

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA VASODILATAÇÃO INDUZIDA
PELA FRAÇÃO RICA EM PROANTOCIANIDINAS (FRP) OBTIDA A
PARTIR DAS CASCAS DA *Croton celtidifolius* (EUPHORBIACEAE)
– ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIATEROGÊNICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

SILVIA DAL BÓ

**Florianópolis – SC
2008**

Dal Bó, Silvia. **Mecanismos envolvidos na vasodilatação induzida pela Fração Rica em Proantocianidinas (FRP) obtida a partir das cascas da *Croton celtidifolius* (euphorbiaceae) – Estudo da atividade antiaterogênica.** Florianópolis, 2008, 119p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Defesa: 25/07/2008

Uma fração rica em proantocianidinas (FRP) obtida das cascas da *C. celtidifolius* foi avaliada quanto ao seu potencial vasorrelaxante em preparações vasculares isoladas. Em leito arterial mesentérico, artéria mesentérica e aorta torácica isolados de ratos a FRP induz relaxamento dependente da concentração. Em vasos de pequeno calibre, este efeito foi significativamente reduzido pelo L-NOARG ou por Krebs despolarizante, e completamente abolido quando ambos são combinados. O efeito também foi reduzido na presença de ODQ e pela caribdotoxina. Em vasos de grande calibre, o L-NOARG e o ODQ também reduziram o relaxamento da fração, bem como a ausência de cálcio no e a presença de um bloqueador de influxo de cálcio (lantânio) na solução de Krebs-Henseleit. N-metilmaleimida e a neomicina também foram capazes de reduzir significativamente a vasodilatação induzida pela FRP. Em outro grupo de experimentos, a vasodilatação induzida pela FRP foi significativamente reduzida pelo Wortmannina. A FRP também foi testada quanto ao seu potencial antiaterogênico em camundongos C57/BL6 LDLr KO. Nestes experimentos, a fração não foi capaz de reduzir as concentrações de lipídios séricos (colesterol total, HDL ou VLDL mais LDL), assim como não reverteu os danos vasculares morfofuncionais provocados pela dieta, quando avaliados nos experimentos de reatividade vascular e na determinação da área de lesão aterosclerótica. Os resultados indicam que a FRP apresenta efeito vasorrelaxante dependente de endotélio em artérias de pequeno e grande calibre, que este efeito envolve a ativação da via NO/GMPc e que o mecanismo de ativação da via envolve o influxo de cálcio do meio extracelular pela ativação de proteínas sensíveis ao NEM e via ativação da PLC e por promover hiperpolarização do músculo liso vascular induzido por abertura de canais K_{Ca}^{2+} em vasos de pequeno calibre. A fração também promove a fosforilação da enzima eNOS, pela via PI3K/Akt, mas não apresenta atividade antiaterogênica quando avaliada no modelo de aterogênese induzida pela dieta em camundongos C57/BL6 LDLr KO.

[*Croton celtidifolius*], [Proantocianidinas], [Vasodilatação], [Óxido Nítrico], [Cálcio], [Aterosclerose]

“Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira - mas já tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum”

Monteiro Lobato

A Deus, por todas as coisas boas que surgem na minha vida a cada dia...

Aos meus Pais, Silvio e Polônia, pela presença constante, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo amor dedicado a mim...

Aos meus irmãos, Fábio, Fabiana e Fabrício, às minhas sobrinhas Júlia, Laura e Flávia e meu sobrinho Lorenzo...

À minha orientadora, Rosa Maria, por toda a paciência e compreensão, por todos os ensinamentos desde a minha iniciação científica. Por ser mais que uma orientadora, mas uma grande amiga durante todos esses anos de convívio.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, por todo o aprendizado durante o doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Pedro, Rita e Diana, pelo auxílio quando necessário.

Ao professor Moacir Pizzolatti e ao Heros Horst, pelo fornecimento da FRP, identificação e quantificação dos compostos nela presentes.

Aos meus colegas de laboratório Paulinho, Jarbas, Mariana, Regina, Juliana, Ângela, Sofia, Andreza, Eduardo, Suelen, Christiane, Marcella, Paula, Karin e Fernanda. Além de colegas de trabalho, vocês são meus grandes amigos! Com certeza todos vocês transformaram os meus dias no Lab.

A todos os amigos da Farmacologia (se eu for escrever o nome de cada um, com certeza vou esquecer de alguém!).

Agradecimentos

Aos meus amigos Silvio, Maicon, Karina, Geisson, Rafael e Cândida. Vocês fizeram diferença na minha vida durante o doutorado.

iv

Aos ratos e camundongos que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada por tudo!!

Silvia

LISTA DE TABELAS.....	viii	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii	
RESUMO.....	xvii	
ABSTRACT.....	xx	
ARTIGOS PUBLICADOS.....	xxiii	
1. INTRODUÇÃO.....	1	
1.1. <i>Croton celtidifolius</i>	2	
1.2. Proantocianidinas.....	5	
1.3. Endotélio e disfunção endotelial.....	9	
1.4. Aterosclerose.....	20	
2. OBJETIVOS.....	26	
2.1. Objetivos gerais.....	26	
2.2. Objetivos específicos.....	26	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28	
3.1. Materiais.....	28	
3.1.1. Animais.....	28	
3.1.2. Drogas e reagentes.....	29	
3.1.3. Material botânico.....	30	
3.2. Métodos.....	30	
3.2.1. Extração e Caracterização da fração FRP.....	30	
3.2.1.1. Extração.....	30	
3.2.1.2. Caracterização.....	31	
3.2.2. Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em leito arterial mesentérico, artéria mesentérica e aorta torácica isolados de ratos normotensos.....	32	
3.2.2.1. Isolamento do Leito Arterial Mesentérico.....	32	
3.2.2.2. Medida da Pressão de Perfusão do Leito Arterial Mesentérico.....	33	
3.2.2.3. Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP em leito arterial		

mesentérico e estudo do mecanismo de ação.....	34
3.2.2.4. Isolamento da artéria mesentérica de ratos	35
3.2.2.5. Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em artéria mesentérica isolada de ratos.....	36
3.2.2.6. Montagem das preparações isoladas de anel de aorta torácica de rato.....	37
3.2.2.7. Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP na reatividade vascular em aorta torácica isolada de ratos.....	38
3.2.3. Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	41
3.2.3.1. Animais e protocolo experimental.....	41
3.2.3.2. Obtenção do Soro e Determinação de Lipoproteínas.....	42
3.2.3.3. Reatividade Vascular.....	43
3.2.3.4. Análise histológica: Área de lesão aterosclerótica.....	43
3.2.4. Análise Estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em leito arterial mesentérico, artéria mesentérica e aorta torácica isolados de ratos.....	45
4.1.1 Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP em leito arterial mesentérico e estudo do mecanismo de ação.....	45
4.1.2 Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em artéria mesentérica isolada de ratos.....	50
4.1.3 Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP na reatividade vascular em aorta torácica isolada de ratos.....	54
4.2. Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	66
4.2.1 Determinação de Lipoproteínas.....	66
4.2.2 Reatividade Vascular.....	71
4.2.3 Análise histológica: Área de lesão aterosclerótica.....	75
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

Lista de Tabelas

Tabela 01. Espécies de <i>Croton</i> e atividades biológicas descritas na literatura.....	3	vii
Tabela 02. Lista parcial dos produtos derivados do endotélio.....	13	
Tabela 03. Valores de relaxamento máximo ($R_{\text{máx}}$) obtidos para FRP em LAM..	49	
Tabela 04. Valores de $R_{\text{máx}}$ obtidos para FRP em artéria mesentérica isolada...	54	
Tabela 05. Valores de $R_{\text{máx}}$ obtidos para FRP em aorta isolada pré-contraída com Phe.....	59	
Tabela 06. Valores de $R_{\text{máx}}$ obtidos para FRP em aorta isolada pré-contraída com PDBu.....	62	
Tabela 07. Valores de $R_{\text{máx}}$ obtidos para FRP em aorta isolada.....	65	
Tabela 08. Valores de contração máxima ($C_{\text{máx}}$) expressos em gramas dos anéis de aorta torácica de camundongos C597Bl6 selvagens e LDLr KO.....	73	

Lista de Figuras

Figura 01: Aspectos gerais da <i>C. celtidifolius</i>	4
Figura 02: Monômeros básicos dos taninos condensados.....	6
Figura 03: Mediadores vasoconstritores e vasorrelaxantes derivados do endotélio.....	15
Figura 04: Registro típico da pressão de perfusão (mm Hg) demonstrando o efeito vasorrelaxante da FRP em leito arterial mesentérico. CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ <i>in bolus</i>) em leito arterial mesentérico isolado de ratos Wistar machos perfundidos continuamente com Phe (750 - 1500 µg).....	46
Figura 05: CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ <i>in bolus</i>) em leito arterial mesentérico isolado de ratos Wistar machos perfundido continuamente com Phe (750 - 1500 µg). Efeito da indometacina (3 µM), atropina (3 µM), ioimbina (3 µM) e da pirilamina (1 µM) em preparações com endotélio funcional, adicionados 20 min antes da realização da curva.....	47
Figura 06: CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ <i>in bolus</i>) em leito arterial mesentérico isolado de ratos Wistar machos perfundido continuamente com Phe (750 - 1500 µg). Efeito da L-NOARG (10 µM), do Krebs despolarizante (60 mM) e de ambos perfundidos simultaneamente (L-NOARG, 10 µM + Krebs despolarizante, 40 mM) em preparações com endotélio funcional, adicionados 20 min antes da realização da curva.....	48
Figura 07: CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ <i>in bolus</i>) em leito arterial mesentérico isolado de ratos Wistar machos perfundido continuamente com Phe (750 - 1500 µg). Efeito da glibenclamida (1 µM), ouabaina (100 µM), BaCl ₂ (100 µM) e da 4-aminopiridina (5 mM) em preparações com endotélio funcional, adicionados 20 min antes da realização da curva.....	49
Figura 08: (A) Registro típico da CCRc à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em artéria mesentérica isolada de ratos (B) CCRc à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com (E+) e sem (E-) endotélio funcional.....	51
Figura 09: CCRc à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito do ODQ (10 µM) e do HOE140 (0,01 µM) em	

