 2004). Para avaliar a produção de ROS induzida pelo EHDS nesses vasos, secções de artérias coronárias foram expostas à diidroetidina (DHE) e a habilidade do EHDS estimular a produção de ROS (especialmente ânions superóxido) no interior das células endoteliais foi avaliada *in situ*. Em comparação com o controle (Figura 29, painel A - a) o EHDS aumentou visivelmente o sinal de fluorescência, predominantemente na camada endotelial (Figura 29 A-b). Os tratamentos prévios com SOD (500 U/mL) ou catalase (500 U/mL) não alteraram a fluorescência (Figura 29, painel A - c e d). Entretanto, as substâncias permeantes da membrana, o MnTMPyP (100 µM), a PEG-catalase (500 U/mL) e NAC (N-acetilcisteína; 10 mM) aboliram a produção de ROS endotelial (Figura 29, painel A - e, f e g). O painel inferior B mostra os dados cumulativos das densitometrias das imagens obtidas em diferentes artérias submetidas às mesmas condições experimentais.

(A)



**Figura 29 A: O EHDS induz a formação endotelial de ROS em seções de artéria coronária de porco.** Artérias controle (a) ou tratadas com o EHDS 100 µg/mL (b) na ausência ou presença de SOD (500 U/mL) (c), catalase (CAT, 500 U/mL) (d), MnTMPyP (100 µM) (e), Peg-catalase (500 U/mL) (f) ou NAC (10 mM) (g) incubados durante 30 minutos antes do extrato. Todas as amostras foram em seguida expostas à sonda DHE 10 µM e avaliadas por microscopia confocal para obtenção das imagens com fluorescência (imagens na linha superior) e respectivas imagens ópticas (linha inferior).

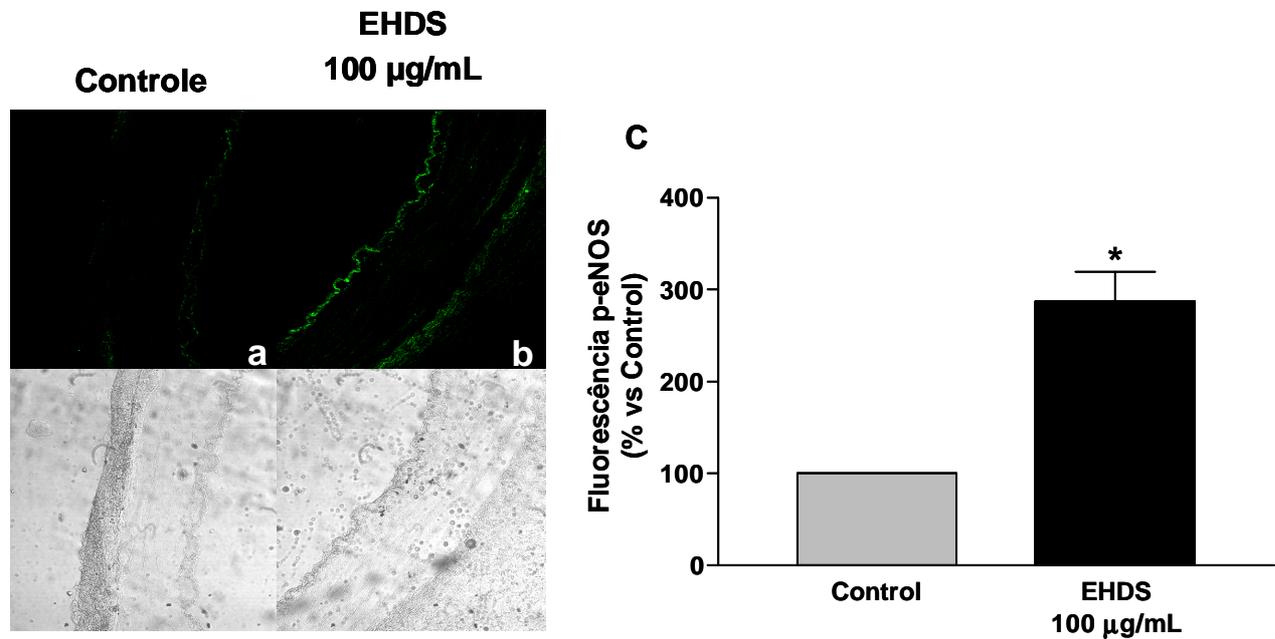
**(B)**

**Figura 29 B:** Representação gráfica das médias de fluorescência da DHE obtidas em secções de 6 artérias coronárias distintas, submetidas aos tratamentos com o EHDS 100 µg/mL (barra escura) na ausência ou presença de SOD (500 U/mL), catalase (CAT, 500 U/mL), MnTMPyP (100 µM), Peg-catalase (500 U/mL) ou N-acetil cisteína (NAC; 10 mM) incubados durante 30 minutos antes do extrato. \*  $p < 0.05$  versus controle; #  $p < 0.05$  EHDS; o  $p < 0.05$  versus SOD; •  $p < 0.05$  versus CAT (ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni).

#### 4.3.6 Efeito do EHDS na fosforilação na Ser 1177 da eNOS em secções de artéria coronária de porco.

Em células endoteliais a ativação da eNOS pode ocorrer devido a fosforilação do resíduo de Ser 1177 dependente da Akt (Dimmeler *et al.* 1999). Portanto, para verificar o efeito do EHDS (100 µg/mL) na ativação da eNOS por fosforilação, foi conduzido um experimento de imunohistoquímica em secções de artéria coronária de porco, utilizando anticorpo seletivo para a eNOS ativada por fosforilação em Ser 1177. O EHDS (100 µg/mL, 10 min) induziu um forte aumento da fosforilação da eNOS em Ser1177 eNOS (Figura 30 b) quando comparado à condição basal, sem o extrato

(Figura 30 a). A quantificação densitométrica mostrou o aumento de fluorescência correspondente a  $287 \pm 32$  % causado o tratamento com EHDS 100  $\mu\text{g/mL}$ , após 10 minutos de exposição (Figura 30 c).



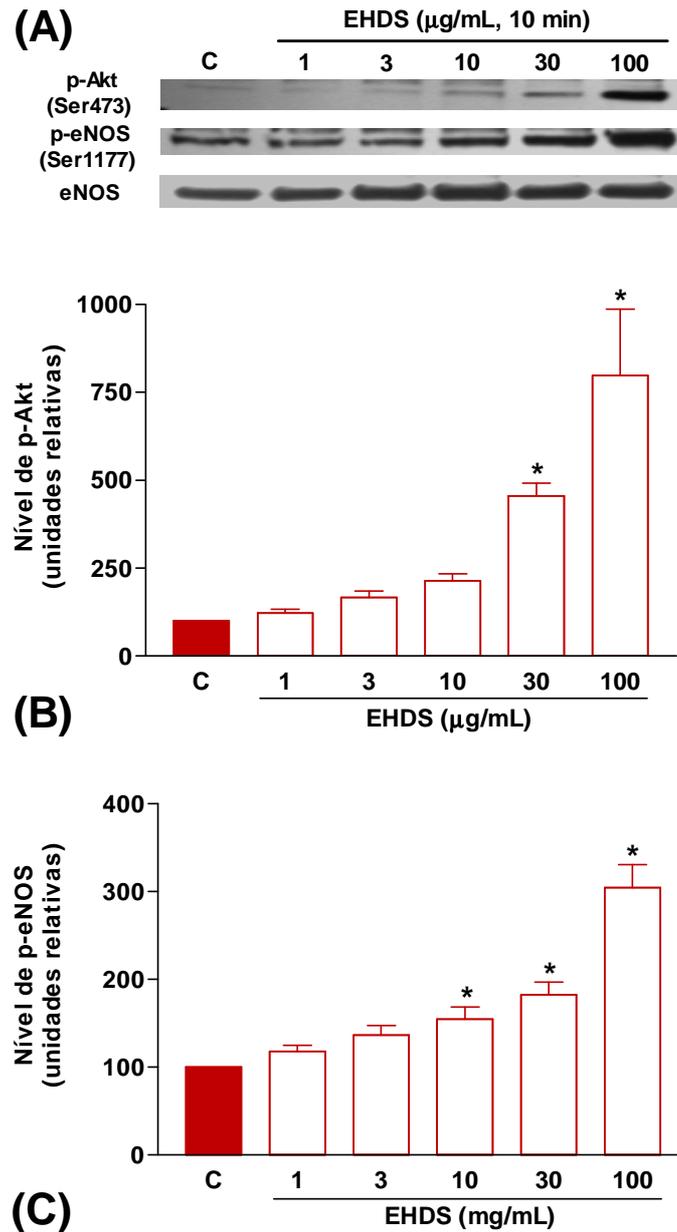
**Figura 30: Imunohistoquímica utilizando um anticorpo seletivo para eNOS fosforilada em Ser1177 em secções de artéria coronária de porco. (a)** foto original representativa de uma secção arterial do grupo controle (sem tratamento com o extrato) e **(b)** aumento da fosforilação da eNOS após exposição ao EHDS (100  $\mu\text{g/mL}$ , durante 10 minutos); **(c)** gráfico correspondente às médias  $\pm$  EPM de 6 diferentes experimentos. \*  $p < 0,01$  (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### 4.3.7 Efeito do EHDS na ativação redox-sensível da Src e subsequente fosforilação da eNOS dependente da via PI3-kinase/Akt

Para melhor caracterizar a via de sinalização endotelial envolvida na produção do NO em resposta ao EHDS, os níveis de fosforilação das proteínas Src, Akt e eNOS foram investigados em cultura de células endoteliais de artéria coronária de porco após diferentes tratamentos, similares aos descritos nos experimentos de reatividade vascular.

#### **4.3.7.1 Efeito dependente da concentração do EHDS na fosforilação da Akt e da eNOS em células endoteliais de artéria coronária de porco**

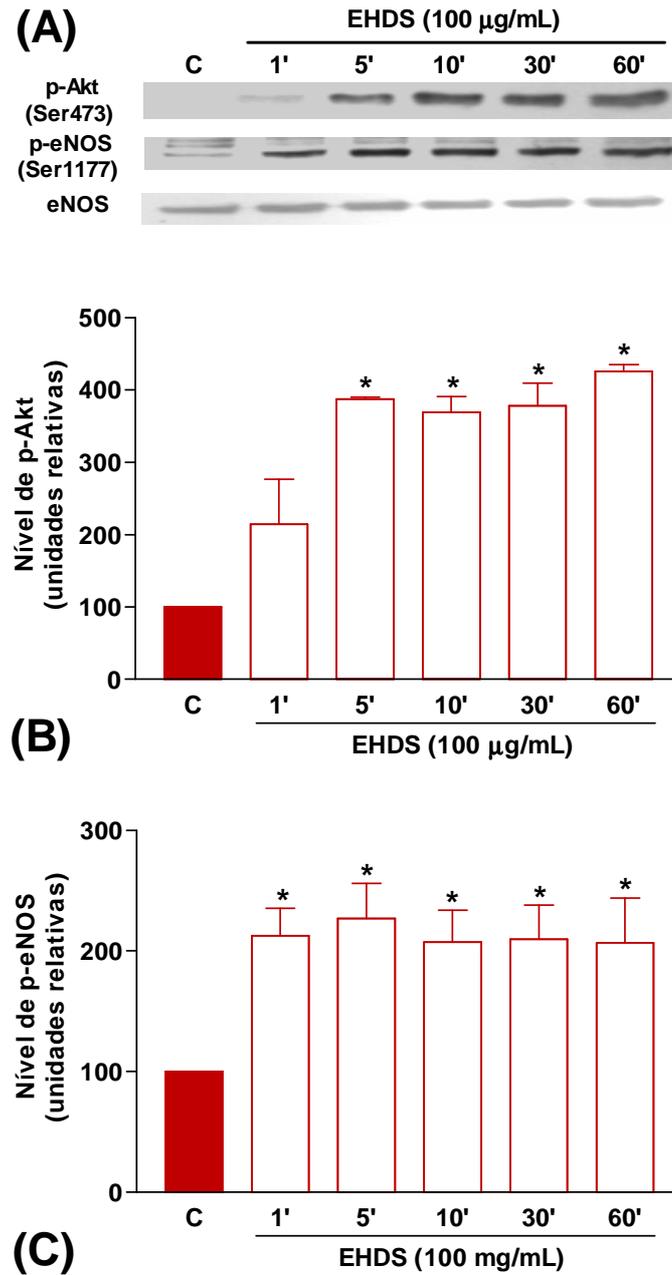
O EHDS (1 a 100 µg/mL, 10 min) induziu o aumento da fosforilação das proteínas Akt na Ser473 e da eNOS na Ser1177 em cultura de células endoteliais da artéria coronária de porco (Figura 31 A). Os níveis de fosforilação da Akt foram maiores nas células tratadas com as concentrações de 30 e 100 µg/mL, cujos valores em porcentagem corresponderam a 355% e 680%, respectivamente (Figura 31 B). Esta tendência também foi observada quanto aos níveis de fosforilação da eNOS, nos quais observou-se um aumento de 82 % e 204 % nas concentrações de 30 e 100 µg/mL (Figura 31 C)



**Figura 31:** O EHDS induz fosforilação da Akt na Ser473 e da eNOS na Ser1177 de forma dependente da concentração em cultura de células endoteliais de coronária de porco. **(A)** Imunoblots representativos; **(B)** e **(C)** correspondem à análise densitométrica das bandas para p-Akt e p-eNOS. Os resultados são mostrados como a média  $\pm$  EPM de 3 a 4 experimentos. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle, indicado pela letra "C" (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### **4.3.7.2 Efeito do tempo de incubação do EHDS sobre a fosforilação da Akt e da eNOS em células endoteliais de artéria coronária de porco**

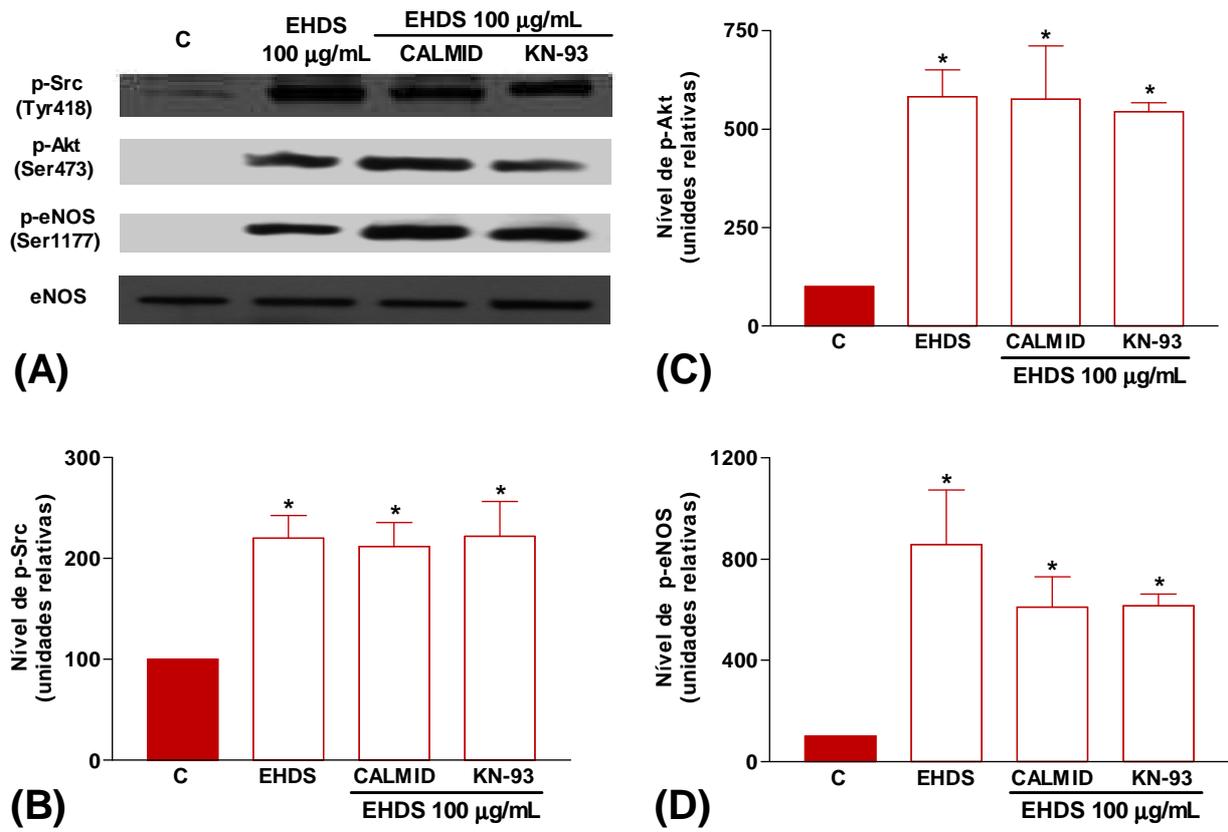
A exposição das células endoteliais ao EHDS 100 µg/mL causou a fosforilação intensa da Akt e da eNOS desde os primeiros minutos de exposição ao extrato (Figura 32 A). Em relação ao grupo controle “C” houve um aumento da p-Akt correspondente a 115% e 287%, respectivamente no 1º e 5º minutos após a incubação do extrato. Estes níveis de fosforilação se mantiveram estáveis durante os 60 minutos subseqüentes (B). Os níveis de fosforilação da p-eNOS tiveram um aumento de 112% no 1º minuto de tratamento com o extrato. De forma semelhante, esta fosforilação se manteve durante todo o período avaliado (C).