preparações com endotélio funcional, adicionados 20 min antes da realização da curva.....	52	ix
Figura 10: CCRc à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da ChTx (100 nM), da apamina (100 nM) e de ambas as toxinas incubadas simultaneamente (ChTx, 100 nM + apamina, 100 nM), adicionados 20 min antes da realização da curva.....	53	
Figura 11: (A) Registro típico da CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos; (B) CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com (+E) e sem (-E) endotélio funcional.....	55	
Figura 12: CCRc aos compostos isolados presentes na FRP em concentrações equivalentes às encontradas na fração em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional.....	56	
Figura 13: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da indometacina (1 µM), atropina (1 µM), TEA (500 µM), e da presença de ChTx (100 nM) + apamina (100 nM) adicionados 20 min antes da realização da curva.....	57	
Figura 14: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito do L-NOARG (10 µM) e do ODQ (1 µM) adicionados 20 min antes da realização da curva.....	58	
Figura 15: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com PDBu (15 - 20 nM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da ausência de cálcio (Krebs sem Ca ²⁺) e do Lantânio (100 µM), adicionado 20 min antes da realização da curva.....	60	
Figura 16: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com		

Lista de Figuras

endotélio funcional. Efeito do wortmannina (30 nM) adicionado 20 min antes da realização da curva.....	61	X
Figura 17: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com PDBu (15 - 20 nM) em preparações com endotélio funcional. Efeito do NEM (10 µM) e da neomicina (1 mM), adicionado 20 min antes da realização da curva.....	62	
Figura 18: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da genisteína (30 µM), tirfostina A23 (30 µM), quinacrina (10 µM), GF109203X (5 µM), e do ONO-RS-082 (1 µM), adicionado 20 min antes da realização da curva.....	64	
Figura 19: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da PTx (600 ng/mL) e da CTx (600 ng/mL) em anéis pré-incubados por 12 h antes da realização da curva.....	65	
Figura 20: Determinação de colesterol total no soro de animais C57/Bl6 selvagens e LDLr KO.....	67	
Figura 21: Determinação de colesterol HDL no soro de animais C57/Bl6 selvagens e LDLr KO.....	68	
Figura 22: Determinação de colesterol VLDL + LDL no soro de animais C57/Bl6 selvagens e LDLr KO.....	70	
Figura 23: Curvas concentração resposta à Phe (1nM - 3 µM) em anéis de aorta torácica de camundongos C57Bl6 selvagens e LDLr KO.....	72	
Figura 24: Curvas concentração resposta à ACh (1nM - 3 µM) em anéis de aorta torácica de camundongos C57Bl6 selvagens e LDLr KO pré-contraídas com Phe.....	74	
Figura 25: Figuras representativas da área de lesão em cortes histológicos da raiz da aorta de camundongos nocaute para receptor de LDL corados com Oil Red “O”	76	
Figura 26: Diagrama esquemático do mecanismo vasorrelaxante da FRP.....	96	

Lista de abreviaturas

xi

°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
[Ca ²⁺] _i	Cálcio intracelular
μg	Microgramas
μM	Micromolar
4-AP	4-aminopiridina
Ach	Acetilcolina
Akt	Proteína quinase B
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
APO B-100	Apoproteína B-100
AT-I	Receptor de angiotensina 1
ATP	Trifosfato de adenosina
BaCl	Cloreto de bário
BFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
BK	Bradicinina
C57/BL6	Camundongos da linhagem C57/BL6
LDLr KO	Camundongos da linhagem C57/BL6 nocautes para receptor de lipoproteína de baixa densidade
Ca ⁺²	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CACO-2	Linhagem de células de intestino
CaM	Calmodulina
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCR	Curva concentração resposta
CCRc	Curva concentração resposta cumulativa
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
ChTx	Caribdotoxina
cm	Centímetros
Cmáx	Contração máxima
CO ₂	Dióxido de carbono

Lista de abreviaturas

xii

COX	Ciclooxigenase
CTx	Toxina colérica
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DC	Dieta comercial
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-	Endotélio lesado
E+	Endotélio íntegro
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFr	Receptor de fator de crescimento endotelial
EGTA	Ácido 1,2-Di(2-aminoetoxi)etane-NNN'N'-tetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
ETOAc	Acetato de etila
etOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
Fig	Figura
FRP	Fração rica em proantocianidinas
g	Gramas
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
HC	Hipercolesterolêmica
HDL	Proteína de alta densidade
ICAMS	Moléculas de adesão intercelular
IGF	Fator de crescimento tipo insulina
IL-1	Interleucina 1
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Potássio

Lista de abreviaturas

K_2SO_4	Sulfato de potássio
K_{Ca+2}	Canais de potássio ativados por cálcio
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio dibásico
LAM	Leito arterial mesentérico
LDL	Lipotroteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
L-NOARG	N ^o -nitro-L-arginina
MAPK	Quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática para macrófagos 1
m-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MEKc	Cromatografia eletrônica micelar
MeOH	Metanol
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm Hg	Milímetros de mercúrio
NaCl	Cloreto de sódio
$NaCO_3$	Carbonato de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NEM	N-metilmaleimida
ng	Nanograma
nM	nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O_2	Oxigênio molecular
$O_2^{\cdot-}$	Radical ânion superóxido
ODQ	1H[1,2,3]oxadiazolo[4,3-alpha]quinoxalin

Lista de abreviaturas

ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
PBS	Salina tamponada
PDBu	Forbol-12,13-dibutirato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAMS	Moléculas de adesão de células endoteliais
PGH ₂	Prostaglandina G ₂
PGI ₂	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidil inositol-3-quinase
PiP ₂	Fosfatidil inositol-4,5-difosfato
PiP ₃	Fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PTx	Toxina pertussis
Rmáx	Relaxamento máximo
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minutos
SVC	Sistema cardiovascular
TEA	Tetraetilamônio
TF	Fator tecidual
TFA	Ácido trifluoracético
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNICAMP	Universidade de Campinas

Lista de abreviaturas

VCAMS	Moléculas de adesão vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
vWF	Fator de Von Willebrand
ZnSO ₄	Sulfato de zinco

A *Croton celtidifolius* é uma árvore encontrada em regiões de mata Atlântica utilizada na medicina popular para tratar doenças inflamatórias e distúrbios gástricos, entre outras condições. As cascas desta planta apresentam diferentes tipos de proantocianidinas, incluindo monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros e polímeros. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, inclusive no sistema cardiovascular. Uma fração rica em proantocinidinas (FRP), obtida das cascas da *C. celtidifolis* foi avaliada quanto ao seu potencial vasorrelaxante em preparações vasculares isoladas. Em leito arterial mesentérico pré-contraído com fenilefrina (Phe), a FRP (0,1 - 100 µg; *in bolus*) induz relaxamento dependente da concentração (relaxamento máximo; $R_{\text{máx}} = 73\%$). Este efeito foi significativamente reduzido pelo L-NOARG ou por Krebs despolarizante, e completamente abolido quando ambos são combinados. O efeito da FRP não foi alterado pela indometacina, atropina, ioimbina, pirlamina e bloqueadores de canais de potássio (cloreto de bário, glibenclamida, ouabaína, 4-aminopiridina). Em artéria mesentérica isolada pré-contraída com Phe, a FRP (0,1 - 30 µg/mL), também induz relaxamento dependente da concentração ($R_{\text{máx}} = 72\%$), que foi inibido pela remoção mecânica do endotélio, pelo ODQ e pela caribdotoxina. Entretanto, o relaxamento não é inibido pelo HOE140 ou pela apamina. Em artéria aorta torácica isolada de ratos pré-contraída com Phe, a FRP (0,1 - 100 µg/mL) induz relaxamento dependente da concentração ($R_{\text{máx}} = 62\%$). Este efeito foi significativamente reduzido pela remoção mecânica do endotélio, pelo L-NOARG ou ODQ. Entretanto, esse efeito não foi alterado pela indometacina, atropina, tetraetilamônio e caribdotoxina mais apamina. Em aorta

torácica pré-contraída com PDBu (10 – 20 nM), a FRP também induz vasodilatação dependente da concentração ($R_{\text{máx}} = 56\%$). O relaxamento foi abolido na ausência de cálcio extracelular ou na presença de lantânio. O N-metilmaleimida e a neomicina também foram capazes de reduzir significativamente a vasodilatação induzida pela FRP. Em aorta pré-contraída com Phe, a vasodilatação induzida pela FRP não foi alterada na presença de quinacrina, ONO-RS-082, genisteína, tirfostin A23, GF109203, toxina pertussis ou toxina colérica. Em outro grupo de experimentos, a vasodilatação induzida pela FRP foi significativamente reduzida pelo Wortmannin, sugerindo a participação da via PI3K/Akt na ativação da eNOS. A FRP também foi testada quanto ao seu potencial antiaterogênico no modelo de aterogênese induzida pela dieta em camundongos C57/BL6 LDLr KO. Nestes experimentos, a fração não foi capaz de reduzir as concentrações de lipídios séricos (colesterol total, HDL ou VLDL mais LDL) em camundongos tratados com dieta hipercolesterolêmica. A FRP também não foi capaz de reverter os danos vasculares morfofuncionais provocados pela dieta, quando avaliados nos experimentos de reatividade vascular e na determinação da área de lesão aterosclerótica. Esses resultados indicam que a FRP apresenta efeito vasorrelaxante dependente de endotélio em artérias de pequeno e grande calibre, que este efeito envolve a ativação da via NO/GMPc e que o mecanismo de ativação da via envolve o influxo de cálcio do meio extracelular pela ativação de proteínas sensíveis ao NEM e via ativação da PLC e por promover hiperpolarização do músculo liso vascular induzido por abertura de canais K_{Ca}^{2+} em vasos de pequeno calibre. A fração também promove a

fosforilação da enzima eNOS, pela via PI3K/Akt, mas não apresenta atividade antiaterogênica, quando avaliada no modelo de aterogênese induzida pela dieta em camundongos C57/BL6 LDLr KO. As atividades apresentadas pela FRP sugerem um efeito benéfico sobre o sistema cardiovascular, principalmente naquelas doenças onde a disfunção endotelial se faz presente.