**Figura 32: O EHDS induz uma rápida fosforilação da Akt a Ser473 e da eNOS a Ser1177 em cultura de células endoteliais de coronária de porco. (A)** imunoblots representativos; **(B)** e **(C)** mostram a análise densitométrica das bandas para p-Akt e p-eNOS nos diferentes tempos de exposição ao extrato. O resultados são mostrados como a média  $\pm$  EPM de 3 a 4 experimentos. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle representado pela letra “C” (ANOVA de uma via seguida pelo teste *t* de Bonferroni).

#### **4.3.7.3 Efeito dos inibidores de calmodulina e CaMKII nos níveis de fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidos pelo EHDS**

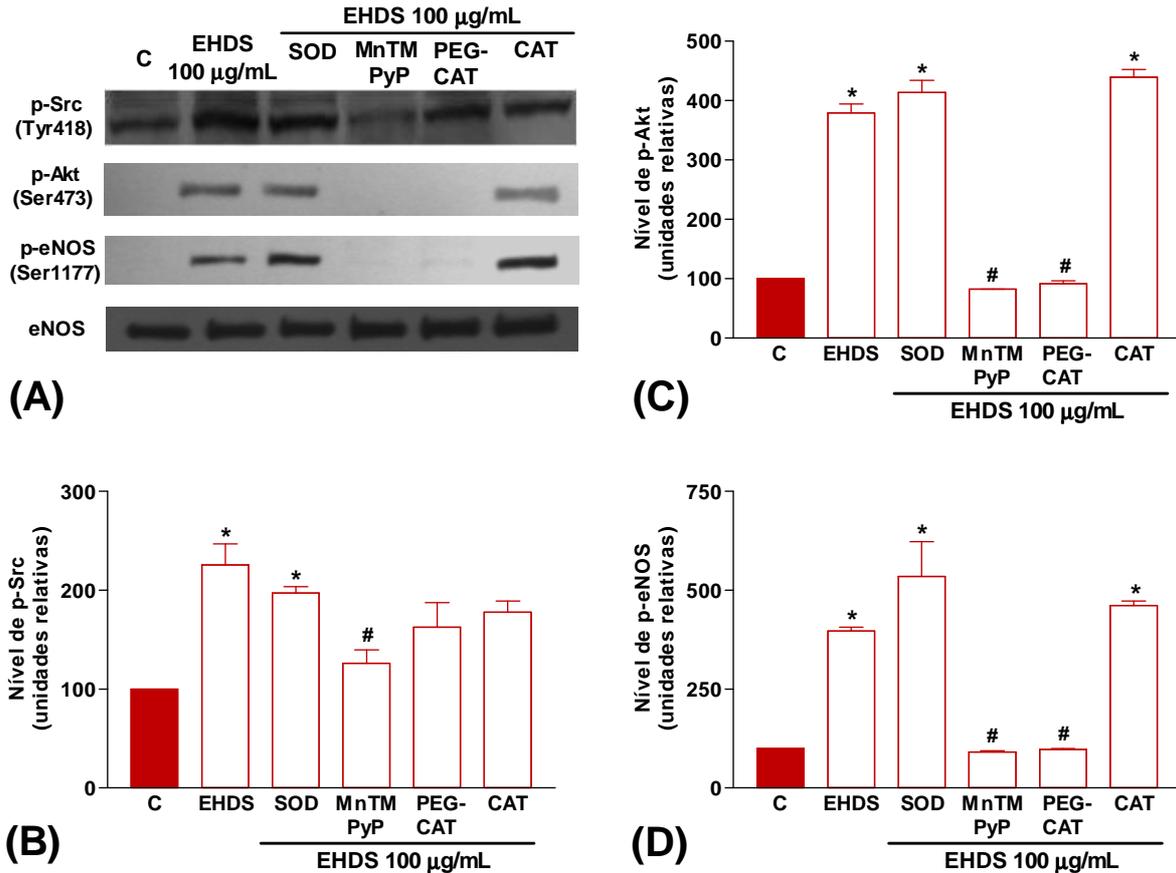
O EHDS 100 µg/mL, incubado durante 10 minutos, foi capaz de aumentar significativamente os níveis de fosforilação da Src no resíduo de Tyr418, com porcentagem correspondente a 120 % (Figura 33 - A e B). Entretanto, os níveis de p-Src não foram modificados na presença do calmidazólio (10 µM; inibidor da calmodulina) ou com o KN-93 (10 µM; inibidor da CaMKII). Resultados semelhantes foram obtidos para os níveis de fosforilação da Akt (B) e da eNOS (Figura 33 - C), nos quais houve um aumento de 482% (p-Akt) e 759 % (p-eNOS), os quais não foram modificados com os tratamentos prévios com o calmidazólio ou com o KN-93.



**Figura 33: Papel da calmodulina e da CaMKII nos níveis de fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidos pelo EHDS.** As células foram incubadas com o calmidazólio (CALMID; 10 µM; inibidor da calmodulina) ou com KN-93 (10 µM; inibidor da CaMKII) durante 30 min antes do tratamento com o EHDS (100 µg/mL, 10 minutos). Os níveis de p-Src **(B)**, p-Akt **(C)** e p-eNOS **(D)** foram determinados através de Western blot. **(A)** Imunoblots representativos. Os resultados correspondem à média ± EPM de 3 a 4 experimentos. \*  $p < 0.05$  versus o controle, representado pela letra "C"; #  $p < 0,05$  em relação ao EHDS (ANOVA de uma via seguida pelo teste *t* de Bonferroni).

#### **4.3.7.4 Participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) na fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidas pelo EHDS em cultura de células endoteliais**

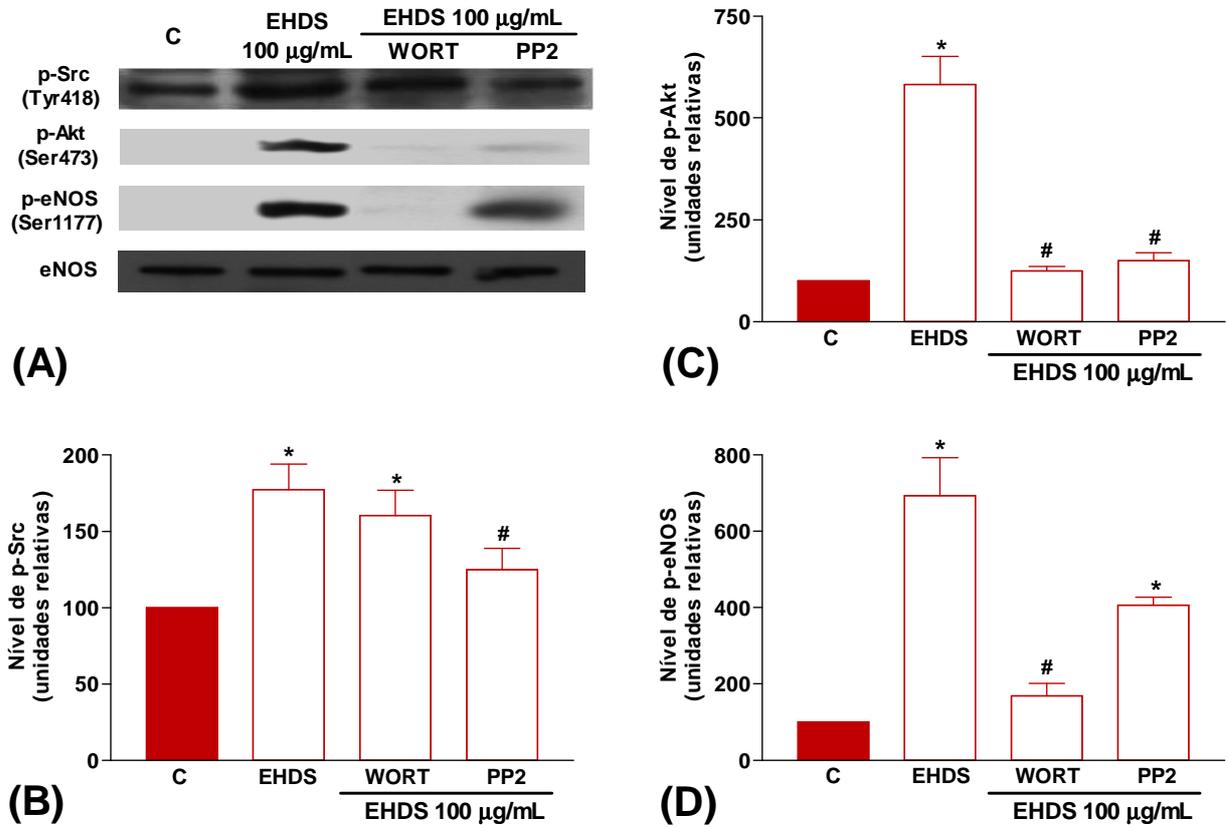
Os níveis de fosforilação da Src, da Akt e da eNOS foram fortemente aumentados pelo tratamento das células endoteliais com o EHDS (100 µg/mL), durante 10 minutos (Figura 34 A). As porcentagens corresponderam respectivamente a 125 % (p-Src), 280 % (p-Akt) e 296 % (p-eNOS). A fosforilação da Src foi inibida significativamente pelo MnTMPyP (100 µM; análogo da SOD permeável na membrana), mas não pela PEG-catalase (500 U/mL; catalase permeável na membrana) (Figura 34 B). Tanto os níveis da p-Akt (Figura 34 C) e da p-eNOS (Figura 34 D) foram reduzidos aos valores basais pelo pré-tratamento das células endoteliais com os MnTMPyP e a PEG-catalase. Esses dados confirmam o envolvimento das ROS intracelulares na ativação da produção do NO pelas células endoteliais estimulada pelo EHDS. Em todos os casos, os níveis de fosforilação não foram alterados na presença das enzimas SOD (500 U/mL) e catalase (CAT) (500 U/mL).



**Figura 34: Participação das ROS na fosforilação da Src, Akt e eNOS induzidas pelo EHDS em cultura de células endoteliais de artéria coronária de porco.** As células foram incubadas com SOD (500 U/mL), MnTMPyP (100 µM; análogo da SOD permeável na membrana), PEG-catalase (500 U/mL; catalase permeável na membrana), ou catalase (CAT, 500 U/mL) durante 30 min antes da adição do EHDS (100 µg/mL). Os níveis de p-Src, p-Akt e p-eNOS foram determinados através de Western blot, no qual **(A)** Immunoblots representativos; **(B)**, **(C)**, e **(D)** representam à análise densitométrica das bandas para p-Src, p-Akt e p-eNOS, respectivamente. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 3 a 4 experimentos. \*  $p < 0,05$  versus o controle, representado pela letra "C"; #  $p < 0,05$  em relação ao EHDS (ANOVA de uma via seguida pelo teste *t* de Bonferroni).

#### **4.3.7.5 Efeito do EHDS na ativação da via Src, PI3K/Akt em células endoteliais de artéria coronária de porco.**

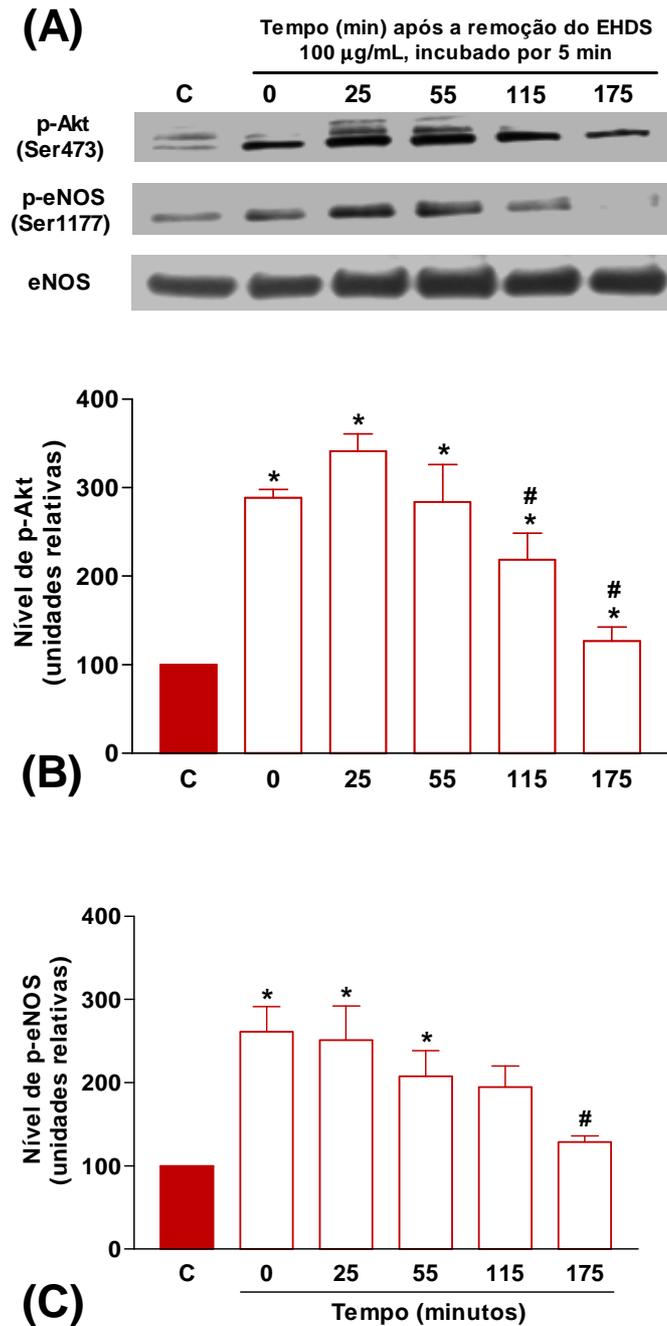
O wortmaninaa (30 nM), inibidor da via PI3K/Akt, impediu a fosforilação da Akt e da eNOS nas células endoteliais, mas não inibiu a fosforilação da Src (uma vez que esta precede a via PI3K/Akt) (Figura 35 A). As porcentagens de inibição da p-Akt e da p-eNOS corresponderam respectivamente a 78,7% e 75,5% (Figura 35 C e D) em presença do wortmaninaa. O tratamento das células com o PP2 (10  $\mu$ M; inibidor da Src) promoveu uma inibição dos níveis da p-Src em 29,4% (Figura 35 B), da p-Akt em 74 % (Figura 35 C) e da p-eNOS em 41,3% (Figura 35 D). Esses dados confirmam a ativação da via PI3K/ Akt na produção do NO estimulada pelo EHDS.



**Figura 35: O EHDS induz a ativação da via Src- PI3-kinase/Akt em células endoteliais de artéria coronária de porco.** As células foram incubadas com wortmaninaa (30 nM; inibidor da via PI3K/Akt), ou PP2 (10 µM; inibidor da Src), durante 30 minutos antes da adição do EHDS (100 µg/mL). Os níveis de p-Src, p-Akt e p-eNOS foram determinados por Western blot. **(A)** Immunoblots representativos; **(B)**, **(C)**, e **(D)** representam à análise densitométrica das bandas para p-Src, p-Akt e p-eNOS, respectivamente. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 3 a 4 experimentos. \*  $p < 0,05$  versus o controle, representado pela letra "C"; #  $p < 0,05$  em relação ao EHDS (ANOVA de uma via seguida pelo teste *t* de Bonferroni).