Croton celtidifolius is a tree found in regions of the Atlantic rain forest used in popular medicine for the treatment of various inflammatory disease and gastric disturbances among others conditions. The barks of this plant are compound different types of proanthocyanidins, including monomers, dimmers and polymers. These compounds are believed to present several biological activities, including in the cardiovascular system. We investigate the relaxing effect of a proanthocyanidin-rich fraction (PRF) obtained from *C. celtidifolius* barks in mesenteric arterial bed (MAB) pre-contracted with phenylephrine (Phe). In this experiment PRF (0.1 - 100 μg ; *in bolus*) induces concentrations-dependent relaxation (maximum relaxation; $R_{\text{m\acute{a}x}} = 73\%$). This effect was significantly reduced by the L-NOARG or K^+ solution, and completely abolished in vessel perfused with KCl plus L-NOARG. However, the vasorelaxant effect was not altered by indomethacin, atropine, yohimbine, pyrilamine or K^+ channel blockers: BaCl_2 , glibenclamide, ouabain, and 4-aminopyridine. In isolated mesenteric artery (MA) pre-contracted with Phe, PRF (0.1 – 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) also induced a concentration-dependent relaxation ($R_{\text{m\acute{a}x}} = 72\%$), in turn, inhibited by endothelial removal, ODQ, charybdotoxin and charybdotoxin plus apamin. Moreover, the relaxant effect was not altered by HOE140 and apamin given alone. In rat thoracic aorta rings pre-contracted with Phe, PRF (0.1 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) induces a concentration-dependent relaxation ($R_{\text{m\acute{a}x}} = 62\%$). This effect was significantly reduced by endothelium denudation, by L-NOARG, and ODQ. However, the vasorelaxant effect was not altered by indomethacin, atropine, tetraethylammonium and charybdotoxin plus apamin. In thoracic aorta rings pre-contracted with Phorbol-12,13-dibuyrate

(PDBu), PRF also induced a concentration-dependent relaxation ($R_{\text{máx}} = 56\%$).

xxi

The PRF-induced relaxation disappeared in the absence of extracellular calcium in the medium and decreased significantly in the presence of lanthanum. *N*-Ethylmaleimide and neomycin significantly decreased PRF-induced vasorelaxation. In vessels pre-contracted with Phe, the PRF-induced vasorelaxant effect was not altered by quinacrine and ONO-RS-082; by genistein and thyrophostin A-23; by GF109203, by pertussis toxin and cholera toxin. In another group of experiments, the vasorelaxant effect of PRF was significantly reduced by Wortmannin. These results suggest the participation of the PI3K/Akt pathway in the activation of eNOS. The PRF also was tested in model of atherosclerosis using LDL-R (-/-) mice. In these experiments, the fraction was not capable to reduce serum cholesterol concentration (total cholesterol, HDL and VLDL + LDL) in mice that received hypercholesterolemic diet. PRF was not capable to decrease the vascular reactivity and arteriosclerotic area caused by the diet. Taken together, these results indicate that the PRF exhibits endothelium- dependent vasorelaxant effect in and large small resistance arteries. In small resistance arteries, PRF vasorelaxing effect is dependent of NO-cGMP pathway in combination with hyperpolarization due to activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels. In large arteries, however, PRF-induced vasorelaxant effect by activation of NO/cGMP pathway, and this activation may be due to an increase of intracellular calcium derived of phospholipase C activation and *N*-Ethylmaleimide sensitive pathway. PRF also promotes activation of eNOS by phosphorylation, but it does not present antiatherosclerotic activity, when evaluated in a model of diet-induced atherosclerosis. The activities exhibited by

Abstract

PRF suggest a beneficial effect on the cardiovascular system, especially in
diseases where endothelial dysfunction is evident.

ARTIGOS PUBLICADOS REFERENTES À TESE

- **DalBó S**, Moreira ELG, Brandão FC, Horst H, Pizzolatti MG, Micke GA, ^{xxiii} Ribeiro-do-Valle RM. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries. *Journal of Pharmacological Sciences*. 106(2): 234-241, 2008.
- **DalBó S**, Goulart S, Horst H, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Activation of endothelial nitric oxide synthase by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* (Euphorbiaceae): involvement of extracellular calcium influx in rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacological Sciences*. 107(2): 181-189, 2008.

OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

- Hort MA, **DalBó S**, Brighente IMC, Pizzolatti MG, Pedrosa RC, Ribeiro-do-Valle RM. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae). *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2008.
- **DalBó S**, Jürgensen S, Horst H, Soethe DN, Santos AR, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: evidence for a role of the dopaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006.
- Nardi GM, **DalBó S**, Monache FD, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2006.
- Jürgensen S, **DalBó S**, Angers P, Santos AR, Ribeiro-do-Valle RM. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005.

No Brasil, plantas medicinais são freqüentemente utilizadas com o intuito de substituir ou auxiliar terapias convencionais, inicialmente em sua forma bruta como tinturas, chás, cataplasmas, pós e outras formulações (Balick e Cox, 1997). Além de servir como alternativa, a preferência no uso das plantas medicinais decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo, quando comparado a medicamentos industrializados. Entretanto, existe um grande problema quanto ao seu uso irrestrito: as plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (Farnsworth et al., 1985; Santos, 2003). A falta de dados científicos que comprovem a eficácia e a segurança dos medicamentos preparados a partir das plantas medicinais sinaliza para a necessidade de aprofundamento nos conhecimentos das suas propriedades químicas e biológicas.

Apesar da preferência das grandes indústrias farmacêuticas pelo desenvolvimento de medicamentos pela via sintética, nas últimas décadas observa-se um interesse renovado do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (para revisão ver: Calixto et al., 1998; Calixto et al., 2000; Koehn e Carter, 2005). No período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela Agência Americana de Controle de Medicamentos e Alimentos (FDA), 39 % (220 drogas) foram desenvolvidas a partir de fontes naturais (Cragg et al., 1997; Shu, 1998). Além disso, aproximadamente 40 % dos medicamentos disponíveis na terapêutica foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25 % de plantas, 13 % de microorganismos e 3 % de animais (Calixto, 2001).

Embora apenas cerca de 10 % da biodiversidade mundial tenha sido estudada, 140 mil metabólitos intermediários oriundos de plantas superiores e

microorganismos já foram isolados e caracterizados, mas a maioria ainda não foi avaliada biologicamente (Verpoorte, 1998). No Brasil, das 60 mil espécies vegetais superiores catalogadas, apenas 8 % foram estudadas na busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Guerra e Nodari, 2001). Por outro lado, o grande aumento no número de publicações científicas relacionadas ao estudo de plantas medicinais sinaliza o crescente interesse da comunidade científica e da indústria farmacêutica pelo assunto (Briskin, 2000; De Smet, 2002; Carlini, 2003).

1.1 *CROTON CELTIDIFOLIUS*

As plantas do gênero *Croton* são ricas em constituintes bioativos, como as proantocianidinas, taninos, terpenos, alcalóides, flavonas e outros compostos fenólicos. Além disso, várias espécies de *Croton* são descritas como plantas medicinais (Gupta et al., 2004), sendo que algumas delas já foram avaliadas quanto às suas atividades biológicas (Tabela 01).

A *Croton celtidifolius* (Figura 01) é uma árvore nativa das regiões de mata Atlântica, sendo freqüentemente encontrada do estado do Rio de Janeiro a Goiás, São Paulo e região Sul do Brasil. Ela recebe diversos nomes populares, dependendo da região em que é encontrada, como por exemplo, Pau-Sangue, Sangue de Dragão, Sangue de Adáve, entre outros (Smith, 1988). A população em geral recomenda o seu uso para o tratamento de doenças inflamatórias (como artrite reumatóide), ulcerativas e diabetes, mascando a própria casca ou fazendo infusão das mesmas.

Tabela 01: Espécies de *Croton* e atividades biológicas descritas na

literatura:

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>Croton cajucara</i>	Antiinflamatória e antinociceptiva Gastroprotetora, Hipolipemiante Hipolipemiante e hipoglicemiante Antiulcerogênica Antioxidante	Bighetti et al., 1999 Hiruma-Lima et al., 2000; Paula et al., 2006 Silva et al., 2001a; Bighetti et al., 2004 Silva et al., 2001b Albino de Almeida et al., 2003; Rodriguez et al., 2004 Tieppo et al., 2006
<i>Croton zehntneri</i>	Antinociceptivo Modulador do sistema cardiovascular Anti-helmíntico	Oliveira et al., 2001 De Siqueira et al., 2006 a, b Camurça-Vasconcelos et al., 2007
<i>Croton lechleri</i>	Antimutagênica e antiproliferativa Antiinflamatória, antidiarréica,	Rossi et al., 2003 Jones, 2003
<i>Croton tonkinensis</i>	Antiinflamatório e antitumoral	Giang et al., 2003; Kuo et al., 2007
<i>Croton nepetaefolius</i>	Mioconstrictor Antiespasmódico Antinociceptivo Vasorrelaxante	Magalhães et al., 2003 Magalhães et al., 2004 Lima-Accioly et al., 2006 Magalhães et al., 2008
<i>Croton schiedeanus</i>	Vasorrelaxante	Guerrero et al., 2004
<i>Croton urucurana</i>	Antifúngico Anti-hemorrágico Antinociceptivo	Gurgel et al., 2005 Esmeraldino et al., 2005 Rao et al., 2007
<i>Croton tonkinensis</i>	Citotóxico	Phan et al., 2005
<i>Croton draco</i>	Inibidor do sistema complemento	Tsacheva et al., 2004
<i>Croton mubango</i>	Antimalárico	Mesia et al., 2005
<i>Croton sonderianus</i>	Antinociceptivo	Santos et al., 2005
<i>Croton flavens</i>	Anticarcinogênico	Sylvestre et al., 2006
<i>Croton cuneatus</i>	Antiinflamatório	Suárez et al., 2003
<i>Croton hutchinsonianus.</i>	Antifúngico e inibidor das ciclooxigenases	Athikomkulchai et al., 2006
<i>Croton oblongifolius</i>	Citotóxico	Pornpakakul et al., 2006, Youngsa-ad et al., 2007
<i>Croton campestris</i>	Moluscicida	El Babili et al., 2006
<i>Croton zambesicus</i>	Vasorrelaxante	Bacelli et al., 2007
<i>Croton tiglium</i>	Analgésico	Wu et al., 2007
<i>Croton klozchianus</i>	Hipoglicemiante	Govindarajan et al., 2008

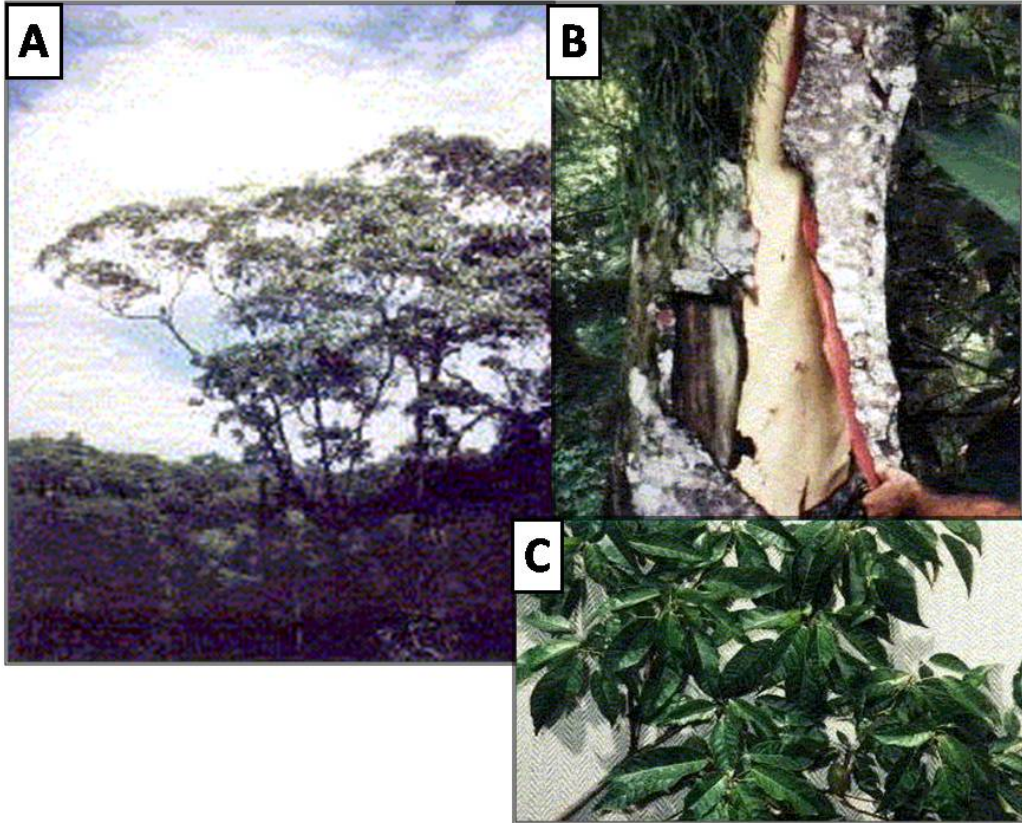


Figura 01: (A) A *Croton celtidifolius* em seu habitat natural, visão panorâmica; (B) retirada da casca, matéria prima utilizada obtenção da FRP; (C) Folhas de 10 – 25 cm de comprimento. Atenção especial deve ser dada a uma característica importante da espécie, a cor vermelha de sua casca.

Estudos para caracterização química dos constituintes da *C. celtidifolius* continuam restritos. Mukherjee e Axt (1984) determinaram a presença de ciclitolis, sendo que foram isolados o 1L-1-O-metil-*mio*-inositol, neo-inositol e sitosterol. Também foi observada a presença de catequinas, galocatequinas e proantocianidinas em frações obtidas a partir do extrato bruto das cascas da *C. celtidifolius* (Nardi et al., 2003), sendo que ocorrem dímeros e polímeros formados pelas unidades monoméricas conhecidas como catequina, epicatequina e galocatequina (DalBó et al., 2005; 2006). Além disso, outros autores mostraram a presença de alcalóides e saponinas também nas cascas desta planta (Farnsworth et al., 1969; Barnes et al., 1980; Amaral e Barnes,

1997). Estudos sobre as atividades biológicas da *C. celtidifolius* demonstraram atividades antiedematogênica e antiinflamatória (Nardi et al., 2003), efeito antiinflamatório no modelo de pleurisia induzida por carragenina e modulação da atividade da enzima superóxido dismutase (Nardi et al., 2007), efeito analgésico de vários extratos, frações e subfrações obtidas das cascas da planta (Nardi et al., 2006), efeito antinociceptivo da fração rica em proantocianidinas (FRP) com a participação de receptores dopaminérgicos e das fibras C sensíveis à capsaicina como mecanismo de ação (DalBó et al., 2005; 2006).

1.2 PROANTOCIANIDINAS

Proantocianidinas também são chamadas de taninos condensados e compreendem oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Figura 02) (Santos e Mello, 1999; Gu et al., 2003). Estes compostos também são conhecidos como poliflavonóides, segundo grupo de polifenóis mais prevalente nos vegetais superiores, depois das lignanas (Gu et al., 2003), estando particularmente presentes nas coníferas (De Bruyne et al., 1999) e em outras plantas lenhosas (Santos e Mello, 1999).

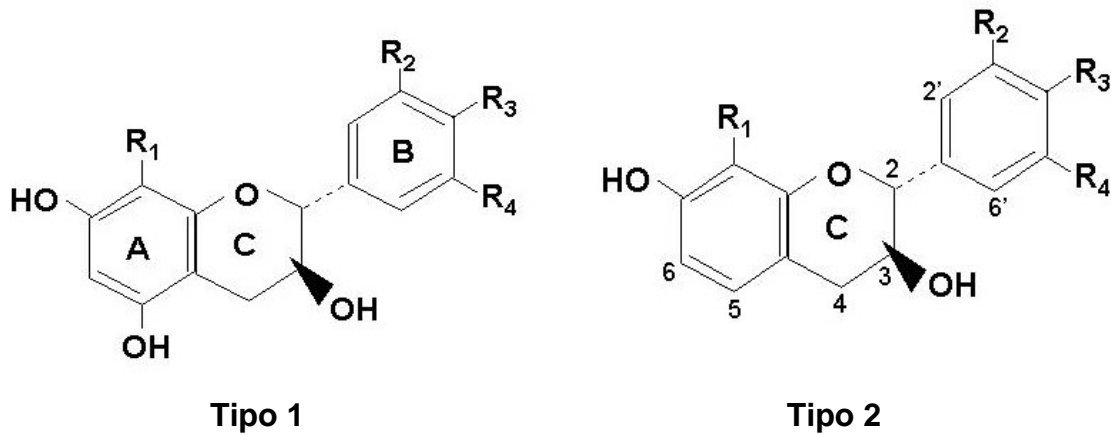


Figura 02: Monômeros básicos de taninos condensados: flavan-3-ol (tipo 1) e flavan-3,4-diol (tipo 2) (Santos e Mello, 1999).

Plantas ricas em taninos são amplamente empregadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. De Bruyne e colaboradores (1999) apresentaram uma revisão sobre as atividades biológicas dos taninos condensados, onde estão incluídas atividade antimicrobiana, antiviral, inibidora de enzimas, mutagênica, antimutagênica, antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, gastroprotetora, antidiarréica e moduladora do sistema cardiovascular. Outros autores relatam ensaios *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros. Nestes experimentos diversas atividades biológicas foram identificadas, tais como bactericida e fungicida (Scalbert, 1991; Smullen et al., 2007); antiviral (Okuda et al., 1993); moluscicida (Marston e Hostettmann, 1985); antitumoral (Okuda et al., 1989; Katiyar, 2006; Fimognari et al., 2008); inibidora de enzimas (Hattori et al., 1990; Ooshima et al., 1993); e antioxidante (Taubert et al., 2003; Bagchi et al., 2003; Matsuura et al., 2008). Outras atividades das proantocianidinas têm sido descritas, principalmente quanto à atividade sobre o sistema cardiovascular, e entre elas estão: atividade antiinflamatória (Ho et al., 2007; Hou et al., 2007); modulação da atividade e expressão gênica da enzima superóxido dismutase (Chan et al.,

2002); atividade antioxidante de vários sistemas lipídicos e particularmente contra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Porto et al., 2003; Sano et al., 2007); aumento da capacidade antioxidante do plasma (Silva et al., 1998; Koga et al., 1999; Masuda et al., 2007); proteção contra cardiomiopatia diabética (Cheng et al., 2007); proteção contra os danos provocados por isquemia seguida de reperfusão de tecidos (Sato et al., 1999; Toufektsian et al., 2008); além de promover vasorrelaxamento endotélio dependente, modular a expressão gênica de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, E-selectinas) e citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF- α); e inibir a agregação plaquetária (Dell'Agli et al., 2004; Zhang et al., 2006). Além disso, alguns trabalhos já demonstraram o potencial antiaterogênico de alguns tipos de proantocianidinas (Chyu et al., 2004; Alvaréz et al., 2006; Norata et al., 2007).