#### **4.3.7.6 Duração da fosforilação da Akt e da eNOS após a remoção do EHDS da cultura de células endoteliais de artéria coronária de porco**

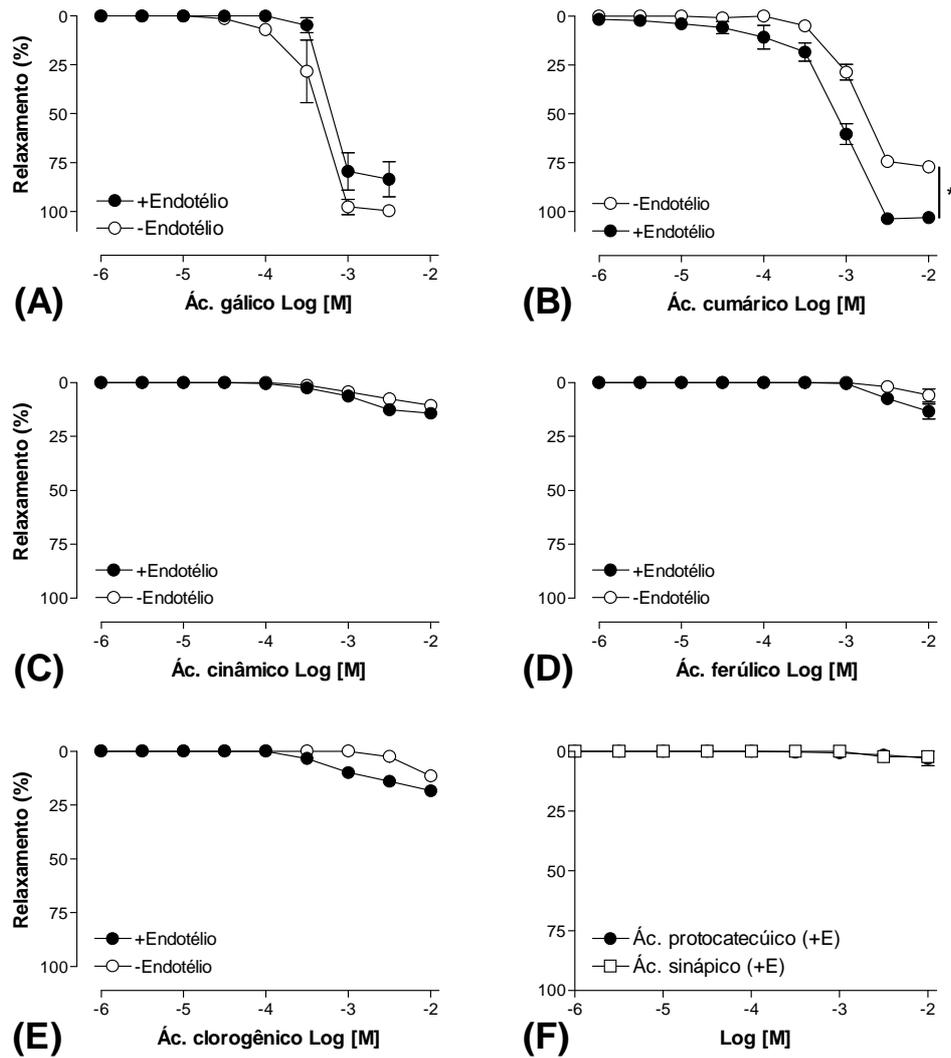
Em células endoteliais tratadas com o EHDS (100 µg/mL) durante 5 minutos e avaliadas após 25, 55, 115 e 175 minutos, observou-se que a fosforilação da Akt e da eNOS ocorreu mesmo na ausência do extrato e que atingiu o efeito máximo no tempo de 25 minutos depois da troca do meio e consequente remoção do extrato da cultura celular. O aumento médio nos níveis de fosforilação correspondeu a 188,4% para p-Akt e 161,3% para a p-eNOS. Entretanto, após 55 minutos, a fosforilação de ambas as proteínas retornou gradativamente aos níveis iniciais, atingindo os níveis basais no tempo de 175 minutos após a troca do meio (Figura 36 A, B e C)



**Figura 36: Duração do efeito do EHDS na fosforilação da Akt e da eNOS após a remoção do extrato.** A fosforilação da Akt **(B)** e da eNOS **(C)** em cultura de células endoteliais foi investigada em diferentes intervalos de tempo após o tratamento com o EHDS (100 µM) durante 5 minutos seguido pela remoção do extrato após a troca do meio de cultura. **(A)** Immunoblots representativos. Os resultados correspondem à média ± EPM de 3 a 4 experimentos. \*  $p < 0,05$  versus o controle, representado pela letra “C”; #  $p < 0,05$  em relação ao EHDS 25 min (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### **4.3.8 Efeito vasorrelaxante dos compostos fenólicos do EHDS em artéria coronária de porco**

O relaxamento dos anéis de artéria coronária foi observado após a adição do ácido gálico ( $E_{MAX} = 83,5 \pm 7\%$ ) (Figura 37 A) e também do ácido cumárico ( $E_{MAX} = 103 \pm 2,64\%$ ). Somente o relaxamento vascular induzido pelo ácido cumárico foi significativamente reduzido após a remoção do endotélio vascular das preparações (25,24% de inibição) (Figura 37 B). A administração do ácido cinâmico ( $E_{MAX} = 14,3 \pm 1,5 \%$ ) (Figura 37 C), do ácido ferúlico ( $E_{MAX} = 13,5 \pm 3,5 \%$ ) (Figura 37 D), e do ácido clorogênico ( $E_{MAX} = 18,5 \pm 1,5 \%$ ) (Figura 37 E) resultaram em uma fraca atividade vasodilatadora. O ácido protocatecúico e o ácido cinâmico não apresentaram atividade vasorrelaxante significativa (Figura 37 F).



**Figura 37: Efeito vasorrelaxante dos compostos fenólicos identificados no extrato hidroalcoólico de *Dicksonia sellowiana* (EHDS).** Os gráficos mostram os efeitos dos compostos fenólicos: ácido gálico (A), cumárico (B), cinâmico (C), ferúlico (D), clorogênico (E), protocatecúico e sinápico (F), adicionados em anéis de artéria coronária de porco, com ou sem endotélio vascular, previamente contraídos com U46619. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM de 3 a 5 experimentos por composto. \* $p < 0.05$  em relação à curva em anéis contendo endotélio preservado (+ Endotélio, ou +E) (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

## V DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos vasculares e antioxidantes do EHDS, extrato hidroalcoólico padronizado das folhas de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook (Dicksoniaceae). Esta planta é distribuída nos países da América Central e do Sul, especialmente no Brasil, onde é usada pelas populações indígenas para o tratamento da asma, doenças cutâneas e parasitárias (Marquesini, 1995). Apesar de não haver na literatura indicações da utilização desta planta para tratar patologias cardiovasculares, uma preparação fitoterápica tem sido testada em voluntários asmáticos no Brasil e foram relatados efeitos benéficos contra diversas doenças, inclusive cardiovasculares. A preparação do extrato (o mesmo usado neste trabalho) e o uso farmacológico da *D. sellowiana* encontram-se patenteados no Brasil e nos Estados Unidos (Ferreira, 2004).

Os experimentos realizados em aorta isolada de rato (vaso de condutância) demonstraram que o EHDS induz um relaxamento mediado pela via NO/GMPc, uma vez que este efeito foi totalmente bloqueado pelo L-NAME (um inibidor das NO sintases) e pelo ODQ (inibidor da guanilil ciclase) (Fig. 16 B e C). Várias plantas de diversas famílias demonstraram ser capazes de relaxar artérias através do estímulo da liberação do NO endotelial, como por exemplo a *Maytenus ilicifolia* (Rattmann *et al.*, 2006), a *Dioclea grandiflora* (Lemos *et al.*, 1999), a *Harconia speciosa* (Ferreira *et al.*, 2007) e a *Euterpe oleraceae* (Rocha *et al.*, 2007). Esse fato reforça a existência de uma classe comum de compostos amplamente distribuídos no reino vegetal que possuem esta atividade. Essas substâncias são provavelmente os compostos fenólicos, aos quais são atribuídos diversos efeitos cardiovasculares benéficos, frequentemente mediados pelo NO (Liu, 2004).

O NO, após ser liberado pelo endotélio, difunde-se para a camada de células musculares lisas, atravessa as membranas, liga-se ao ferro hêmico da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) e estimula a produção do GMPc. Várias outras moléculas que possuem o grupo heme em sua estrutura podem ter suas funções moduladas pelo NO (Nathan, 1992), dentre elas encontra-se a cicloxigenase (COX) (Corbett *et al.*, 1993; Franchi *et al.*, 1994; Salvemini *et al.*, 1994). Esta enzima produz, dentre outros metabólitos, a PGI<sub>2</sub>, um vasodilatador bem estabelecido (Moncada *et al.*, 1977), cuja ação resulta na estimulação da adenilil ciclase, aumento do AMPc e ativação da PKA (Gorman *et al.*, 1977; Tateson *et al.*, 1977; Fatalvero *et al.*, 2007). Embora nossos resultados demonstrem claramente a habilidade do EHDS em relaxar a aorta através da ativação da GCs pelo NO, observou-se que a utilização da indometacina, inibidor da ciclooxygenase (COX), bem como a utilização do KT 5720, inibidor da PKA, reduzem parcialmente o relaxamento vascular produzido pelo EHDS (Fig. 17 A e B). Juntos, estes dados demonstram que a ativação da COX e da PKA podem contribuir para o efeito relaxante do EHDS, especialmente quando a produção do NO não é inibida, sugerindo uma interação entre o NO e a COX no efeito vasorrelaxante do EHDS em aorta de rato.

Tanto o NO quanto a PGI<sub>2</sub> são descritos como ativadores de canais de K<sup>+</sup> na membrana das células musculares lisas (Baranowska *et al.*, 2007; Nelson e Quayle, 1995). O aumento da condutância dos íons K<sup>+</sup> hiperpolariza as células e reduz o influxo de íons Ca<sup>+2</sup> através dos seus canais operados por voltagem, presentes na membrana celular (Archer *et al.*, 1994), o que gera relaxamento vascular. É descrito que o NO pode modular a ação de canais de potássio através da PKG (Archer *et al.*, 1994), através do GMPc (Williams *et al.*, 1988), ou ainda por ação direta do NO sobre estes

canais iônicos (Bolotina *et al.*, 1994; Mistry & Garland, 1998). Os canais de K<sup>+</sup> também podem ser alvos da via dependente do AMPc/PKA (Ko *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

A contribuição dos canais de K<sup>+</sup> na vasodilatação induzida pelo EHDS em anéis de aorta foi investigada neste estudo. A incubação da glibenclamida ou da 4-aminopiridina nos vasos não interferiu no efeito vasodilatador do EHDS, sugerindo que os canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP e os canais de K<sup>+</sup> sensíveis à voltagem não são determinantes neste efeito (Figura 18 A). Por outro lado, o relaxamento induzido pelo EHDS foi significativamente reduzido pelo tetraetilamônio, um inibidor não seletivo de canais de K<sup>+</sup> (Figura 18 B), deslocado para a direita pela apamina, um inibidor seletivo de canais de K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup> de baixa condutância (SKCa) (Figura 18 C) e abolido pela caribdotoxina, um inibidor de canais de K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup> de intermediária e alta condutância (IKCa e BKCa) (Figura 18 D). De fato, o aumento da condutância ao K<sup>+</sup> por estímulo do NO ou da PGI<sub>2</sub> tem sido relacionados aos efeitos vasculares de diversas plantas e compostos isolados (Testai *et al.*, 2002; Rattmann *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008).

A liberação do NO e a conseqüente ação deste mediador endotelial pode ser estimulada por diversas substâncias, endógenas ou não, que agem em receptores localizados na membrana das células endoteliais. São exemplos, a acetilcolina (Furchgott, 1983), a bradicinina (Cherry *et al.*, 1982), a histamina (Van de Voorde & Leusen, 1982), a serotonina (Cohen *et al.*, 1983) e ainda a substância P, o ATP e o ADP (Griffith *et al.*, 1984). Nossos resultados demonstraram que a atropina (um antagonista seletivo dos receptores muscarínicos), mas não a pirilamina (antagonista dos receptores H1), é capaz de inibir a vasodilatação e a hipotensão induzidas pelo EHDS, *in vitro* (Figura 19 A e B) e *in vivo* (Figura 21 B e C). Estes dados sugerem que na composição do extrato existe(m) substância(s) que pode(m) agir como agonistas

dos receptores muscarínicos presentes nas células endoteliais (ver esquema na Figura 38, painel A).

Com o objetivo de concentrar o composto vasoativo majoritário e facilitar o seu isolamento e identificação, foram obtidas as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e etanólica a partir do EHDS. Todas estas frações foram testadas em aorta isolada de rato com endotélio preservado para verificar se o efeito vasorrelaxante seria potencializado em alguma destas frações. Entretanto, todas as frações necessitaram de concentrações muito maiores que a do EHDS para induzirem efeitos vasorrelaxantes parciais. As frações mais efetivas foram a acetato de etila ( $33,7 \pm 3,2$  %) e a fração etanólica ( $44,2 \pm 2,7$  %), cujos efeitos máximos foram obtidos na concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto o efeito relaxante máximo do EHDS ( $92,4 \pm 2,2$ %) foi obtido com a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 4). Estes dados sugerem que o efeito final do extrato depende da somatória das ações dos compostos que constituem o EHDS, os quais foram separados com o fracionamento, resultando na redução da eficácia. Casos semelhantes foram relatados anteriormente na literatura científica (Gelati *et al.*, 2008; Miceli *et al.*, 2005; Sforcin *et al.*, 2005).

A exposição ao EHDS e às frações não provocou efeitos deletérios nos tecidos, uma vez que houve reversibilidade dos efeitos *in vitro* e *in vivo*. Esses dados podem ser reforçados por um estudo realizado por Santos (2006) (relatório industrial não publicado), o qual mostrou que o EHDS não provoca efeito tóxico, mesmo quando administrado em camundongos em doses únicas superiores a 5000 mg/Kg. A  $DL_{50}$  da administração crônica (90 dias) foi 1069 e 1461 mg/Kg, respectivamente, para machos e fêmeas (resultados não publicados).

Foi determinada a concentração de compostos fenólicos na composição do EHDS, a qual correspondeu a aproximadamente 50% do seu conteúdo (Bora *et al.*,

2005). É descrito que estes compostos podem exercer proteção vascular através de duas formas: (a) por meio da ação direta nas células endoteliais, resultando no aumento da síntese e liberação do NO (Furchgott 1993; Arnal 1997), ou (b) devido à habilidade desses compostos de prevenirem a oxidação do NO, aumentando a sua biodisponibilidade (Paravicini & Touyz 2008; Riccioni & Bazzano 2008).

Portanto, para investigar o quanto a capacidade antioxidante do EHDS pode contribuir para a preservação do NO e o seu efeito vasorrelaxante, utilizamos as mesmas concentrações e doses do EHDS testadas em ratos para avaliar o potencial antioxidante do EHDS em sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente foi avaliada a capacidade do EHDS em seqüestrar o  $O_2^{\bullet-}$ , o  $\bullet OH$  e o  $H_2O_2$ , além do radical sintético  $\bullet DPPH$ . Os resultados claramente demonstraram que o EHDS foi tão efetivo quanto os controles positivos (ácido ascórbico e manitol) em sequestrar os radicais  $\bullet DPPH$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$  e  $H_2O_2$ . A atividade antioxidante do EHDS ocorreu de forma dependente da concentração e os valores de  $CI_{50}$  variaram entre 2 e 12  $\mu g/mL$  (Figura 22 A, B, C e D). Efeitos semelhantes foram observados para outros extratos de plantas, porém em concentrações mais altas (Bhattarai *et al.*, 2008; Lotulung *et al.*, 2008; Boumerfeg *et al.*, 2009; Rigano *et al.*, 2009). As  $CI_{50}$  observadas para o EHDS nos testes com o  $\bullet DPPH$ , o  $\bullet OH$  e o  $O_2^{\bullet-}$  foram comparáveis às obtidas com os compostos isolados kaempferol, catequina, ramnetina, ácido protocatecúico, ácido siríngico e patuletina (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2004; He *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008).