Quanto ao potencial tóxico das proantocianidinas, os estudos são relativamente escassos. Entretanto, a população em geral ingere proantocianidinas a séculos sem relatos de efeitos adversos sérios correlacionados ao seu uso (Benvetivegna e Whitney, 2002; Arts, 2008). A quantidade de ingestão diária estimada de destes compostos é de 57,7 mg/dia. Isso é praticamente o dobro do consumo de outros flavonóides presentes na nossa dieta (Rasmussen et al., 2005). Alguns trabalhos realizados com extratos de proantocianidinas e proantocianidinas isoladas demonstraram uma boa margem de segurança dos mesmos, colaborando com as observações epidemiológicas (Ray et al., 2001; Benvetivegna e Whitney, 2002; Fujii et al., 2007). Apesar disso, as pesquisas sobre biossíntese, genética molecular e biologia celular das proantocianidinas necessitam ser integradas com pesquisas sobre a toxicologia das mesmas (Reed, 1995).

Estes compostos são peças fundamentais para o potencial benéfico dos flavonóides da dieta. Algumas características gerais dos taninos poderiam explicar, pelo menos em parte, as atividades biológicas destes compostos. Entre elas estão: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e habilidade de complexar com outras moléculas, incluindo proteínas e polissacarídeos (Santos e Mello, 1999). A hipótese é que estas habilidades dos taninos estariam envolvidas de alguma maneira nos mecanismos subjacentes às suas atividades biológicas.

Apesar de serem moléculas importantes e vários estudos terem demonstrado atividades biológicas interessantes no contexto médico atual, ainda existe uma grande dificuldade em se estudar a biodisponibilidade destes compostos em estudos *in vivo*. Devido a complexidade das estruturas químicas e a grande quantidade de estruturas presentes em frações e extratos purificados utilizados, técnicas de análise avançadas ainda tem certa dificuldade de apresentar resultados analíticos seguros sobre a absorção e o metabolismo e excreção das proantocianidinas. As proantocianidinas apresentam vários graus de polimerização, entretanto, estudos recentes sugerem que apenas oligômeros de baixo peso molecular são absorvidos no trato gastrointestinal (Rasmussen et al., 2005). Despréz e colaboradores (2001) demonstraram que catequinas, dímeros e trímeros são permeáveis nas células CACO-2 (células tumorais de cólon humano). Eles sugerem que apenas monômeros, dímeros e trímeros são absorvidos, mas não polímeros.

Os dados sobre absorção e degradação das proantocianidinas apresentados na literatura são bastante conflitantes. Vários são os estudos com resultados contraditórios sobre a estabilidade de polímeros destes

compostos no suco gástrico (Rasmussen et al., 2005). Alguns sugerem que os polímeros passam inalterados no intestino delgado e após são degradados em ácidos fenólicos pela microflora do cécum e do intestino grosso (Manach et al., 2004). Outros estudos indicam que alguns polímeros podem ser absorvidos intactos em ratos e humanos, enquanto outros não conseguiram detectar nenhum dímero intacto (Holt et al., 2002; Baba et al., 2002). Isso ajuda a demonstrar o quanto ainda necessita ser feito para obtermos dados confiáveis sobre a biodisponibilidade destes compostos.

1.3 ENDOTÉLIO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A função da circulação sanguínea é suprir os tecidos e órgãos com um fluxo sanguíneo suficiente para atender as suas demandas metabólicas. Isto é realizado momento a momento mudando a hemodinâmica, a qual é determinada pela frequência cardíaca, resistência periférica e filtração renal, e também por um controle a longo prazo mediado por alterações no tamanho e integridade do coração e dos vasos sanguíneos. Os principais mecanismos responsáveis por estas alterações envolvem mudanças inotrópicas e cronotrópicas, tanto quanto mudanças rápidas na resistência periférica, a qual reflete o grau de tensão gerado nas paredes das pequenas artérias (tônus arterial). O tônus vascular das pequenas artérias e arteríolas é dinamicamente regulado por neurotransmissores liberados de nervos perivasculares, por hormônios circulantes e autacóides liberados localmente pelo endotélio vascular (Inoue et al., 2008).

Todo o sistema circulatório tem a sua luz recoberta pelo endotélio. Ele forma uma delicada monocamada de células que forma um revestimento das

câmaras cardíacas e da superfície luminal dos vasos sangüíneos, formando uma área total de milhares de metros quadrados. Pela sua localização estratégica entre os componentes do sangue e o músculo liso vascular e músculo cardíaco, o endotélio é considerado uma interface biologicamente significativa, na qual a disfunção pode ser um fator crítico para o desenvolvimento de condições patológicas (Brevetti et al., 2008).

As pesquisas sobre as funções do endotélio são relativamente recentes na ciência cardiovascular. Durante muitos anos o endotélio foi considerado tradicionalmente apenas como uma barreira seletiva para macromoléculas do sangue não passarem para o espaço intersticial (barreira não-trombogênica) órgão (Brevetti et al., 2008). Em 1966, Florey modificou esta concepção quando declarou que o endotélio é “mais do que uma lâmina de celofane nucleado”. O desenvolvimento das pesquisas nas últimas quatro décadas confirmou a validade desta afirmação. Na atualidade, em virtude das suas funções complexas, o endotélio cumpre toda definição de órgão (Brevetti et al., 2008), entre estas funções estão: regulação do tônus vascular, modulação da inflamação, promoção e inibição do crescimento vascular e modulação da agregação plaquetária e coagulação (Schulz et al., 2008).

Cada célula endotelial apresenta uma face luminal, que se apresenta em contato com os componentes do sangue e uma face abluminal, que se encontra em contato com os tecidos conectivos subendoteliais. Em resposta a estímulos físicos e humorais, estas células têm grande plasticidade e são capazes de transformar a forma e a estrutura da membrana celular, tanto quanto alterar suas funções e o padrão de secreção de substâncias. A maior parte do endotélio permanece no estado quiescente durante quase todo

período de vida do indivíduo adulto, mas também tem potencial para se proliferar e diferenciar em condições patológicas (Kuruvilla e Kartha, 2003). Nas artérias coronárias e nas artérias de grande calibre, o endotélio é do tipo contínuo, caracterizado por uniões intercelulares estreitas que restringem o tráfego de moléculas entre as células. Estas são altamente especializadas e se orientam longitudinalmente na direção do fluxo sangüíneo, além de possuírem polaridade (Badimón e Martínez-Gonzáles, 2001). A membrana celular é atravessada por várias proteínas que funcionam como receptores e canais iônicos. Além disso, a membrana apresenta estruturas chamadas de cavéolas. Estas estruturas podem se apresentar como invaginações para o meio intra ou extracelular, ou permanecerem indistinguíveis da estrutura básica das células. As cavéolas são ricas em lipídios, esfingomiélin, proteínas e muitos receptores. Elas ocupam de 5 a 30 % da superfície total da membrana celular, e é descrito que seja a área mais provável de ligação entre receptores e efetores intracelulares (Andersen, 1993). A lista de moléculas sinalizadoras residentes nas cavéolas é bastante variada. São encontrados, por exemplo, receptores acoplados a proteínas G, receptores para fator de crescimento epidérmico (EGFr), MAP quinases, moléculas envolvidas na regulação da homeostase do cálcio, como bombas de cálcio e proteína quinase C (PKC), entre outros (Goligorsky et al., 2002; Shaul, 2003). Além disso, elas parecem ser a localização predominante da enzima eNOS, além de fatores que regulam a sua ativação e co-fatores essenciais ao seu funcionamento (Shaul, 2003). Esta localização é necessária para a interação da eNOS com as proteínas que fazem a regulação fina dos ciclos de ativação/inativação (Goligorsky et al., 2001). A eNOS é ligada à cavéola por N-meristoilação cotranslacional e

palmitoilação postranslacional, associada à uma proteína chamada caveolina-1. Esta interação com a eNOS parece inibir a sua atividade. A caveolina-1 é a proteína mais amplamente expressa nas cavéolas e apresenta uma série de funções que podem influenciar a biologia das outras proteínas aí localizadas (Minshall et al., 2003; Sessa, 2005). Em relação aos mecanismos das doenças que podem influenciar a interação da caveolina/eNOS, existem evidências que na aterosclerose, diabetes e cirrose ocorrem anormalidades na via eNOS/caveolina. Por exemplo, na aterosclerose a LDL oxidada (LDL-ox) é capaz de extrair colesterol da cavéola, alterando a localização da eNOS e reduzindo a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Shaul, 2003; Sessa, 2005).

As células endoteliais também apresentam várias proteínas contráteis que atravessam o citoplasma, entre elas estão: actina, miosina, tropomiosina, α -actina e outras que permitem atividade motora à célula. Um “sistema de junções associados aos filamentos de actina” (*junction-associated actin filament system*) é encontrado no espaço intercelular, sendo que sua contração e relaxamento controlam a dimensão do espaço intercelular, regulando a passagem de solutos e macromoléculas entre o sangue e o espaço subendotelial. Fatores como citocinas, espécies reativas de oxigênio, trombina, fator de agregação plaquetária (PAF) e outros, alteram as funções dessas junções e permitem uma abertura no espaço intercelular, e com isso, aumentam a permeabilidade endotelial (Esper et al., 2006).