O  $O_2^{\bullet-}$  é o principal radical livre na maioria dos sistemas biológicos (Winterbourn e Kettle, 2003). Embora o  $O_2^{\bullet-}$  por si só seja pouco reativo comparado a outros radicais livres, os sistemas biológicos podem dismutá-lo a  $H_2O_2$ , o qual em presença de um metal de transição como o íon  $Fe^{3+}$ , se decompõe no radical  $\bullet OH$ , altamente reativo e

envolvido em diversas patologias (Pardini, 1995). Além disso, o  $O_2^{\bullet-}$  pode reagir com o  $NO^{\bullet}$ , reduzir sua biodisponibilidade e originar as espécies reativas de nitrogênio como o  $NO_2$  (dióxido de nitrogênio),  $N_2O_4$  (tetróxido de nitrogênio) e  $ONOO^-$  (peroxinitrito), os quais também modificam várias moléculas constituintes das células (Pacifci e Davies, 1991). Nos nossos experimentos, 92,66% do  $O_2^{\bullet-}$  foi seqüestrado pelo EHDS a baixas concentrações (50  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 22 B). Esta atividade, isoladamente, pode reforçar a hipótese de preservação do NO liberado pelas células endoteliais durante o tratamento com o EHDS, podendo contribuir indiretamente para os efeitos vasorrelaxante e hipotensor (ver Figura 38). Na literatura científica, diversos trabalhos relacionam a atividade antioxidante de plantas ao aumento da biodisponibilidade do NO no sistema cardiovascular (Stoclet *et al.*, 2004; Sarr *et al.*, 2006; Campana *et al.*, 2008; Maslov e Lishmanov, 2008).

O efeito do EHDS também foi avaliado frente ao dano oxidativo causado pelo  $H_2O_2$  em cultura de células endoteliais de aorta de coelho. O  $H_2O_2$  pode atravessar facilmente a membrana e exercer efeitos lesivos nos tecidos por vários mecanismos, interferindo, por exemplo, na homeostase intracelular do  $Ca^{2+}$ , reduzindo o ATP intracelular (Hyslop *et al.*, 1998), danificando o DNA (Schraufstatter *et al.*, 1988), e induzindo apoptose (Fujita *et al.*, 2000). Em células vasculares, o  $H_2O_2$  reage com peroxidases para formar moléculas fortemente reativas como o HOCl (hipoclorito) (Reiter *et al.*, 2003) e espécies nitrosilantes (Lakshmi *et al.* 2005). Além disso, o estresse oxidativo induzido pelo  $H_2O_2$  gera o desacoplamento das NOS, o qual eleva a produção intracelular do  $O_2^{\bullet-}$  (Fleming & Busse, 1999; Pryor & Squadrito, 1995; Kojda & Harrison, 1999). Em nossos experimentos, quando as células endoteliais foram tratadas com o EHDS 10, 30 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , antes da exposição ao  $H_2O_2$  (10  $\mu\text{M}$ , 15 min), o extrato inibiu intensamente a fluorescência produzida pela diclorofluoresceína (DCF)

na presença do  $H_2O_2$ , de maneira dependente da concentração do EHDS (Figura 23 A e B), indicando a diminuição do  $H_2O_2$  livre. A inibição máxima induzida pelo EHDS 50  $\mu\text{g/mL}$  (169,2%) foi a mesma obtida com a rutina 70  $\mu\text{g/mL}$  (166,5%), um composto isolado reconhecido pela sua capacidade antioxidante elevada. Vários estudos tem relatado o efeito protetor dos extratos contra o dano das células endoteliais induzido pelo  $H_2O_2$  (Peng *et al.*, 1998; Vitor *et al.*, 2004; Coyle *et al.*, 2006; Coyle *et al.*, 2007).

Existem duas rotas principais envolvidas na remoção do  $H_2O_2$  dos sistemas biológicos, desempenhadas pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase. A glutathione peroxidase é a maior via de eliminação do  $H_2O_2$  em condições fisiológicas, enquanto a catalase torna-se uma via gradativamente mais importante com o aumento das concentrações de  $H_2O_2$ , como as encontradas em condições patológicas (Cohen & Hochstein, 1963). Portanto, para verificar a possível ativação da enzima catalase, alguns testes foram realizados em rato. As amostras de sangue dos animais pré-tratados com o EHDS 10, 20 e 40 mg/Kg foram usadas para determinar a atividade da catalase através da decomposição do  $H_2O_2$  (Aebi, 1984), mas não foi observada nenhuma diferença estatística significativa entre os animais tratados com o EHDS e o grupo controle (Figura 24 A), sugerindo que o EHDS não estimula a função catalítica desta enzima nas doses avaliadas. Para confirmar este resultado, um teste *in vitro*, usando a catalase purificada (12 U/mL), foi realizado e não apresentou nenhuma diferença estatística na comparação entre os controles com as amostras contendo o EHDS (dado não mostrado). Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o efeito protetor do EHDS contra o dano celular ocasionado pelo  $H_2O_2$  pode resultar de uma propriedade seqüestradora direta do  $H_2O_2$  pelo extrato (como mostrado na Figura 22 D) e não do aumento na atividade da enzima catalase.

Durante o estresse oxidativo os lipídeos das membranas celulares são continuamente expostos à ação oxidante dos radicais livres. Essas substâncias subtraem um átomo de hidrogênio das cadeias insaturadas de ácidos graxos das membranas lipídicas, iniciando o processo de peroxidação lipídica (LPO), a qual propaga como uma reação em cadeia. Neste processo, vários peróxidos são gerados, os quais originam aldeídos como o malonaldeído (MDA). Este dano oxidativo à membrana pode interferir nas vias de transdução de sinais e podem conseqüentemente afetar vários processos intracelulares. Neste estudo, as doses de 20 e 40 mg/Kg do EHDS inibiram significativamente a peroxidação lipídica avaliada pela quantidade do MDA gerado no plasma dos ratos (Figura 24 B). Portanto, este resultado sugere a possibilidade do EHDS prevenir a indução e/ou progressão de várias doenças caracterizadas por uma lipoperoxidação intensa, como a aterosclerose, hipertensão e processos inflamatórios, dentre outras patologias (Santanam *et al.*, 1998; Hirrlinger *et al.*, 2002; Xu & Touyz, 2006; Yanagisawa *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram observados com os extratos das plantas *Tagetes mendocina* e *Ajuga iva* e com o extrato de sementes da uva (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2004; Cetin *et al.*, 2008; Taleb-Senouci *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, uma atenção considerável tem sido dedicada à identificação de produtos naturais com atividade antioxidante para o uso em humanos. Vários compostos naturais, especialmente os polifenóis existentes no chá verde, no óleo de oliva, chocolate e vinho tinto tem sido associados à prevenção de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares e pulmonares em modelos experimentais e em estudos clínicos (Scalbert *et al.*, 2005; Everitt *et al.*, 2006; Fito *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). Como citado anteriormente, uma preparação fitoterápica do EHDS (a mesma usada em nossos testes) tem sido testada em voluntários asmáticos, e estes tem

relatado (em depoimentos informais na mídia) efeitos benéficos em outras doenças, incluindo em patologias cardiovasculares como a hipertensão. Curiosamente, os resultados descritos neste estudo sugerem que o EHDS pode ser útil na prevenção de danos oxidativos, um processo comum a várias doenças. Portanto, ao menos em parte, a ainda suposta propriedade terapêutica do EHDS para o tratamento da asma, parasitoses, doenças cutâneas e cardiovasculares podem ser futuramente relacionadas à atividade do EHDS no sequestro de radicais livres e na inibição da peroxidação lipídica .

A terceira fase do estudo das ações do EHDS consistiu em verificar os seus efeitos em artéria coronária de porco (vaso de resistência) e em suas células endoteliais. As coronárias representam um bom modelo na farmacologia cardiovascular, uma vez que são alvos importantes das principais doenças vasculares. Neste vaso, o EHDS causou o relaxamento dos anéis com endotélio vascular preservado, de forma dependente da concentração (Figura 25 A). Este efeito foi inibido na presença do L-NA (inibidor das NOS) e afetado em menor proporção pela associação de caribdotoxina + apamina, ambos bloqueadores de canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , envolvidos no mecanismo de ação vasorrelaxante do EDHF em vasos de resistência (Félétou & Vanhoutte, 2007). A combinação do L-NA com a apamina e a caribdotoxina aboliu o relaxamento induzido pelo EHDS em artéria coronária de porco (Figura 25 C). Estes resultados demonstram a participação de ambos mediadores vasorrelaxantes, NO e EDHF, porém com predominância do NO no mecanismo vasorrelaxante do extrato em vasos de resistência.

Entretanto, diferente do observado em aorta de rato, o relaxamento induzido pelo EHDS em artéria coronária não envolve a formação de prostanóides relaxantes ou a ativação de receptores muscarínicos. Curiosamente, o relaxamento foi discretamente

potencializado em presença de indometacina (inibidor da COX) (Figura 25 B). Corroborando com este resultado, algumas evidências indicam que os metabólitos do ácido araquidônico, como a  $PGH_2$ , a  $PGE_2$  e a  $PGI_2$ , são capazes de induzir uma pequena contração em coronária de porco (Dustin *et al.*, 1977). Portanto, na presença da indometacina, a produção destes metabólitos torna-se inibida e isso favorece a vasodilatação induzida pelo EHDS, cujo efeito torna-se potencializado. Por outro lado, o efeito vasorrelaxante do EHDS também foi potencializado na presença de atropina (antagonista muscarínico) (Figura 25 D). Muitos trabalhos demonstram a vasodilatação de aorta isolada de rato após ativação de receptores muscarínicos por extratos de plantas e outras substâncias (Koh *et al.*, 2007; Kwan *et al.*, 2007; Vasques *et al.*, 1999). Porém, resultados semelhantes em artéria coronária de porco não são encontrados, pois a ativação dos receptores muscarínicos deste vaso não causa vasodilatação, mas sim contração (Harasawa *et al.*, 1989), um evento confirmado por vários estudos (Tsuchida *et al.*, 1996; Weirich *et al.*, 2005; Yamanoue *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1990; Church & Hodgson, 2002; Myers *et al.*, 1991).

Nas células endoteliais, a liberação do NO pode ocorrer em consequência do aumento da concentração intracelular do  $Ca^{2+}$ , dependente ou não da ativação de receptores localizados na membrana das células endoteliais. Após o aumento da concentração intracelular do  $Ca^{2+}$  ocorre a associação deste íon com a calmodulina (CaM), formando o complexo  $Ca^{2+}/CaM$ , o qual é capaz de ativar a eNOS. A formação do NO e a vasodilatação ocasionada pela estimulação dessa via podem ser abolidas por substâncias antagonistas da CaM (Fleming & Busse, 1999). Além de ativar a eNOS, a CaM também pode modular outras enzimas intracelulares, como a proteína quinase II dependente da calmodulina, ou CaMKII. Esta enzima também pode ativar a produção do NO através da adição de um fosfato na Ser 1177 da eNOS, um sítio

importante de ativação desta enzima. Esse efeito é passível de inibição pelo KN-93, um inibidor da CaMKII (Cai *et al.* 2008; Fleming *et al.*, 2001). Em nossos experimentos, a incubação com o calmidazólio (inibidor da calmodulina) reduziu em 40% o efeito vasorrelaxante causado pelo EHDS, em artéria coronária de porco. Porém, o KN-93 não interferiu no relaxamento do EHDS (Figura 26 A e B). Estes resultados foram confirmados em cultura primária de células endoteliais de artéria coronária de porco através de análise por Western blot (Figura 33 A e D). Em conjunto, esses dados indicam que o efeito do EHDS é parcialmente dependente do complexo  $Ca^{2+}/CaM$ , porém independente da fosforilação da eNOS induzida pela CaMKII.

Alguns estudos tem indicado que os polifenóis também são capazes de ativar a eNOS por meio da fosforilação mediada pela via da Src-PI3K/Akt (Stoclet *et al.*, 2004). Vários trabalhos demonstram que a ativação da Src nas células endoteliais está diretamente relacionada à formação intracelular de ROS (espécies reativas de oxigênio), especialmente do  $O_2^{\bullet -}$  (Ndiaye *et al.*, 2003; Ndiaye *et al.*, 2004; Ndiaye *et al.*, 2005). Além dos polifenóis, diversos estímulos fisiológicos, incluindo estrogênios, estresse de cisalhamento, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF),  $H_2O_2$ , e lipoproteína de alta densidade, podem estimular esta via (Corson *et al.*, 1996; Garcia-Cardena *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 2001; Michell *et al.*, 1999; Mineo *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2002). Portanto, as ROS estimulam a Src, a qual ativa a via PI3K/Akt, com conseqüente ativação da eNOS (ver Figura 10). Vários experimentos foram realizados para determinar a participação das ROS e da via Src-PI3K/Akt no relaxamento vascular induzido pelo EHDS. Na presença dos análogos da SOD e da catalase permeantes da membrana (MnTMPyP e PEG-catalase, respectivamente) houve forte redução do efeito vasorrelaxante do EHDS, enquanto a SOD e a catalase nativas não interferiram no efeito deste extrato (Figura 27 A e B). Este resultado indica

um papel importante do  $H_2O_2$ , mas principalmente do  $O_2^{\bullet-}$  no mecanismo de ação do EHDS em coronárias de porco. Além disso, o MnTMPyP e a PEG-CAT também preveniram a fosforilação da Akt na Ser473 e da eNOS na Ser 1177 em cultura de células endoteliais de coronária de porco (Figura 34 A, C e D). Uma evidência direta de que o EHDS é capaz de causar uma resposta endotelial pró-oxidante, sensível à ação dos antioxidantes permeáveis N-acetilcisteína, MnTMPyP e PEG-catalase, foi obtida com o uso da sonda dihidroetidina (DHE) em secções de artéria coronária de porco (Figura 29 A e B). Embora a origem destas ROS nas células endoteliais permaneça a ser determinada, possíveis fontes incluem a NADPH oxidase, a xantina oxidase e o citocromo P450 (Long *et al.*, 2000; Roques *et al.*, 2002; Sarr *et al.*, 2006; Ullrich & Bachschmid, 2000).

O EHDS também causou a ativação da via PI3K/Akt, conforme indicado pelos experimentos de reatividade vascular utilizando o wortmaninaa (Figura 27 D), nos quais houve uma grande inibição do efeito vasorrelaxante nas artérias coronárias. Este resultado foi confirmado em cultura de células endoteliais de coronárias de porco, nas quais o EHDS promoveu uma intensa fosforilação da Akt na Ser473 e da eNOS na Ser1177 a qual foi inibida em presença do wortmaninaa (Figura 35 A, C e D). Estes experimentos também confirmam o envolvimento da Src no efeito vasorrelaxante do EHDS (Figura 27 C), bem como da conseqüente ativação da PI3K que conduz à fosforilação da Akt e posteriormente da eNOS nas células endoteliais. Na presença do PP2, inibidor da Src, foram observadas importantes inibições nas fosforilações da Akt e da eNOS (Figura 35 A, C e D). Esses resultados também indicam que a Src precede a ativação da via PI3K/Akt. Além disso, a fosforilação da Src induzida pelo EHDS foi inibida seletivamente pelo uso do MnTMPyP, mas não pela PEG-catalase, (Figura 34 A e B), enquanto ambas as substâncias inibiram a fosforilação da Akt e da eNOS

(Figura 34 A, C, e D). Isto sugere que num momento inicial o  $O_2^{\bullet-}$  parece desempenhar um papel mais importante na ativação da Src. Em seguida, o  $O_2^{\bullet-}$  pode ser parcialmente convertido a  $H_2O_2$  e, juntos, contribuir para a ativação da via PI3K/Akt (Thomas *et al.*, 2002) (ver Figura 38, painel B). Resultados semelhantes, envolvendo o aumento da formação endotelial de ânions superóxido e ativação da Src-PI3K/Akt foram relatados para importantes fontes de compostos fenólicos, por exemplo, aqueles provenientes do vinho tinto e sucos de uva (Anselm *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2009; Ndiaye *et al.*, 2003).