As células endoteliais são os maiores reguladores da “saúde” vascular. Por causa da sua localização, elas são susceptíveis a mudanças nas forças hemodinâmicas e composição do sangue, e respondem a estas alterações

elaborando uma variedade de fatores parácrinos que atuam localmente nas paredes dos vasos sangüíneos e no lúmen (Herrmann e Lerman, 2001; Esper, et al., 2006; Brevetti et al., 2008). Muitas dessas substâncias (Tabela 02) interagem entre si. Por exemplo, fatores que estimulam a síntese de fatores antitrombogênicos e vasodilatadores (como NO e prostaciclina - PGI₂) também causam a liberação de moléculas que exercem efeitos trombogênicos e vasoconstritores (como fator de Von Willebrand - vWF, fator tecidual e endotelina-1 – ET-1). A resposta vascular depende basicamente da presença ou ausência de condições patológicas. Em condições normais, estes fatores garantem que a homeostase vascular seja mantida regulando a vasodilatação, promovendo uma superfície não aderente aos leucócitos, inibindo a proliferação do músculo liso vascular, inibindo a agregação plaquetária e a formação de trombos (Brevetti et al., 2008).

Tabela 02: Lista parcial dos produtos derivados do endotélio (adaptado de Brevetti et al., 2008).

Função	Mediadores
Tônus vascular	Acetilcolina (ACh) Óxido nítrico (NO), Prostaciclina (PGI ₂), Bradicinina (BK), Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDRF), Angiotensina (Ang I), Endotelina (ET), Tromboxano (TXA ₂).
Fatores de crescimento	Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), Fator de crescimento tipo insulina (IGF), Fator de crescimento transformador (TGF), Fator de crescimento básico de fibroblastos (BFGF).
Coagulação e fibrinólise	Trombomodulina, Heparina, Proteína C, Proteína S, Glicosaminoglicanos, Ativador de plasminogênio tecidual (tPA), Uroquinase, Fator de von Willebrand (vWF),

	Fator V, Inibidor do ativador de plasminogênio (PAI), Fator tecidual (TF).
Imunológicos	Selectinas, Moléculas de adesão intercelular (ICAMs), Moléculas de adesão vascular (VCAMs), Moléculas de adesão de células endoteliais-plaquetas (PECAMs), Citocinas, Fator de necrose tumoral (TNF), Proteínas quimiotáticas para monócitos 1 (MCP-1).

A PGI_2 , NO e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) representam os três componentes majoritários na regulação da vasodilatação mediada pelo endotélio (Figura 03) (Chauhan et al., 2003). Os mediadores derivados do endotélio variam quanto a importância dependendo do leito vascular e da espécie estudada, mas o principal vasorelaxante é o NO (Pober e Sessa, 2007). A maioria dos estímulos que produzem vasodilatação o fazem pela produção de NO. O NO é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular e do aminoácido L-arginina pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Ignarro et al., 1990; Moncada et al., 1991), e é produzido em praticamente todos os tecidos e, devido ao seu baixo peso molecular e suas propriedades lipofílicas, difunde-se facilmente através das membranas celulares (Esper et al., 2006). O NO derivado do endotélio é considerado uma molécula “crítica” para o funcionamento normal dos vasos sanguíneos, tanto para a progressão quanto para a regressão da aterosclerose (Simionescu, 2007). Ele é gerado constitutivamente a partir da L-arginina pela ação enzimática da eNOS e requer O_2 e Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que são essenciais no processo redox. O processo de produção é acelerado pela tetrahydrobiopterina, e também é favorecido por outros cofatores, como flavina-adenina dinucleotídeo e grupamentos tiol da cisteína ou glutatona reduzida (Esper et al., 2006). O mecanismo clássico proposto para

ativação da eNOS está relacionado com o aumento no cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que forma um complexo com a calmodulina (CaM), e este complexo Cálcio (Ca^{2+})/CaM se liga a um sítio específico para CaM na enzima e promove a síntese de NO. Entretanto, o maior responsável pela produção de NO é o *shear stress* ou estresse de cisalhamento. A exposição das células endoteliais ao *shear stress* resulta em uma liberação de NO explosiva, seguido de uma liberação sustentada. A produção de NO induzida pelo *shear stress*, entretanto, é independente das flutuações das concentrações de cálcio intracelular, mas dependente de fosforilação da enzima (Minshall et al., 2003; Sessa, 2005), sendo que a principal via envolvida com a fosforilação pelo *shear stress* é a fosfatidilinositol-3-fosfato/proteína quinase B (PI3K/Akt), que fosforila a ser1177 e aumenta a atividade da eNOS (Fleming e Busse, 2003).

O NO desempenha múltiplas ações, como indução de vasodilatação, efeito inibitório sobre o crescimento do músculo liso vascular, da transcrição nuclear de genes de moléculas de adesão celular, bem como efeito inibitório sobre a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos às células endoteliais. Em algumas ocasiões pode ocorrer dano às células endoteliais podendo ocasionar uma redução significativa das funções de mediadores vasoprotetores, como o NO, resultando em um aumento na resposta vascular a mediadores vasoconstritores, como a ET-1 e o TXA_2 (Yang e Ming, 2006; Simionescu, 2007). Diferentes fatores, tais como fumo, estresse oxidativo, idade avançada, hipercolesterolemia, hipertensão, hiperglicemia, obesidade, níveis de proteína C reativa elevados, infecções sistêmicas crônicas, entre outros, acarretam danos e/ou disfunção endotelial (Badimón e Martín-González, 2001; Schulz et al., 2008).

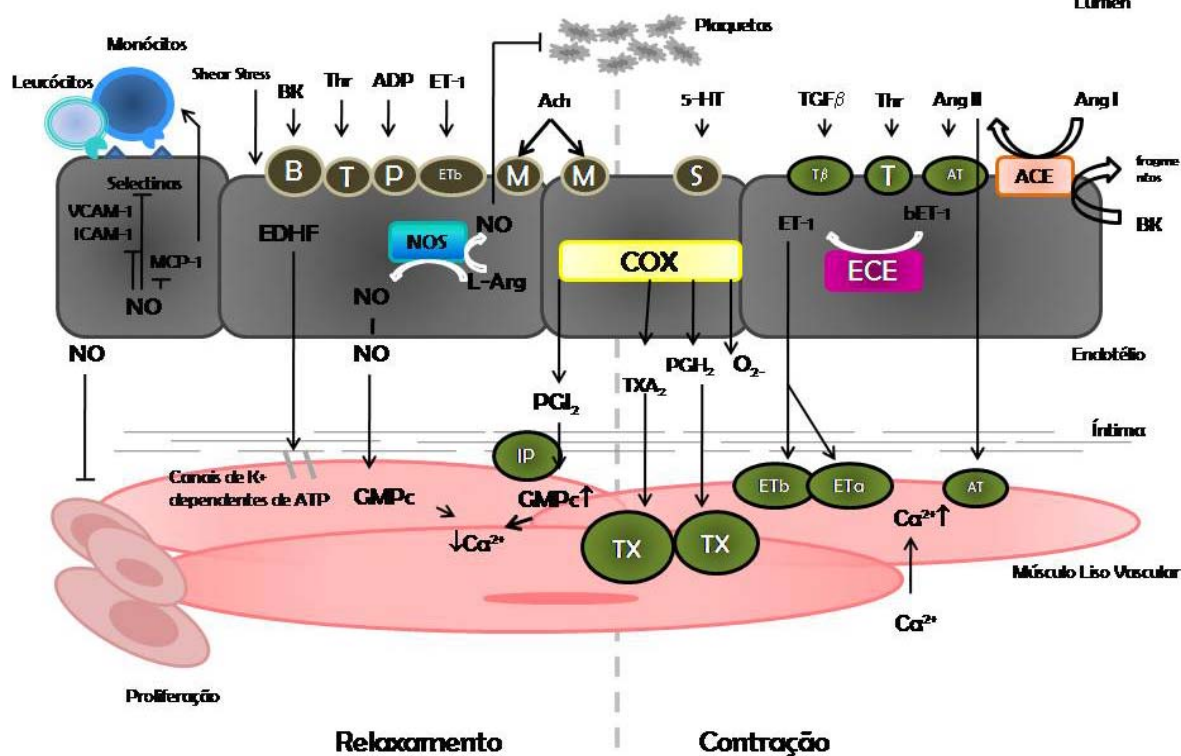


Figura 03: Mediadores vasoconstritores e vasorrelaxantes derivados do endotélio: o NO é o mediador chave derivado do endotélio com propriedades vasorrelaxante, antitrombótica, antiaderente e antiproliferativa. Ele exerce suas ações tanto na luz do vaso (plaquetas), quanto no músculo liso vascular predominantemente por aumentar os níveis de GMPc intracelular. Outros vasodilatadores derivados do endotélio incluem a PGI_2 e o EDHF. A vasoconstrição dependente pelo endotélio é mediada basicamente por 3 vias enzimáticas distintas que incluem: enzima conversora de endotelina, levando a formação de ET-1; ciclooxygenase (COX) levando a formação de TXA_2 , PGH_2 e produção de ânion superóxido (O_2^-); e enzima conversora de angiotensina, levando a produção de Ang II, estimulando a produção de Big-endotelina e degradando a bradicinina (Hermann e Lerman, 2001).