Nos experimentos de reatividade vascular, observamos que a inibição ocasionada pelo PP2 não foi proporcional à inibição do relaxamento vascular causada pelo wortmaninaa (Figura 27 C e D). Este dado pode sugerir uma via paralela de ativação que contribui para a ativação da via PI3K/Akt e que merece investigações futuras. Entretanto, baseando-se num estudo que demonstrou que a fosforilação da PI3K pode ocorrer por uma via sensível ao complexo  $Ca^{2+}/CaM$  em neutrófilos, interferindo na sua migração e produção de ROS estimulada por quimioatraentes (Verploegen *et al.*, 2002), pensamos inicialmente na possibilidade da via PI3K/Akt endotelial ser modulada pela calmodulina ou pela CaMKII. Porém, nossos experimentos não detectaram alteração da fosforilação da Akt (da Src ou da eNOS) pelo EHDS na presença do calmidazólio (inibidor da calmodulina) e nem do KN-93 (inibidor da CaMKII) nas células endoteliais (Figura 33 A, B, C e D), descartando essa hipótese.

O EHDS induziu uma ativação persistente da via da eNOS mesmo após um curto período de tratamento (5 minutos), tanto em anéis de artéria coronária, como em células endoteliais. Na reatividade vascular, o EHDS inibiu igualmente as contrações cumulativas induzidas pelo U46619 em todos os intervalos de tempo avaliados (5 a 180

minutos). A exposição das coronárias ao EHDS durante 5 minutos, seguido pela remoção do extrato, manteve o efeito inibitório sobre a contração por tempo superior a uma hora. Este efeito foi demonstrado como dependente da liberação do NO (Figura 28 A, B, C e D). Nas células endoteliais, a incubação do EHDS causou uma rápida fosforilação da Akt e da eNOS entre o 1º e 5º minutos de exposição (Figura 32 A, B e C). Além disso, as modificações nos níveis de fosforilação da Akt e da eNOS permaneceram inalteradas durante os 55 minutos após a curta exposição ao extrato (5 minutos), seguido por um lento declínio da fosforilação até próximo dos níveis basais em períodos subsequentes (Figura 36 A, B e C). Esses dados mostram a capacidade do EHDS em manter seu efeito durante longos períodos de tempo após a remoção do extrato das preparações.

As ROS e também as RNS (espécies reativas de nitrogênio, como o próprio NO) são bem conhecidas por desempenharem efeitos deletérios, mas também causam efeitos benéficos de acordo com as concentrações produzidas. Os efeitos benéficos dos radicais livres ocorrem em concentrações baixas ou moderadas e envolvem papéis fisiológicos na resposta celular como, por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos, regulação de vias de sinalização celular, apoptose e indução da resposta mitogênica (para revisão ver Valko *et al.*, 2007). Nos vasos sanguíneos, os efeitos fisiológicos mais descritos são: (a) resposta contrátil da vasculatura pulmonar em resposta à hipóxia, que ocorre através do bloqueio de canais de  $K^+$  operados por voltagem exercido pelas ROS  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ ; (b) o aumento da pressão luminal causada pelo fluxo sanguíneo, a qual parece ativar a NADPH oxidase e estimular os mecanismos de expressão gênica da SOD e da eNOS, através de vias endoteliais sensíveis ao balanço redox, envolvendo especialmente o  $H_2O_2$ ; (c) eventos relacionados à adaptação da função vascular aos exercícios físicos, os quais

ocasionam o aumento da expressão da eNOS e da SOD e que podem estar envolvidos na regressão da placa aterosclerótica, na neovascularização e no aumento da perfusão do miocárdio (para revisão ver Wolin, 2000).

Nos ensaios realizados em artéria coronária de porco verificou-se uma atividade pró-oxidante do EHDS nas células endoteliais. As espécies reativas de oxigênio são consideradas neste caso como mediadores fisiológicos envolvidos na ativação das vias de sinalização celular após a estimulação da produção de concentrações de ROS muito inferiores às que ocasionam lesões teciduais. Embora os polifenóis causem um sinal pró-oxidante modesto nas células endoteliais, em condições fisiológicas eles geralmente não induzem uma formação significativa de ROS na musculatura lisa vascular. Ao contrário, nestas células, foi descrito que os polifenóis previnem fatores indutores de crescimento, e a formação de ROS dependente da NADPH oxidase (Oak *et al.*, 2003), são capazes de sequestrar ânions superóxido, radicais peroxil, radicais hidroxil e peroxinitrito (Aldini *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1999), prevenir a expressão de enzimas pró-oxidantes como a NADPH oxidase e a xantina oxidase, e aumentar a expressão de enzimas antioxidantes como a catalase (Lin *et al.*, 2000; Ying *et al.*, 2003).

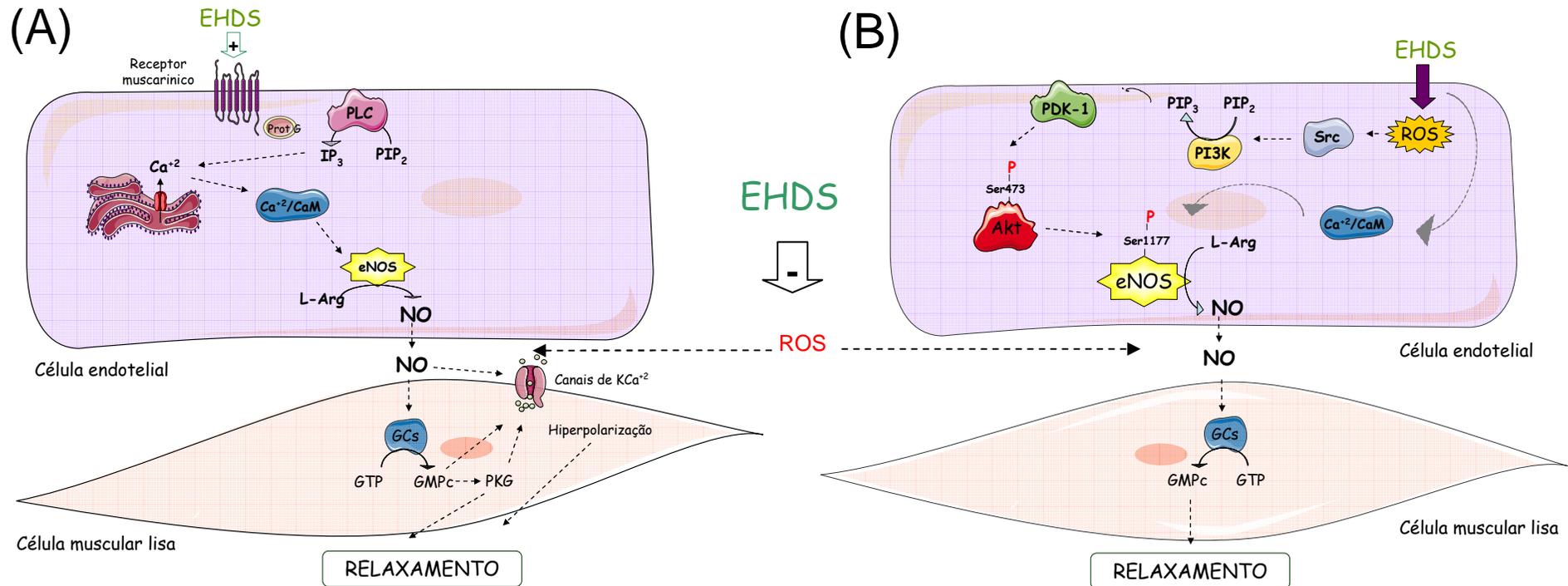
Através da análise do EHDS por HPLC-DAD, verificamos que este extrato é constituído majoritariamente por vários compostos fenólicos, incluindo os ácidos gálico, protocatecúico, ferúlico, sinápico, cinâmico, clorogênico e cumárico. Estes compostos foram adquiridos comercialmente e testados em anéis de artéria coronária de porco. A maioria dos compostos induziu relaxamento vascular discreto, exceto os ácidos protocatecúico e sinápico, que não produziram qualquer efeito (Figura 37 F). Somente o ácido cumárico e o ácido gálico induziram relaxamento vascular completo das preparações. A remoção do endotélio vascular não interferiu significativamente no

efeito do ácido gálico (Figura 37 A), mas causou uma inibição parcial (25,24%) do relaxamento induzido pelo ácido cumárico (o composto majoritário deste extrato) (Figura 37 B). Estes resultados estão em concordância com dados existentes na literatura (Taubert *et al.*, 2002; Andriambelason *et al.* 1998). Levando-se em consideração a potência do extrato, cujo efeito vasodilatador máximo em coronária de porco foi obtido em concentrações inferiores a 100 µg/mL, esses resultados podem sugerir a existência de outros compostos a serem identificados ou ainda a ocorrência de interações sinérgicas entre os seus constituintes. Além disso, entre os compostos que apresentaram pouca ou nenhuma atividade vasorrelaxante, deve ser considerada a capacidade antioxidante destes, a qual preserva o NO produzido por ação dos compostos mais ativos. Para todos eles, a atividade antioxidante já foi confirmada (Alamed *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2008; López-Giraldo *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2008).

Neste estudo demonstramos a capacidade do EHDS estimular a produção e liberação do óxido nítrico, bem como sua atividade antioxidante. O óxido nítrico desempenha um papel crucial no controle da homeostase vascular e a sua produção insuficiente contribui para a disfunção endotelial, uma alteração vascular envolvida na iniciação e no desenvolvimento de patologias cardiovasculares, tais como a hipertensão arterial e a aterosclerose (Mombouli and Vanhoutte, 1999; Luscher e Noll, 1994; Busse e Flemming, 1996; Russo *et al.*, 2002). Entre os medicamentos aprovados para o tratamento de doenças cardiovasculares em humanos existem poucas drogas disponíveis capazes de modular a produção endógena do NO. Este fato revela a importância dos estudos que podem contribuir com substâncias que contenham esta propriedade, tendo os produtos naturais como uma importante fonte.

Por fim, a Figura 38 ilustra os mecanismos propostos neste estudo para o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico das folhas da *Dicksonia*

*sellowiana* (EHDS) o qual age através da estimulação da produção endotelial do NO, por vias que diferem em vaso de condutância (aorta de rato) e em vaso de resistência (artéria coronária). Somado a isto, nas mesmas concentrações nas quais promove vasodilatação, o EHDS apresenta uma importante ação seqüestradora de radicais livres, que pode contribuir na preservação do NO liberado.



**Figura 38: Principais mecanismos envolvidos no relaxamento vascular mediado pelo NO após estimulação pelo EHDS em aorta isolada de rato (A) e em artéria coronária de porco (B).** Em aorta de rato, os resultados sugerem que o EHDS ativa os receptores muscarínicos na membrana das células endoteliais, os quais estimulam a produção do trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) pela enzima fosfolipase C (PLC). O IP<sub>3</sub> estimula a liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático e ocorre a formação do complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM, o qual estimula a produção do NO pela eNOS. O NO produzido se difunde para as células musculares lisas onde ativa a guanilil ciclase solúvel e os canais de K<sup>+</sup> da membrana, conduzindo ao relaxamento (A); em artéria coronária, os resultados indicam que o efeito do EHDS depende parcialmente do complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM, mas estimula a produção endotelial de ROS, que ativam a Src (proteína tirosina quinase), a qual converte do fosfatidil inositol 4,5- difosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) pela fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K). O PIP<sub>3</sub> é necessário para a reação de fosforilação (P) da Ser473 da Akt pela quinase PDK-1. A Akt, por sua vez, fosforila a Ser1177 da eNOS e inicia a produção do NO que se difunde para as células musculares lisas, ativam a guanilil ciclase solúvel e geram o relaxamento do vaso (B). Somado a estes mecanismos, o NO produzido pode ainda ser preservado devido à ação seqüestradora de radicais livres (ROS) exercida pelo EHDS.

## VI CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o extrato hidroalcoólico padronizado das folhas da planta *Dicksonia sellowiana* (EHDS) permitem afirmar que:

- ✓ O EHDS causa relaxamento vascular em aorta isolada de rato (vaso de condutância), bem como hipotensão em ratos anestesiados. Estes efeitos parecem ser mediados pela estimulação de receptores muscarínicos, ativação da via NO/GMPc e subsequente abertura de canais de potássio ativados pelo  $Ca^{2+}$  na membrana das células musculares lisas;
- ✓ O EHDS, testado nas mesmas concentrações e doses utilizadas nos testes em rato, apresentou ação seqüestradora dos radicais •DPPH, do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), do radical hidroxil ( $\bullet OH$ ), e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), eventos que podem contribuir para a preservação do NO e para a integridade dos tecidos. O EHDS também protegeu contra a ação do  $H_2O_2$  nas células endoteliais através de mecanismos independentes da estimulação da enzima catalase. Além disso, o EHDS protegeu contra a peroxidação lipídica.
- ✓ Em artéria coronária de porco e em células endoteliais deste vaso, o EHDS causou vasodilatação independente da ativação dos receptores muscarínicos, mas também dependente da estimulação da eNOS, neste caso mediada por duas vias: (i) ativação dependente do  $Ca^{2+}$  e da calmodulina (mas não da CaMKII) e, principalmente, (ii) estimulação da produção intracelular de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , espécies que estimulam a via Src-PI3K/Akt e induzem a fosforilação da

eNOS na Ser1177. Esta via gerou a produção sustentada do NO, que permaneceu estável por um longo período mesmo após a remoção do EHDS dos vasos ou da cultura de células endoteliais.

- ✓ Em conjunto, os dados do presente trabalho demonstram o potencial terapêutico da *D. sellowiana* para as condições patológicas relacionadas à disfunção endotelial.

## VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYWARDENA, M. Y. E R. J. HEAD. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. **Cardiovasc Res**, v.52, n.3, Dec, p.361-71. 2001.
- ADAMOPOULOS, S., PARISSIS J. T., KREMASTINOS, D. T. Endothelial dysfunction in chronic heart failure: clinical and therapeutic implications. **Eur J Intern Med**, v.13, n.4, Jun, p.233-239. 2002.
- AHMAD, N.& MUKHTAR H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. **Nutr Rev**, v.57, n.3, Mar, p.78-83. 1999.
- ALAMED, J., CHAIYASIT W., MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. **J Agric Food Chem**, v.57, n.7, Apr 8, p.2969-76. 2009.
- ALDERTON, W. K., COOPER C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v.357, n.Pt 3, Aug 1, p.593-615. 2001.
- ALDINI, G., CARINI M., PICCOLI, A. ; ROSSONI, G.; FACINO, R. M. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. **Life Sci**, v.73, n.22, Oct 17, p.2883-98. 2003.
- ALVAREZ, E., LEIRO J., ORALLO, F. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on respiratory burst of rat macrophages. **Int Immunopharmacol**, v.2, n.6, May, p.849-55. 2002.
- ANDRASI, T. B., SOOS P., BAKOS, G.; STUMPF, N.; BLAZOVICS, A.; HAGL, S. ; SZABO, G. L-arginine protects the mesenteric vascular circulation against cardiopulmonary bypass-induced vascular dysfunction. **Surgery**, v.134, n.1, Jul, p.72-9. 2003.
- ANDRAWIS, N., JONES D. S., ABERNETHY, D. R. Aging is associated with endothelial dysfunction in the human forearm vasculature. **J Am Geriatr Soc**, v.48, n.2, Feb, p.193-8. 2000.
- ANDRIAMBELOSON, E., MAGNIER C., HAAN-ARCHIPOFF, G.; LOBSTEIN, A. ; ANTON, R. ; BERETZ, A. ; STOCLET, J. C. ; ANDRIANTSITOHAINA, R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. **J Nutr**, v.128, n.12, Dec, p.2324-33. 1998.
- ANGULO, J., CUEVAS P., FERNANDEZ, A.; GABANCHO, S.; ALLONA, A.; MARTIN-MORALES, A.; MONCADA, I.; VIDELA, S.; SAENZ DE TEJADA, I. Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. **Biochem Biophys Res Commun**, v.312, n.4, Dec 26, p.1202-8. 2003.
- ANSELM E. Polyphenols vegetaux et protection vasculaire : role des facteurs endotheliaux. **Mémoire de diplôme d'état de docteur en pharmacie**. Université Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg – France, 122p; 2008
- ANSELM, E., M; CHATAIGNEAU, NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T. ; SCHINI-KERTH, V. B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-

- dependent activation of eNOS. **Cardiovasc Res**, v.73, n.2, Jan 15, p.404-13. 2007.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91(16): 7583-7587, 1994
- ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **Faseb J**, 7(2): 349-360, 1993.
- ARNAL, J. F. Nitric oxide and circulatory homeostasis. **Ann Cardiol Angeiol (Paris)**, v.46, n.7, Jul-Sep, p.420-5. 1997.
- AYAJIKI, K., M. KINDERMANN, HECKER, M.; FLEMING, I.; BUSSE, R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. **Circ Res**, v.78, n.5, May, p.750-8. 1996.
- BAEK, K. J.; THIEL, B. A.; LUCAS, S.; STUEHR, D. J. Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. **J Biol Chem**, 268(28): 21120-21129, 1993.
- BARANOWSKA, M., H. KOZLOWSKA, KORBUT, A.; MALINOWSKA, B. Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v.61, p.596-605. 2007.
- BAUER, K. A., EICHINGER S., MANNUCCI, P. M., ROSENBERG, R. D. Determinants of coagulation activation in humans. **Haemostasis**, v.26 Suppl 1, p.72-5. 1996.
- BELL, D. M., JOHNS T. E., BELL, D. M.; JOHNS, T. E.; LOPEZ, L. M. Endothelial dysfunction: implications for therapy of cardiovascular diseases. **Ann Pharmacother**, v.32, n.4, Apr, p.459-70. 1998.
- BENNETT, W. Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation. **Kluwer Academic**, 3rd ed Boston: 975-998, 1995.
- BHATTARAI, H. D., PAUDEL B., LEE, H. S.; LEE, Y. K. ; YIM, J. H. Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species from King George Island, Antarctica. **Phytother Res**, v.22, n.12, Dec, p.1635-9. 2008.
- BIAN, K., M. DOURSOUT F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v.10, n.4, Apr, p.304-10. 2008.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368(6474): 850-853, 1994.
- BOO, Y. C., SORESCU G., BOYD, N.; SHIOJIMA, I.; WALSH, K. ; DU, J. ; JO, H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. **J Biol Chem**, v.277, n.5, Feb 1, p.3388-96. 2002.
- BORA, K. M., O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O.T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de

- Dicksonia sellowiana, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, v.6, n.2, 10/2005, p.6-15. 2005.
- BOUMERFEG, S., BAGHIANI A., MESSAOUDI, D.; KHENNOUF, S.; ARRAR, L. Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of Tamus communis L. root extracts. **Phytother Res**, v.23, n.2, Feb, p.283-8. 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E.;BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology**, p.25-30. 1995
- BREDT, D. S.; FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. **J Biol Chem**, 267(16): 10976-10981, 1992.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, 351(6329): 714-718, 1991.
- BUSSE, R. & FLEMING I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. **J Vasc Res**, v.33, n.3, May-Jun, p.181-94. 1996.
- BUSSE, R. & MULSCH A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS Lett**, v.265, n.1-2, Jun 4, p.133-6. 1990.
- BUSSE, R.; EDWARDS, G.; FELETOU, M.; FLEMING, I.; VANHOUTTE, P. M.; WESTON, A. H. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacol Sci**, 23(8): 374-380, 2002.
- CAI, H. & HARRISON D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v.87, n.10, Nov 10, p.840-4. 2000.
- CAI, H., LIU D., GARCIA, J. G. CaM Kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells. **Cardiovasc Res**, v.77, n.1, Jan, p.30-4. 2008.
- CAMPANA, P. R., BRAGA F. C., CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by Mansoa hirsuta D.C. **Phytomedicine**, Nov 17. 2008.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v.9, n.6, Jun, p.653-60. 2003.
- CETIN, A., KAYNAR L., KOCYIGIT, I.; HACIOGLU, S. K.; SARAYMEN, R.; OZTURK, A.; ORHAN, O. SAGDIC, O. The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. **Turk J Gastroenterol**, v.19, n.2, Jun, p.92-8. 2008.
- CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 79(6): 2106-2110, 1982.
- CHURCH, J. E. & HODGSON W. C. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the

- cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. **Toxicon**, v.40, n.6, Jun, p.787-96. 2002.
- CINES, D. B., POLLAK, E. S. BUCK, C. A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G. A.; MCEVER, R. P.; POBER, J. S.; WICK, T. M.; KONKLE, B. A.; Schwartz, B. S.; Barnathan, E. S.; McCrae, K. R. ; Hug, B. A.; Schmidt, A. M. ; Stern, D. M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v.91, n.10, May 15, p.3527-61. 1998.
- COHEN, G. & HOCHSTEIN P. Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. **Biochemistry**, v.2, Nov-Dec, p.1420-8. 1963.
- COHEN, R. A. E VANHOUTTE P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v.92, n.11, Dec 1, p.3337-49. 1995.
- COHEN, R. A.; SHEPHERD, J. T.; VANHOUTTE, P. M. 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. **Am J Physiol**, 245(6): H1077-1080, 1983.
- COHEN, R. A.; SHEPHERD, J. T.; VANHOUTTE, P. M. 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. **Am J Physiol**, 245(6): H1077-1080, 1983.
- Conway, E. M., D. Collen, *et al.* Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovasc Res**, v.49, n.3, Feb 16, p.507-21. 2001.
- CORBETT, J.A., KWON, G., TURK, J. IL-1 beta induces the coexpression of both nitricoxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. **Biochemistry** 32, 13767–13770. 1993
- CORSON, M. A., JAMES N. L., LATTA, S. E.; NEREM, R. M.; BERK, B. C.; HARRISON, D. G. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Circ Res**, v.79, n.5, Nov, p.984-91. 1996.
- COYLE, C. H. & KADER K. N. Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells exposed to physiologic shear stress. **Asaio J**, v.53, n.1, Jan-Feb, p.17-22. 2007.
- COYLE, C. H., MARTINEZ L. J., COLEMAN, M. C. ; SPITZ, D. R. ; WEINTRAUB, N. L. ; KADER, K. N. Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells. **Free Radic Biol Med**, v.40, n.12, Jun 15, p.2206-13. 2006.
- CUBBERLEY, R. R.; ALDERTON, W. K.; BOYHAN, A.; CHARLES, I. G.; LOWE, P. N.; OLD, R. W. Cysteine-200 of human inducible nitric oxide synthase is essential for dimerization of haem domains and for binding of haem, nitroarginine and tetrahydrobiopterin. **Biochem J**, 323 ( Pt 1): 141-146, 1997.
- CURTIS, M. J. E PABLA R. Nitric oxide supplementation or synthesis block--which is the better approach to treatment of heart disease? **Trends Pharmacol Sci**, v.18, n.7, Jul, p.239-44. 1997.
- DAVIGNON, J. & GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v.109, n.23 Suppl 1, Jun 15, p.III27-32. 2004.

- DE GARAVILLA, PAGANI L., E. D., BUCHHOLZ, R. A.; DUNDORE, R.; BODE, D. C.; VOLBERG, M.; JACKSON, K. N.; PRATT, P.; SILVER, P. J. Zaprinast, but not dipyridamole, reverses hemodynamic tolerance to nitroglycerin in vivo. **Eur J Pharmacol**, v.313, n.1-2, Oct 10, p.89-96. 1996.
- DIMMELER, S., FLEMING I., FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v.399, n.6736, Jun 10, p.601-5. 1999.
- D'ORLEANS-JUSTE, P., HOUDE M., RAE, G. A.; BKAILY, G.; CARRIER, E.; SIMARD, E. Endothelin-1 (1-31): from chymase-dependent synthesis to cardiovascular pathologies. **Vascul Pharmacol**, v.49, n.2-3, Aug-Sep, p.51-62. 2008.
- DUCROCQ, C., SERVY C., CUDIC, M.; BLANCHARD, E. B. Intervention by nitric oxide, NO, and its oxide derivatives particularly in mammals. **Can J Physiol Pharmacol**, v.79, n.2, Feb, p.95-102. 2001.
- ESMON, N. L. E ESMON C. T. Protein C and the endothelium. **Semin Thromb Hemost**, v.14, n.2, Apr, p.210-5. 1988.
- ETIENNE, NELLY. Etude des fonctions cardiovasculaires du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2B</sub> et de ses interactions avec les hormones ovariennes et la synthèse de monoxyde d'azote (NO). Université Louis Pasteur de Strasbourg. Thèse Soutenue publiquement le 29 septembre 2004.
- FANG, J. C., KINLAY S., BELTRAME, J.; HIKITI, H.; WAINSTEIN, M.; BEHRENDT, D.; SUH, J.; FREI, B.; MUDGE, G. H.; SELWYN, A. P.; GANZ, P. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. **Lancet**, v.359, n.9312, Mar 30, p.1108-13. 2002.
- FELETOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **Br J Pharmacol**, v.156, n.4, Feb, p.545-62. 2009.
- FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**, 93(3): 515-524, 1988.
- FERRARA, N. E ALITALO K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat Med**, v.5, n.12, Dec, p.1359-64. 1999.
- FERREIRA, E. Use of the extraction process to obtain extract, sap, tincture, pulp and by-products from *Dicksonia sellowiana*-Presl — Hooker 1844, for using at the human, industrial and pharmacological chemistry, human and animal, medicinal, phytomedicinal, nutraceutical. **World Intellectual Property Organization**. EUA. WO/ 2004/089387; 2004.
- FERREIRA, H.C., SERRA, C.P., ENDRINGER, D.C., LEMOS, V.S., BRAGA, F.C., CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine** 14, 473–478 ; 2007.
- FETALVERO, K.M., MARTIN, K.A., HWA, J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. Prostaglandins other lipid. **Mediat**. 82, 109–118. 2007.
- FISSLTHALER, B., DIMMELER S., HERMANN, C.; BUSSE, R.; FLEMING, I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. **Acta Physiol Scand**, v.168, n.1, Jan, p.81-8. 2000.

- FITO, M., R. DE LA TORRE, FARRE-ALBALADEJO, M.; KHYMENETZ, O.; MARRUGAT, J.; COVAS, M. I. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. **Ann Ist Super Sanita**, v.43, n.4, p.375-81. 2007.
- FLEMING, I. & BUSSE R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.284, n.1, Jan, p.R1-12. 2003.
- FLEMING, I. & FISSALTHALER B. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ Res**, v.88, n.11, Jun 8, p.E68-75. 2001.
- FLEMING, I. & R. BUSSE. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.284, n.1, Jan, p.R1-12. 2003.
- FLEMING, I. & R. BUSSE. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res**, v.43, n.3, Aug 15, p.532-41. 1999.
- FLEMING, I., FISSALTHALER B., DIMMELER, S.; KEMP, B. E.; BUSSE, R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ Res**, v.88, n.11, Jun 8, p.E68-75. 2001.
- FRANCHI, A.M., CHAUD, M., RETTORI, V., SUBURO, A., MCCANN, S.M., GIMENO, M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 91, 539–543. 1994.
- FUJITA, H., MORITA I., MUROTA, S. Hydrogen peroxide induced apoptosis of endothelial cells concomitantly with cycloheximide. **J Atheroscler Thromb**, v.7, n.4, p.209-15. 2000.
- FURCHGOTT, R. F. E ZAWADZKI J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.
- FURCHGOTT, R. F. Introduction to EDRF research. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.22 Suppl 7, p.S1-2. 1993.
- FURCHGOTT, R. F. Nitric oxide: from basic research on isolated blood vessels to clinical relevance in diabetes. **An R Acad Nac Med (Madr)**, v.115, n.2, p.317-31. 1998.
- FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res**, v.53, n.5, Nov, p.557-73. 1983.
- GALATI, E. M., CONTARTESE G., MICELI, N.; TAVIANO, M. F.; SDRAFKAKIS, V.; COULADIS, M. ; TZAKOU, O.; LANUZZA, F. Antiinflammatory and antioxidant activity of *Hypericum rumeliacum* Boiss. subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.) Robson & Strid methanol extract. **Phytother Res**, v.22, n.6, Jun, p.766-71. 2008.
- GARCIA-CARDENA, G., FAN R., STERN, D. F.; LIU, J.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. **J Biol Chem**, v.271, n.44, Nov 1, p.27237-40. 1996.
- GARLAND, J. G.; MCPHERSON, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. **Br J**

- Pharmacol**, 105(2): 429-435, 1992.
- GARTHWAITE, J.. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci** 14, 60-7; 1991.
- GERMAN, J. B. & WALZEM R. L. The health benefits of wine. **Annu Rev Nutr**, v.20, p.561-93. 2000.
- GHOSH, D. K. E SALERNO J. C. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. **Front Biosci**, v.8, Jan 1, p.d193-209. 2003.
- GORMAN, R.R., SUN, F.F., MILLER, O.V., JOHNSON, R.A. Prostaglandins H1 and H2. Convenient biochemical synthesis and isolation. Further biological and spectroscopic characterization. **Prostaglandins** 13, 1043–1053; 1977.
- GOVERS, R. E RABELINK T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.280, n.2, Feb, p.F193-206. 2001.
- GOVERS, R. E RABELINK T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.280, n.2, Feb, p.F193-206. 2001.
- GRIENDLING, K. SORESCU K., D., USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v.86, n.5, Mar 17, p.494-501. 2000.
- GRIFFITH, T. M.; EDWARDS, D. H.; LEWIS, M. J.; NEWBY, A. C.; HENDERSON, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**, 308(5960): 645-647, 1984.
- GRIFFITH, T. M.; EDWARDS, D. H.; LEWIS, M. J.; NEWBY, A. C.; HENDERSON, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**, 308(5960): 645-647, 1984.
- GUYTON, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v.252, n.5014, Jun 28, p.1813-6. 1991.
- GUZIK, T. J., WEST N. E., BLACK, E.; MCDONALD, D.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R. ; CHANNON, K. M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ Res**, v.86, n.9, May 12, p.E85-90. 2000.
- HALLIWELL, B., EVANS P., WHITEMAN, M. Assessment of peroxynitrite "scavenger"s in vitro. **Methods Enzymol**, v.301, p.333-42. 1999.
- HARASAWA, Y., KIMURA M.; OHNO, Y.; HAYASHI, S. Coronary endothelium is responsive to bradykinin and arachidonate but not to acetylcholine. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.302, Nov-Dec, p.196-208. 1989.
- HARRIS, M. B., JU H., VENEMA, V. J.; LIANG, H. ; ZOU, R. ; MICHELL, B. J. ; CHEN, Z. P. ; KEMP, B. E.; VENEMA, R. C. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. **J Biol Chem**, v.276, n.19, May 11, p.16587-91. 2001.
- HAYASHI, Y., NISHIO M., NAITO, Y. ; YOKOKURA, H.; NIMURA, Y.; HIDAKA, H.; WATANABE, Y. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. J

- Biol Chem**, v.274, n.29, Jul 16, p.20597-602. 1999.
- He, X. J., Yi Z. W., Tian, Y.; Lu, X. Y.; Dang, X. Q.; Mo, S. H.; Yang, H. B. [Ability of catechin to eliminate O<sub>2</sub><sup>-\*</sup> and \*OH]. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v.31, n.1, Feb, p.138-40. 2006.
- HINK, U., LI H., MOLLNAU, H.; OELZE, M.; MATHEIS, E.; HARTMANN, M.; SKATCHKOV, M.; THAISS, F.; STAHL, R. A.; WARNHOLTZ, A.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; HARRISON, D. G.; FORSTERMANN, U.;MUNZEL, T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ Res**, v.88, n.2, Feb 2, p.E14-22. 2001.
- HIRRLINGER, J. & RESCH A. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. **J Neurochem**, v.82, n.3, Aug, p.635-44. 2002.
- HIRRLINGER, J., RESCH A., GUTTERER, J. M.; DRINGEN, R. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. **J Neurochem**, v.82, n.3, Aug, p.635-44. 2002.
- HOPKINS, N. K.; GORMAN, R. R. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. **J Clin Invest**, 67(2): 540-546, 1981
- HORNIG, B. Vitamins, antioxidants and endothelial function in coronary artery disease. **Cardiovasc Drugs Ther**, v.16, n.5, Sep, p.401-9. 2002.
- HORT, M. A.; VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. – Atividade vasodilatadora da fração acetato de etila (FAE) de *Cyathea phalerata* Mart (*Cyathea*) em anéis de aorta torácica isolada de rato. Resumo apresentado no Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica – SBFTE 2006 \* única referência disponível
- HU, J. P., CALOMME M., LASURE, A.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.; VANDEN BERGHE, D. A. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. **Biol Trace Elem Res**, v.47, n.1-3, Jan-Mar, p.327-31. 1995.
- HUTCHINSON, P. J., PALMER R. M., MONCADA S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur J Pharmacol**, v.141, n.3, Sep 23, p.445-51. 1987.
- HUTCHINSON, P. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur J Pharmacol**, 141(3): 445-451, 1987.
- HUTCHISON, S. Smoking as a risk factor for endothelial dysfunction. **Can J Cardiol**, v.14 Suppl D, Jul, p.20D-22D. 1998.
- HYSLOP, P. A., HINSHAW D. B., HALSEY, W. A., JR.; SCHRAUFSTATTER, I. U.; SAUERHEBER, R. D.; SPRAGG, R. G.; JACKSON, J. H.; COCHRANE, C. G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, v.263, n.4, Feb 5, p.1665-75. 1988.
- IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM, WOOD KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ Res**. Dec;61(6):866-79. 1987.
- IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J Physiol Pharmacol**, v.53, n.4 Pt 1, Dec, p.503-14. 2002.

- IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 84(24): 9265-9269, 1987a.
- JIANG, H., ZHAN W. Q., LIU, X. ; JIANG, S. X. Antioxidant activities of extracts and flavonoid compounds from *Oxytropis falcate* Bunge. **Nat Prod Res**, v.22, n.18, Dec, p.1650-6. 2008.
- JOHN, S. E SCHMIEDER R. E. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. **J Hypertens**, v.18, n.4, Apr, p.363-74. 2000.
- KANAI, A. J., H. C. STRAUSS, TRUSKEY, G. A.; CREWS, A. L.; GRUNFELD, S. ; MALINSKI, T. Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porphyrinic microsensor. **Circ Res**, v.77, n.2, Aug, p.284-93. 1995.
- KAWASHIMA, S. & YOKOYAMA M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24, n.6, Jun, p.998-1005. 2004.
- KEDZIERSKI, R. M. E YANAGISAWA.M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p.851-76. 2001.
- KHAN, N. Q., LEES D. M., DOUTHWAITE, J. A. ; CARRIER, M. J. ; CORDER, R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. **Clin Sci (Lond)**, v.103 Suppl 48, Aug, p.72S-75S. 2002.
- KIM, F., GALLIS B., CORSON, M. A. TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.280, n.5, May, p.C1057-65. 2001.
- KLESCHYOV, A. L., B. MULLER, KRAVIS, T.; STOECKEL, M. E.; STOCLET, J. C. Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.279, n.6, Dec, p.H2743-51. 2000.
- KLESCHYOV, A. L., B. MULLER, SCHOTT, C.; STOCLET, J. C. Role of adventitial nitric oxide in vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rat aorta. **Br J Pharmacol**, v.124, n.4, Jun, p.623-6. 1998.
- KO, E. A., HAN J., JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. **J Smooth Muscle Res**, v.44, n.2, Apr, p.65-81. 2008.
- KOH, S. B., KANG M. H., KIM, T. S.; PARK, H. W.; PARK, C. G.; SEONG, Y. H.; SEONG, H. J. Endothelium-dependent vasodilatory and hypotensive effects of *Crotalaria sessiliflora* L. in rats. **Biol Pharm Bull**, v.30, n.1, Jan, p.48-53. 2007.
- KOJDA, G. & HARRISON D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovasc Res**, v.43, n.3, Aug 15, p.562-71. 1999.
- KWAN, C. Y., ZHANG W. B., SIM, S. M.; DEYAMA, T.; NISHIBE, S. Vascular effects of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*): endothelium-dependent NO- and EDHF-

- mediated relaxation depending on vessel size. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.369, n.5, May, p.473-80. 2004.
- LAKSHMI, V. M., SCHUT H. A., ZENSER, T. V. 2-Nitrosoamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline activated by the inflammatory response forms nucleotide adducts. **Food Chem Toxicol**, v.43, n.11, Nov, p.1607-17. 2005.
- LAMBERT, J. D. & YANG C. S. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. **J Nutr**, v.133, n.10, Oct, p.3262S-3267S. 2003.
- LEMOS, V. S., FREITAS M. R., MULLER, B.; LINO, Y. D.; QUEIROGA, C. E.; CORTES, S. F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. **Eur J Pharmacol**, v.386, n.1, Dec 10, p.41-6. 1999.
- LI, Y., KISHIMOTO, I., SAITO, Y., HARADA, M., KUWAHARA, K., IZUMI, T., HAMANAKA, I., TAKAHASHI, N., KAWAKAMI, R., TANIMOTO, K. Androgen contributes to genderrelated cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-**Endocrinology** 145, 951-8. 2004.
- LIN, J. K., CHEN P. C, HO, C. T. ; LIN-SHIAU, S. Y. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. **J Agric Food Chem**, v.48, n.7, Jul, p.2736-43. 2000.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J Nutr**, v.134, n.12 Suppl, Dec, p.3479S-3485S. 2004.
- LONG, L. H., CLEMENT M. V., HALLIWELL, B. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. **Biochem Biophys Res Commun**, v.273, n.1, Jun 24, p.50-3. 2000.
- LOPEZ-GIRALDO, L. J., LAGUERRE M., LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; BAREA, B.; WEISS, J.; DECKER, E. A.; VILLENEUVE, P. Kinetic and stoichiometry of the reaction of chlorogenic acid and its alkyl esters against the DPPH radical. **J Agric Food Chem**, v.57, n.3, Feb 11, p.863-70. 2009.
- LOTULUNG, P., MINARTI D., KARDONO, L. B.; KAWANISHI, K. Antioxidant compound from the rhizomes of *Kaempferia rotunda* L. **Pak J Biol Sci**, v.11, n.20, Oct 15, p.2447-50. 2008.
- LUCKHOFF, A., U. POHL MULSCH, A. BUSSE, R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v.95, n.1, Sep, p.189-96. 1988.
- LUSCHER, T. F. & NOLL G. Endothelium dysfunction in the coronary circulation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.24 Suppl 3, p.S16-26. 1994.
- MA, Y. Q., YE X. Q., FANG, Z. X. ; CHEN, J. C.; XU, G. H. ; LIU, D. H. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. **J Agric Food Chem**, v.56, n.14, Jul 23, p.5682-90. 2008.
- MADEIRA, S. V., AUGER C., ANSELM, E.; CHATAIGNEAU, M. ; CHATAIGNEAU, T. ; SOARES DE MOURA, R. ; SCHINI-KERTH, V. B. eNOS Activation Induced by a Polyphenol-Rich Grape Skin Extract in Porcine Coronary Arteries. **J Vasc Res**, v.46, n.5,

Jan 21, p.406-416. 2009.

- MARLETTA, M. A., YOON, P. S., IYENGAR, R., LEAF, C. D. AND WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry** 27, 8706-11; 1988.
- MARQUESINI, N. R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil: Guarani, Kaingãng, Xokleng, Ava-Guarani, Kraô e Cayua. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil. 1995.
- MARUMO, T., SCHINI-KERTH V. B.; BUSSE, R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. **Diabetes**, v.48, n.5, May, p.1131-7. 1999.
- MASLOV, L. N. & LISHMANOV B. IU. Vascular effects of ginseng compounds. **Eksp Klin Farmakol**, v.71, n.5, Sep-Oct, p.58-68. 2008.
- MATLUNG, H. L., E. N. BAKKER, VANBAVEL, E. Shear stress, reactive oxygen species and arterial structure and function. **Antioxid Redox Signal**, Feb 2. 2009.
- MAXWELL, A. J. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. **Nitric Oxide**, v.6, n.2, Mar, p.101-24. 2002.
- MCCABE, T. J., FULTON D., ROMAN, L. J.; SESSA, W. C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. **J Biol Chem**, v.275, n.9, Mar 3, p.6123-8. 2000.
- MEGSON, I. L. & WEBB D. J. Nitric oxide donor drugs: current status and future trends. **Expert Opin Investig Drugs**, v.11, n.5, May, p.587-601. 2002.
- MEHENDALE, S. R., WANG C. Z., SHAO, Z. H.; LI, C. Q.; XIE, J. T. ; AUNG, H. H.; YUAN, C. S. Chronic pretreatment with American ginseng berry and its polyphenolic constituents attenuate oxidant stress in cardiomyocytes. **Eur J Pharmacol**, v.553, n.1-3, Dec 28, p.209-14. 2006.
- MENG, L., LOZANO Y. F., GAYDOU, E. M.; LI, B. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. **Molecules**, v.14, n.1, p.133-40. 2009.
- MICELI, N., TAVIANO M. F., GIUFFRIDA, D.; TROVATO, A.; TZAKOU, O.; GALATI, E. M. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. **J Ethnopharmacol**, v.97, n.2, Feb 28, p.261-6. 2005.
- MICHEL, C. C. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. **J Mol Cell Cardiol**, v.30, n.12, Dec, p.2541-6. 1998.
- MICHEL, J. B., O. FERON, SASE, K. ; PRABHAKAR, P. ; MICHEL, T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v.272, n.41, Oct 10, p.25907-12. 1997.
- MICHELL, B. J., GRIFFITHS J. E., MITCHELHILL, K. I.; RODRIGUEZ-CRESPO, I.; TIGANIS, T.; BOZINOVSKI, S.; DE MONTELLANO, P. R.; KEMP, B. E.; PEARSON, R. B. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. **Curr Biol**, v.9, n.15, Jul 29-Aug 12, p.845-8. 1999.
- MICHIELS, C., N. BOUAZIZ, REMACLE, J. Role of the endothelium and blood stasis in the

- development of varicose veins. **Int Angiol**, v.21, n.2 Suppl 1, Jun, p.18-25. 2002.
- MIELKE, E.J., 2002. Análise da Cadeia Produtiva e Comercialização do Xaxim, *Dicksonia sellowiana* no Estado do Paraná. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.
- MILLER, F. J. J., GUTTERMAN D., RIOS, CD, HEISTAD, DD; DAVIDSON, BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. **Circ Res**, v.82, p.1298–305. 1998.
- MILLER, V. M. E VANHOUTTE P. M. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. **Am J Physiol**, v.248, n.4 Pt 2, Apr, p.H432-7. 1985.
- MILLER, V. M.; VANHOUTTE, P. M. Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow. **Am J Physiol**, 255(3 Pt 2): H446-451, 1988.
- MINEO, C., YUHANNA I. S, QUON, M. J.; SHAUL, P. W. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. **J Biol Chem**, v.278, n.11, Mar 14, p.9142-9. 2003.
- MINEO, C., YUHANNA I. S., QUON, M. J.; SHAUL, P. W. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. **J Biol Chem**, v.278, n.11, Mar 14, p.9142-9. 2003.
- MISTRY, D. K.; GARLAND, C. J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, 124(6): 1131-1140, 1998.
- MMA. Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica: Brasil. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Brasília, Brasil. 1998
- MOMBOULI, J. V. & VANHOUTTE P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**, v.31, n.1, Jan, p.61-74. 1999.
- MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, VANE JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**. 263(5579):663-51976
- MONCADA, S. E HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v.329, n.27, Dec 30, p.2002-12. 1993.
- MONCADA, S., HERMAN, A.G., HIGGS, E.A., VANE, J.R. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterialwall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. **Thromb. Res**. 11, 323–344. 1977.
- MONCADA, S., HIGGS, A. AND FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacol Rev** 49, 137-42. 1997.
- MONCADA, S., PALMER R. M., HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol**, v.38, n.11, Jun 1, p.1709-15. 1989.
- MORILLAS-RUIZ, J. M., VILLEGAS GARCIA J. A., ET AL. Effects of polyphenolic

- antioxidants on exercise-induced oxidative stress. **Clin Nutr**, v.25, n.3, Jun, p.444-53. 2006.
- MUNGRUE, I. N., HUSAIN, M. AND STEWART, D. J. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. **Heart Fail Rev** 7, 407-22; 2002.
- MUNZEL, T., AFANAS'EV I. B., KLESCHYOV, A. L.; HARRISON, D. G. Detection of superoxide in vascular tissue. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.22, n.11, Nov 1, p.1761-8. 2002.
- MURRAY, C. J. E LOPEZ A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v.349, n.9061, May 3, p.1269-76. 1997.
- MYERS, P. R., BANITT P. F., GUERRA, R., Jr. ; Harrison, D. G. Role of the endothelium in modulation of the acetylcholine vasoconstrictor response in porcine coronary microvessels. **Cardiovasc Res**, v.25, n.2, Feb, p.129-37. 1991.
- NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. **J Physiol**, 445: 355-367, 1992.
- NAKANE, M., MITCHELL J., FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.180, n.3, Nov 14, p.1396-402. 1991.
- NATHAN, C. E XIE Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem**, v.269, n.19, May 13, p.13725-8. 1994.
- NDIAYE, M., CHATAIGNEAU M., LOBYSHEVA, I.; CHATAIGNEAU, T. ; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. **Faseb J**, v.19, n.3, Mar, p.455-7. 2005.
- NDIAYE, M., CHATAIGNEAU T., ANDRIANTSITOHAINA, R. ; STOCLET, J. C. ; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**, v.310, n.2, Oct 17, p.371-7. 2003.
- NDIAYE, M., CHATAIGNEAU T., CHATAIGNEAU, M. ; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. **Br J Pharmacol**, v.142, n.7, Aug, p.1131-6. 2004.
- NELLY ETIENNE Etude des fonctions cardiovasculaires du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2B</sub> et de ses interactions avec les hormones ovariennes et la synthèse de monoxyde d'azote (NO). **Mémoire de diplôme d'état de docteur en pharmacie**. Université Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg – France, 195p; 2004
- NELSON, M.T., QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.** 268, 799–822. , 1995.
- NISHIKIMI, M., APPAJI, N.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochem Biophys Res Commun**, v.46, n.2, Jan 31, p.849-54. 1972.

- OAK, M. H., CHATAIGNEAU M., KERAUIS, T.; CHATAIGNEAU, T.; BERETZ, A.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; STOCLET, J. C.; CHANG, S. J.; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.23, n.6, Jun 1, p.1001-7. 2003.
- PACIFICI, R. E. & DAVIES K. J. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. **Gerontology**, v.37, n.1-3, p.166-80. 1991.
- PAGANO, P. J., CLARK, CIFUENTES-PAGANO J. K., M. E.; CLARK, S. M.; CALLIS, G. M.; QUINN, M. T. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.26, Dec 23, p.14483-8. 1997.
- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327(6122): 524-526, 1987.
- PARAVICINI, T. M. & TOUYZ R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v.31 Suppl 2, Feb, p.S170-80. 2008.
- PARDINI, R. S. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. **Arch Insect Biochem Physiol**, v.29, n.2, p.101-18. 1995.
- PASTEN, C., OLAVE N. C., ZHOU, L; TABENGWA, E. M.; WOLKOWICZ, P. E.; GRENETT, H. E. Polyphenols downregulate PAI-1 gene expression in cultured human coronary artery endothelial cells: molecular contributor to cardiovascular protection. **Thromb Res**, v.121, n.1, p.59-65. 2007.
- PAULINSKA, P., A. SPIEL ; JILMA, B. Role of von Willebrand factor in vascular disease. **Hamostaseologie**, v.29, n.1, Jan, p.32-8. 2009.
- PARKER, J. O. Nitrate tolerance--can it be prevented? **Eur Heart J**, v.12 Suppl A, May, p.13-5. 1991.
- PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v.57, n.2, Apr, p.313-70. 1977.
- PENG, Q., WEI Z., LAU, B. H. Fructus corni enhances endothelial cell antioxidant defenses. **Gen Pharmacol**, v.31, n.2, Aug, p.221-5. 1998.
- PERROS, F. & HUMBERT M. [Physiopathology of pulmonary arterial hypertension. Cellular and molecular aspects.]. **Presse Med**, v.34, n.3, Feb 12, p.232-42. 2005.
- PIO CORRÊA; Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Brasil. 1984.
- PRYOR, W. A. & SQUADRITO G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am J Physiol**, v.268, n.5 Pt 1, May, p.L699-722. 1995.