O aumento da prevalência de doenças cardiovasculares é recente na história da humanidade, já que as mesmas encontram-se diretamente relacionadas a modificações nos hábitos de vida dos indivíduos. No caso da hipertensão arterial, em sociedades mais primitivas, como os Yanomames e Xavantes do Brasil, algumas populações de esquimós, Zulus da África Central, ou ainda os nativos da Polinésia, não ocorriam registros dessa enfermidade, o que pode estar diretamente relacionado com a não exposição destes indivíduos

a hábitos modernos da humanidade, em especial a dieta industrializada (Neel et al, 1964; Oliver et al, 1975; Kurokawa, 2001). Além das alterações na dieta alimentar do homem moderno, outros fatores têm contribuído de forma considerável para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como: o sedentarismo, o tabagismo, a obesidade e o diabetes. Corrigir estes fatores de risco tem melhorado muito o processo de evolução dessas doenças, sugerindo que as grandes linhas de tratamento consistem em mudança no estilo de vida associados à terapia farmacológica adequada nos indivíduos que apresentam alto risco de doença cardiovascular (Widlansky et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que a severidade da disfunção endotelial está relacionada com o risco para desenvolvimento ou recorrência de um evento cardiovascular (Widlansky et al., 2003). Disfunção endotelial é definida como o desequilíbrio entre fatores relaxantes e constritores derivados do endotélio. Os mecanismos que determinam esse desequilíbrio podem ser: 1) produção fisiológica de NO, com uma redução abrupta de sua biodisponibilidade (devido ao aumento concomitante na produção de O_2^{\bullet}); 2) redução na produção de NO e aumento na produção de agentes vasoconstritores, como a ET-1 (Hermann e Lerman, 2001). Além da vasorreatividade anormal, o termo disfunção endotelial também se refere ao conjunto de alterações no fenótipo da célula endotelial que pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose, mas os mecanismos pelos quais essas alterações acontecem ainda permanecem obscuros. Então, como a hipótese mais aceita é que a disfunção endotelial contribui para o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, reverter a disfunção poderia reduzir este risco (Widlansky et al., 2003).

A disfunção endotelial se caracteriza por uma redução na produção de mediadores vasodilatadores e/ou aumento na produção de mediadores vasoconstritores, que implicam em um desencadeamento e/ou progressão do dano ao tecido. Este mecanismo patogênico pode envolver: 1) expressão ou liberação de mediadores; 2) distúrbios no balanço eletrolítico; 3) aumento na permeabilidade vascular; 4) supra-regulação de moléculas de adesão e aumento na aderência de leucócitos (McCarron et al., 2006). Esse desequilíbrio na biodisponibilidade de mediadores predispõe a agregação plaquetária, trombose, inflamação e vasoconstrição, ocorrendo um incremento na permeabilidade vascular. Isto parece estar vinculado a um processo de contração celular mediado por cálcio e por uma desorganização do citoesqueleto. Diversos estímulos fisiopatológicos, como por exemplo, a trombina gerada em consequência da cascata de coagulação ou pelas lipoproteínas produzem alterações espetaculares na permeabilidade vascular (Badimón e Martín-González, 2001). Além da permeabilidade vascular e da vasorreatividade anormais, existem outras características importantes da disfunção endotelial, como o fenótipo de estado pró-trombótico. Além disso, quando o endotélio é exposto a certos estímulos pró-inflamatórios, ele expressa quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias, que exacerbam a proliferação e a migração de células do músculo liso vascular (Yang e Ming, 2006). O termo disfunção endotelial se refere a este conjunto de alterações no fenótipo que pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose (Widlansky et al., 2003).

Danos às células endoteliais reduzem ou abolem as funções do NO. A perda das funções do NO endotelial está associada a uma série de desordens

cardiovasculares, e isso está relacionado a um decréscimo de sua produção ou aumento de sua degradação (Shaul, 2003; Yang e Ming, 2006; Pober e Sessa, 2007). Alguns estudos clínicos e experimentais apresentam evidências de que alterações nas funções do NO estão relacionados ao desenvolvimento da disfunção endotelial.

Bioquimicamente, a produção endotelial de NO é regulada em três diferentes níveis: 1) expressão gênica da eNOS; 2) atividade enzimática da eNOS e 3) degradação do NO, via interação com espécies reativas de oxigênio. O mau funcionamento de algum desses mecanismos pode causar disfunção endotelial (Yang e Ming, 2006). O aumento na degradação do NO é o conceito mais atrativo, uma vez que em condições patológicas como diabetes, hipertensão e hiperlipidemia, a disfunção endotelial está estabelecida e quase sempre é melhorada pela administração aguda de antioxidantes, como a vitamina C (Schulz et al., 2008). Entretanto, outros autores sugerem que uma redução na atividade da enzima, devido a uma redução na expressão do RNAm seja a hipótese mais plausível para a redução na biodisponibilidade do NO (Badimón et al., 2002).

Estudos recentes têm demonstrado que a severidade da disfunção endotelial está relacionada com o risco de desenvolvimento de uma doença cardiovascular, e que a melhora da função endotelial reduz este risco (Widlansky et al., 2003; Schulz et al., 2008). Vários trabalhos indicam que a morte das células endoteliais é o último evento da aterosclerose, ocorrendo apenas nos casos mais avançados, e que esse processo é gradual. A apoptose dessas células é induzida por diferentes fatores, principalmente os mediadores inflamatórios, linfócitos T ativados, citocinas, LDL-ox (que sintetiza

metaloproteinases de matriz) e até mesmo o estresse oxidativo (Simionescu, 2007). Isso significa que reduzindo fatores de risco, como hiperglicemia, fumo, hiperlipidemia, e inflamação localizada, entre outros fatores, a morte de células endoteliais poderia ser minimizada, o que acarretaria numa redução da disfunção endotelial. Além disso, fatores que contribuam para o aumento da biodisponibilidade do NO poderiam ser uma estratégia interessante para a redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

1.4 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é a principal causa de doenças cardiovasculares na população dos países ocidentais (Glass e Witztum, 2001; Tedgui e Mallat, 2006). É uma doença progressiva que se caracteriza pela formação de placas fibrosas na íntima que quase sempre exibem um centro grumoso de lipídios, causando espessamento das paredes vasculares com estreitamento da luz podendo induzir lesão isquêmica (Robbins et al., 1996). Ela é definida como “um processo dinâmico, evolutivo, a partir de dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparação tecidual” (Santos, 2001). Por anos acreditou-se que os principais fatores determinantes da patogenia fossem ambientais, alimentares, genéticos e hemodinâmicos. Entretanto, na última década a aterosclerose foi reconhecida como uma desordem inflamatória crônica que pode ter componentes infecciosos ou auto-imunes (Ross, 1999; Libby, 2000).

Existem várias teorias que tentam explicar o desenvolvimento da aterosclerose. No entanto, todas elas concordam que a lesão endotelial é o ponto de partida na etiologia deste processo. Uma lesão endotelial inicial

mínima favorece o surgimento de uma resposta inflamatória que resulta em um aumento da permeabilidade endotelial aos monócitos, lipídios e plaquetas circulantes (Kadár e Glasz, 2001). As possíveis causas da disfunção endotelial que levam à formação do ateroma incluem: elevação da concentração plasmática e modificação da LDL (oxidação); espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pelo fumo, hipertensão e diabetes; alterações genéticas; concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína; microorganismos infecciosos (herpes vírus e *Chlamydia pneumoniae*) e a combinações desses fatores (Ross, 1999). As lesões endoteliais ocorrem especialmente nas bifurcações e curvaturas das artérias, locais onde o fluxo sanguíneo é turbilhonado, provocando o conhecido estresse de cisalhamento “perturbado” que leva a alterações das características normais do endotélio e redução da produção de fatores vasorrelaxantes, como o NO (Lusis, 2000).

O primeiro estágio da aterosclerose é o aparecimento de estrias gordurosas (*fatty streaks*), as quais dão origem ao ateroma (Stary, 1990). Este processo inicia-se com a passagem da LDL pela camada endotelial (Ross, 1999). No ambiente vascular a LDL é submetida a modificações, principalmente devido à oxidação de seus ácidos graxos por EROs, originando inicialmente, a LDL-minimamente oxidada, a qual apresenta inúmeras propriedades inflamatórias (Ross, 1999; Lusis, 2000). Em uma segunda etapa, a LDL é extensivamente oxidada originando partículas altamente oxidadas (LDL-ox). Neste processo de oxidação, que envolve a peroxidação de ácidos graxos e modificação na estrutura da apolipoproteína B-100 (apo B-100) por produtos da peroxidação lipídica (Steinberg, 1997; Williams e Fisher, 2005; Galle et al., 2006), vários sistemas enzimáticos podem ser importantes,

incluindo a xantina oxidase, NADPH oxidase, fontes mitocondriais (cadeia transportadora de elétrons) e a NOS (Harrison et al., 2003).

No sistema vascular, o $O_2^{\bullet-}$ pode promover dano celular através da reação com o NO, reduzindo a biodisponibilidade de NO e levando à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente oxidante que pode promover a nitração de resíduos de proteínas, lipoperoxidação da LDL, dano às células endoteliais e células musculares lisas e indução de genes redox-sensíveis (Gaut e Heinecke, 2001; Yokoyama, 2004), estimulando a produção de proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP-1), fator estimulador de colônia para monócitos (M-CSF) e moléculas de adesão (VCAM-1). Com isso, os monócitos da circulação sangüínea podem se aderir a estes sítios, migrar para o espaço subendotelial, e iniciar a captação das lipoproteínas oxidadas através dos receptores “scavengers” levando à formação das células espumosas (*foam cells*) (Brown e Goldstein, 1983; Ross, 1999). Estas células espumosas produzem fatores de crescimento que induzem a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima e sua subsequente proliferação, convertendo a estria gordurosa em ateroma. As células musculares lisas podem ainda se dividir e produzir matriz extracelular, levando à formação da lesão fibro-gordurosa (Libby, 1996). Neste estágio inicial, a placa é caracterizada pela presença de células inflamatórias (basicamente macrófagos e células T), células endoteliais, células do músculo liso vascular, matriz extracelular, lipídios e debris acelulares ricos em lipídios. Geralmente este tipo de placa está presente em indivíduos jovens e são assintomáticos (Hanson e Libby, 2006). Em estágios subsequentes, uma calcificação pode ocorrer e a fibrose continuar, formando uma cobertura fibrosa, rica em células musculares lisas e matriz rica em

colágeno, que cerca o centro rico em lipídios que também pode conter células mortas ou apoptóticas, formando o chamado núcleo necrótico da lesão (Libby, 1996). Neste estágio, a placa é considerada madura e enfim é chamada de ateroma.