- QI, H., ZHANG Q., ZHAO, T. ; CHEN, R. ; ZHANG, H. ; NIU, X. ; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **Int J Biol Macromol**, v.37, n.4, Dec 15, p.195-9. 2005.
- RAND, M. J. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, noncholinergic neuro-effector transmission. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 19, 147-69, 1992.
- RAPOPORT, R. M. E MURAD F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ Res**, v.52, n.3, Mar, p.352-7. 1983.
- RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent vasodilator-and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Trans Assoc Am Physicians**, 96: 19-30, 1983.
- RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res**, 9(4-5): 281-296, 1983.
- RATTMANN, Y. D., CIPRIANI T. R.; SASSAKI, G. L. ; IACOMINI, M.; RIECK, L. ; MARQUES, M. C. ; DA SILVA-SANTOS, J. E. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. **J Ethnopharmacol**, v.104, n.3, Apr 6, p.328-35. 2006.
- RATTMANN, Y. D., PEREIRA C. R., CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M. C.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon**, v.51, n.3, Mar 1, p.363-72. 2008.
- RATTMANN, Y. D., TERLUK M. R., SOUZA, W. M.; SANTOS, C. A.; BIAVATTI, M. W.; TORRES, L. B.; MESIA-VELA, S.; RIECK, L.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; MARQUES, M. C. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **J Ethnopharmacol**, v.100, n.3, Sep 14, p.268-75. 2005.
- REITER, R. J., TAN D. X., MANCHESTER, L. C.; LOPEZ-BURILLO, S.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. **Adv Exp Med Biol**, v.527, p.539-48. 2003.
- RICCIONI, G. & BAZZANO L. A. Antioxidant plasma concentration and supplementation in carotid intima media thickness. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v.6, n.5, Jun, p.723-9. 2008.
- RIGANO, D., CONFORTI F., FORMISANO, C.; MENICHINI, F. ; SENATORE, F. Comparative free radical scavenging potential and cytotoxicity of different extracts from *Iris pseudopumila* Tineo flowers and rhizomes. **Nat Prod Res**, v.23, n.1, p.17-25. 2009.
- ROBERTO PASSOS NOGUEIRA. Mortalidade por três grandes grupos de causas no Brasil. **Políticas Sociais - acompanhamento e análise**, v 9; 2004
- ROCHA, A.P., CARVALHO, L.C., SOUSA, M.A., MADEIRA, S.V., SOUSA, P.J., TANO, T., SCHINI-KERTH,V.B., RESENDE, A.C., SOARES DE MOURA, R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extracts in mesenteric

- vascular bed of the rat. **Vascul. Pharmacol.** 46, 97–104. , 2007.
- ROQUES, S. C., LANDRAULT N., TEISSEDE, P. L. ; LAURENT, C. ; BESANCON, P. ; ROUANE, J. M. ; CAPORICCIO, B. Hydrogen peroxide generation in caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: effect of ascorbic acid. **Free Radic Res**, v.36, n.5, May, p.593-9. 2002.
- ROYALL, J. A. & ISCHIROPOULOS H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. **Arch Biochem Biophys**, v.302, n.2, May, p.348-55. 1993.
- RUAN, Y.; KAN, H.; MALIK, K. U. Beta adrenergic receptor stimulated prostacyclin synthesis in rabbit coronary endothelial cells is mediated by selective activation of phospholipase D: inhibition by adenosine 3'5'-cyclic monophosphate. **J Pharmacol Exp Ther**, 281(3): 1038-1046, 1997.
- RUCH, R. J., CRIST K. A.; KLAUNIG, J. E. Effects of culture duration on hydrogen peroxide-induced hepatocyte toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.100, n.3, Sep 15, p.451-64. 1989.
- RUSSO, G., LEOPOLD J. A., LOSCALZO, J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Vascul Pharmacol**, v.38, n.5, May, p.259-69. 2002.
- SAKURAI, T., H. MORIMOTO, KASUYA, Y. ; TAKUWA, Y.; NAKAUCHI, H.; MASAKI, T.; GOTO, K. Level of ETB receptor mRNA is down-regulated by endothelins through decreasing the intracellular stability of mRNA molecules. **Biochem Biophys Res Commun**, v.186, n.1, Jul 15, p.342-7. 1992.
- SALVEMINI, D., SEIBERT, K., MASFERRER, J.L., MISKO, T.P., CURRIE, M.G., NEEDLEMAN, P. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. **J. Clin. Invest.** 93, 1940–1947. 1994.
- SANTANAM, N., RAMACHANDRAN S., PARTHASARATHY, S. Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. **Semin Reprod Endocrinol**, v.16, n.4, p.275-80. 1998.
- SARR, M., CHATAIGNEAU M., MARTINS, S. ; SCHOTT, C.; EL BEDOUI, J.; OAK, M. H. ; MULLER, B. ; CHATAIGNEAU, T. ; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. **Cardiovasc Res**, v.71, n.4, Sep 1, p.794-802. 2006.
- SATO, M., MAULIK G., RAY, P. S.; BAGCHI, D.; DAS, D. K. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. **J Mol Cell Cardiol**, v.31, n.6, Jun, p.1289-97. 1999.
- SCHIFFRIN, E. L. E TOUYZ R. M. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.287, n.2, Aug, p.H435-46. 2004.
- SCHINI-KERTH, V. B. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. **Transfus Clin Biol**, v.6, n.6, Dec, p.355-63. 1999.
- SCHLAICH, M. P., PARNELL M. M., AHLERS, B. A.; FINCH, S.; MARSHALL, T.; ZHANG,

- W. Z.; KAYE, D. M. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. **Circulation**, v.110, n.24, Dec 14, p.3680-6. 2004.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. & TAPIA A. Free radical "scavenger"s and antioxidants from *Tagetes mendocina*. **Z Naturforsch [C]**, v.59, n.5-6, May-Jun, p.345-53. 2004.
- SCHRAUFSTATTER, I., HYSLOP P. A., JACKSON, J. H. Cochrane, C. G. Oxidant-induced DNA damage of target cells. **J Clin Invest**, v.82, n.3, Sep, p.1040-50. 1988.
- SEHNEM, A. Flora Ilustrada Catarinense\_ Itajaí (SC): **Herbário Barbosa Rodrigues**. 1978. 116p. p. (Ciat: Ciateáceas)
- SFORCIN, J. M., ORSI R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **J Ethnopharmacol**, v.98, n.3, Apr 26, p.301-5. 2005.
- SHAUL, P. W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. **Annu Rev Physiol**, 64, 749-74. 2002.
- SIDDHANTA, U.; PRESTA, A.; FAN, B.; WOLAN, D.; ROUSSEAU, D. L.; STUEHR, D. J. Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. **J Biol Chem**, 273(30): 18950-18958, 1998.
- SINGH, R., SINGH B., SINGH, S.; KUMAR, N.; KUMAR, S.; ARORA, S. Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. **Toxicol In Vitro**, v.22, n.8, Dec, p.1965-70. 2008.
- SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem**, 271(52): 33157-33160, 1996.
- SNYDER, S. H. AND BREDET, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Sci Am** 266, 68-71, 74-7; 1992.
- STEVENS-TRUSS, R.; BECKINGHAM, K.; MARLETTA, M. A. Calcium binding sites of calmodulin and electron transfer by neuronal nitric oxide synthase. **Biochemistry**, 36(40): 12337-12345, 1997.
- STOCLET, J. C., CHATAIGNEAU, T. NDIAYE, M.; OAK, M. H. ; EL BEDOUI, J. ; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B. Vascular protection by dietary polyphenols. **Eur J Pharmacol**, v.500, n.1-3, Oct 1, p.299-313. 2004.
- STUEHR, D. J. E GRIFFITH O. W. Mammalian nitric oxide synthases. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v.65, p.287-346. 1992.
- STUEHR, D. J., N. S. KWON, NATHAN, C. F.; GRIFFITH, O. W.; FELDMAN, P. L.; WISEMAN, J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **J Biol Chem**, v.266, n.10, Apr 5, p.6259-63. 1991.
- TALEB-SENOUCI, D., GHOMARI H., KROUF, D.; BOUDERBALA, S. ; PROST, J. ; LACAILLE-DUBOIS, M. A. ; BOUCHENAK, M. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, Feb 2. 2009.

- TATESON, J.E., MONCADA, S., VANE, J.R. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. **Prostaglandins** 13, 389–397, 1977.
- TAUBERT, D., ROESEN R., LEHMANN, C.; JUNG, N.; SCHOMIG, E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. **Jama**, v.298, n.1, Jul 4, p.49-60. 2007.
- TESTAI, L., CHERICONI, S., CALDERONE, V., NENCIONI, G., NIERI, P., MORELLI, I., MARTINOTTI, E., Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. **J. Ethnopharmacol.** 81, 105–109; 2002.
- THOMAS, S. R., CHEN K., KEANEY, J. F., Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. **J Biol Chem**, v.277, n.8, Feb 22, p.6017-24. 2002.
- THOMAS, S. R., CHEN K., KEANEY, J. F., Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. **J Biol Chem**, v.277, n.8, Feb 22, p.6017-24. 2002.
- TRYON & TRYON. Ferns and allied plants with special reference to tropical America. New York: Springer; 857p. 1982. 857p p.
- TSUCHIDA, H., SCHUBERT A., ESTAFANOUS, F. G. ; BRUM, J. M. ; MURRAY, P. A. Sigma receptor activation does not mediate fentanyl-induced attenuation of muscarinic coronary contraction. **Anesth Analg**, v.82, n.5, May, p.982-7. 1996.
- ULLRICH, V. & BACHSCHMID M. Superoxide as a messenger of endothelial function. **Biochem Biophys Res Commun**, v.278, n.1, Nov 11, p.1-8. 2000.
- VALKO, M., LEIBFRITZ D., MONCOL, J.; CRONIN, M. T. ; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, n.1, p.44-84. 2007.
- VAN DE VOORDE, J.; LEUSEN, I. Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. **Eur J Pharmacol**, 87(1): 113-120, 1983.
- VAN DE VOORDE, J.; LEUSEN, I. Vascular endothelium and the relaxation effect of histamine on aorta of the rat. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 256(2): 329-330, 1982.
- VANE, J. R., ANGGARD E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med**, v.323, n.1, Jul 5, p.27-36. 1990.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 38: 97-120, 1998.
- VANHOUTTE, P. M. & KATUSIC Z. S. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? **Trends Pharmacol Sci**, v.9, n.7, Jul, p.229-30. 1988.
- VANHOUTTE, P. M. The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone. **N Engl J Med**, v. 319, n.8, Aug 25, p.512-3. 1988.

- VANHOUTTE, P. M.; EBER, B. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Wien Klin Wochenschr**, 103(14): 405-411, 1991.
- VASQUES, C. A., CORTES S. F., SILVA, M. S.; DE MEDEIROS, I. A. Muscarinic agonist properties of the hydrobutanol extract from aerial parts of *Waltheria iscosissima* St. Hil. (Sterculiaceae) in rats. **Phytother Res**, v.13, n.4, Jun, p.312-7. 1999.
- VASQUEZ-VIVAR, J., B. KALYANARAMAN; MARTASEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B. S.; KAROUI, H. ; TORDO, P. ; PRITCHARD, K. A., Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.16, Aug 4, p.9220-5. 1998.
- VELTMAR, A., GOHLKE P., UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **Am J Hypertens**, v.4, n.3 Pt 2, Mar, p.263S-269S. 1991.
- VERPLOEGEN, S., VAN LEEUWEN C. M., VAN DEUTEKOM, H. W. ; LAMMERS, J. W. ; KOENDERMAN, L. ; COFFER, P. J. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulated signaling pathways in chemoattractant induced neutrophil effector functions. Comparison with the role of phosphatidylinositol-3 kinase. **Eur J Biochem**, v.269, n.18, Sep, p.4625-34. 2002.
- VITOR, R. F., MOTA-FILIFE H., TEIXEIRA, G.; BORGES, C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, A. PAULO, A. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. **J Ethnopharmacol**, v.93, n.2-3, Aug, p.363-70. 2004.
- WALFORD, G. & LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **J Thromb Haemost** 1, 2112-8. (2003).
- WALLERATH, T., DECKERT G., TERNES, T.; ANDERSON, H.; LI, H.; WITTE, K.; FORSTERMANN, U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v.106, n.13, Sep 24, p.1652-8. 2002.
- WANG, D. H. & DU Y. Regulation of vascular type 1 angiotensin II receptor in hypertension and sodium loading: role of angiotensin II. **J Hypertens**, v.16, n.4, Apr, p.467-75. 1998.
- WEINHEIMER, G.; WAGNER, B.; OSSWALD, H. Interference of phorbol esters with endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation. **Eur J Pharmacol**, 130(3): 319-322, 1986.
- WEIRICH, J., DUMONT L., FLECKENSTEIN-GRUN, G. Contribution of capacitative and non-capacitative Ca<sup>2+</sup>-entry to M3-receptor-mediated contraction of porcine coronary smooth muscle. **Cell Calcium**, v.38, n.5, Nov, p.457-67. 2005.
- WILLIAMS, D. L., JR., G. M. KATZ, ROY-CONTANCIN, L.; REUBEN, J. P. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.23, Dec, p.9360-4. 1988.
- WINTERBOURN, C. C. & KETTLE A. J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. **Biochem Biophys Res Commun**, v.305, n.3, Jun 6, p.729-36. 2003.
- WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler Thromb**

- Vasc Biol**, v.20, n.6, Jun, p.1430-42. 2000.
- WOLIN, M. S., GUPTE S. A.; OECKLER, R. A. Superoxide in the vascular system. **J Vasc Res**, v.39, n.3, May-Jun, p.191-207. 2002.
- WRIGHT, H. M.; MALIK, K. U. Prostacyclin formation elicited by endothelin-1 in rat aorta is mediated via phospholipase D activation and not phospholipase C or A2. **Circ Res**, 79(2): 271-276, 1996.
- XIA, Y., TSAI A. L., BERKA, V.; ZWEIER, J. L. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. **J Biol Chem**, v.273, n.40, Oct 2, p.25804-8. 1998.
- XIAO, Z., ZHANG Z., RANJAN, V.; DIAMOND, S. L. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. **J Cell Physiol**, v.171, n.2, May, p.205-11. 1997.
- XU, S. & TOUYZ R. M. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. **Can J Cardiol**, v.22, n.11, Sep, p.947-51. 2006.
- XU, Y. C., LEUNG G. P.; WONG, P. Y.; VANHOUTTE, P. M.; MAN, R. Y. Kaempferol stimulates large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BKCa) channels in human umbilical vein endothelial cells via a cAMP/PKA-dependent pathway. **Br J Pharmacol**, v.154, n.6, Jul, p.1247-53. 2008.
- YAMADA, H. & WATANABE H. Tea polyphenols in preventing cardiovascular diseases. **Cardiovasc Res**, v.73, n.2, Jan 15, p.439-40. 2007.
- YAMADA, H. & WATANABE H. Tea polyphenols in preventing cardiovascular diseases. **Cardiovasc Res**, v.73, n.2, Jan 15, p.439-40. 2007.
- YAMANOUE, T., BRUM J. M., ESTAFANOUS, F. G.; KHAIRALLAH, P. A.; FERRARIO, C. M. Fentanyl attenuates porcine coronary arterial contraction through M3-muscarinic antagonism. **Anesth Analg**, v.76, n.2, Feb, p.382-90. 1993.
- Yanagisawa, M., H. KURIHARA, KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **NATURE**, V.332, N.6163, MAR 31, P.411-5. 1988.
- YANAGISAWA, N., SHIMADA K., MIYAZAKI, T.; KUME, A.; KITAMURA, Y.; SUMIYOSHI, K.; KIYANAGI, T.; IESAKI, T.; INOUE, N.; DAIDA, H. Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages. **Lipids Health Dis**, v.7, p.48. 2008.
- YANG, C. S. & WANG Z. Y. Tea and cancer. **J Natl Cancer Inst**, v.85, n.13, Jul 7, p.1038-49. 1993.
- Yang, H., Landis-Piowar K. R., Chen, D.; Milacic, V.; Dou, Q. P. Natural compounds with proteasome inhibitory activity for cancer prevention and treatment. **Curr Protein Pept Sci**, v.9, n.3, Jun, p.227-39. 2008.
- YANG, X. P., FU S. X., LI, Y. S. Effects of m-nisoldipine on anoxia-potentiated histamine and acetylcholine-induced contractions of the porcine isolated coronary artery. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, v.11, n.6, Nov, p.513-7. 1990.

YING, C. J., XU J. W., IKEDA, K.; TAKAHASHI, K. ; NARA, Y. ; YAMORI, Y. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. **Hypertens Res**, v.26, n.10, Oct, p.823-8. 2003.