Os componentes da placa de ateroma (LDL-ox, macrófagos, linfócitos, o núcleo necrótico, entre outros) podem promover a produção de mais componentes inflamatórios, como citocinas, moléculas de adesão e outros fatores quimiotáticos que irão intensificar ainda mais o processo inflamatório (Libby, 2002; Tedgui e Mallat, 2006; Hanson e Libby, 2006). Estes mesmos componentes podem promover a liberação de substâncias pró-agregantes, vasoconstritoras, inibir a produção de substâncias vasorrelaxantes e de migração celular endotelial, entre outros, aumentando a extensão da lesão vascular (Lusis, 2000). Além de citocinas, moléculas de adesão e fatores pró-agregantes, estudos têm demonstrado que nas estrias gordurosas e no ateroma a interação da CD40 com seu ligante CD40L (CD154) contribui para o desenvolvimento de lesões avançadas, levando a produção de diversas moléculas aterogênicas pelos macrófagos, células musculares lisas e endoteliais, incluindo mais citocinas, metaloproteinases de matriz, moléculas de adesão e fatores teciduais (Lusis, 2000; Hansson, 2005).

A expansão da lesão aterosclerótica se dá em direção à adventícia até um ponto crítico, onde a lesão não pode expandir à custa da camada média normal, e então começa a invadir o lúmen (Glagov et al., 1987). A lesão cresce pela migração de novas células mononucleares que se infiltram nas lesões (Rosenfeld et al., 1987), pela proliferação de monócitos e macrófagos (Ross, 1999), células musculares lisas (Reidy, 1994), pela produção exuberante de

matriz extracelular (Riessen et al., 1994), e pelo acúmulo de lipídios extracelulares em um núcleo necrótico (Kruth, 1985; Guyton e Klemp, 1989).

As placas ateroscleróticas podem ser classificadas em estáveis ou vulneráveis à ruptura. As placas estáveis possuem um pequeno núcleo lipídico, uma densa camada fibrosa e poucas células inflamatórias; enquanto que as placas vulneráveis apresentam uma capa fibrosa fina e número elevado de células inflamatórias (Lusis, 2000; Stocker e Keane Jr, 2004). Macrófagos ativados, células T e mastócitos nos locais de ruptura da placa produzem vários tipos de moléculas, como proteases e fatores de coagulação, que podem desestabilizar a lesão. Estes fatores inibem a formação da capa fibrosa estável, atacam o colágeno desta capa e iniciam a formação do trombo (Hansson, 2005) que ao se desprenderem resultam em oclusão total ou parcial dos vasos sanguíneos tendo como possíveis conseqüências clínicas o infarto do miocárdio, derrame cerebral, falência renal, gangrena, além de estar associada à perda de função nas extremidades (Ross, 1993; Kádár e Glasz, 2001; Libby, 2002; Lind, 2003).

Além da aterosclerose, outras doenças crônicas do sistema cardiovascular, como a hipertensão, vêm a cada dia acometendo um maior número de pacientes. Isso ocorre em função do aumento da expectativa de vida nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento, além de fatores importantes relacionados aos hábitos de vida da população. Devido às conseqüências graves que estas doenças podem gerar, é imperativo que sejam realizadas pesquisas científicas com o objetivo de entender a evolução das doenças, bem como para descobrir potenciais alvos terapêuticos, tanto para regressão como estabilização de doenças como a aterosclerose e a

hipertensão arterial, por exemplo. A relação entre a disfunção endotelial e o desenvolvimento de doenças crônicas do sistema cardiovascular tem sido extensamente descrita nos últimos anos. Vários trabalhos apontam um papel central na redução da biodisponibilidade do NO com o aparecimento dessas doenças. Nesse contexto, a descoberta de produtos capazes de reverter a disfunção endotelial, e por consequência aumentar a disponibilidade de óxido nítrico nas células endoteliais poderia se tornar uma estratégia interessante no tratamento de doenças do sistema cardiovascular (SCV), especialmente da aterosclerose. E é nesse contexto que este trabalho se insere.

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade vasorrelaxante da FRP obtida das cascas da *Croton celtidifolius* através de ensaios farmacológicos *in vitro*, bem como analisar o seu possível mecanismo de ação vasorrelaxante, utilizando modelos experimentais de reatividade vascular em órgãos isolados. Além disso, pretendeu-se avaliar a atividade antiaterogênica da FRP em experimentos *in vivo*, utilizando modelo animal de aterogênese induzida pela dieta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a atividade vasorrelaxante da FRP em preparações isoladas de leito arterial mesentérico (LAM), artéria mesentérica e aorta torácica isoladas de rato;
- Avaliar o mecanismo de ação vasodilatadora em vasos de pequeno calibre, leito arterial mesentérico e artéria mesentérica isolados de ratos, analisando a influência da FRP sobre a via NO/GMPc e canais de potássio;
- Avaliar os mecanismos da ação vasodilatadora em vasos de grande calibre, aorta torácica isolada de ratos, analisando a influência da FRP sobre a via NO/GMPc;
- Investigar a participação do Ca^{2+} no mecanismo de ativação da enzima NOS pela FRP em aorta torácica isolada de ratos;

2. Objetivos

- Identificar as fontes de Ca^{2+} nas células endoteliais que induzem a ativação da enzima NOS pela FRP em aorta torácica isolada de ratos;
- Avaliar a participação da via PI3K/Akt na ativação da enzima eNOS pela FRP em aorta torácica isolada de ratos;
- Avaliar o potencial antiaterogênico da FRP no modelo de aterogênese induzida pela dieta em camundongos C57/BL6 nocautes para receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr KO) pela determinação do perfil lipídico, área de lesão aterosclerótica e reatividade vascular.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Para os ensaios de reatividade vascular foram utilizados ratos Wistar machos (10 - 12 semanas), pesando entre 200 e 250 gramas (g) e para os ensaios de aterosclerose foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr KO machos (10-12 semanas, 20-30 g), obtidos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) e gentilmente doados pela Prof^a Dr^a Marta Helena Krieger (UNICAMP – SP). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Os animais permaneceram no laboratório durante um período de pelo menos 24 horas antes da realização dos ensaios. Os camundongos foram criados e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, mantidos à 21 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC e estão cadastrados sob o número nº 330/CEUA (002728/2007-41/UFSC) e PP00105/CEUA; 264/CEUA - 23080.003548/2004-04/UFSC.

3.1.2 Drogas e Reagentes

Os seguintes compostos foram utilizados: salina tamponada (PBS), dimetilsulfóxido (DMSO), indometacina, atropina, ioimbina, pirlamina, N^o-nitro-L-arginina (L-NOARG), glibenclamida, ouabaína, cloreto de bário (BaCl₂), 4-aminopiridina (4-AP), 1H[1,2,3]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin (ODQ), HOE140, caribdotoxina (ChTx), apamina, fenilefrina (Phe), tetraetilamônio (TEA), forbol-12,13-dibutirato (PDBu), quinacrina, genisteína, lantânio, N-metilmaleimida (NEM), toxina pertussis (PTx), toxina colérica (CTx), neomicina e ACh adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, USA). Heparina e sinvastatina foram adquiridas da Roche (São Paulo-SP, Brasil). ONO-RS-082 foi adquirido do BIOMOL Research Laboratories Inc. (Campus Drive, Plymouth Meeting, PA, U.S.A.). Tirfostina A-23 foi adquirido da Calbiochem (Nottingham, U.K.) e GF109203X foi adquirido da Tocris Cookson Inc. (Langford, Bristol, U.K.). O formaldeído, bicarbonato de sódio (NaHCO₃), carbonato de sódio (Na₂CO₃), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), etanol (etOH), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de cobre (CuSO₄), álcool isopropílico, metanol (MeOH), sulfato de zinco (ZnSO₄) e potássio (KH₂SO₄) foram adquiridos junto à Vetec (Rio de Janeiro - RJ, Brasil). O cloreto de magnésio, glicose anidra e hematoxilina de Harris foram adquiridos da Merck S.A. (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Ácido acético, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), EGTA, fosfato de potássio monobásico e dibásico (KH₂PO₄), foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Os kits para determinação de colesterol total e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram adquiridos da Gold Analisa (Belo Horizonte – MG – Brasil). Tissue freezing médium foi obtido da

Jung/Leica Instruments GmbH (Alemanha). Os corantes Oil red “O” e Light Green foram obtidos da Amresco (Solon, Ohio, USA).

Todas as drogas utilizadas nos experimentos de reatividade vascular foram diluídas em salina tamponada (PBS), com exceção da glibenclamida, genisteína, GF109203X e ONO-RS-082, que foram dissolvidos em 0,2 % de DMSO, a heparina, que foi dissolvida em solução salina, e o NEM e o PDBu, que foram dissolvidos em etOH. Os reagentes utilizados nos experimentos realizados em cultura de células foram preparados conforme indicação do fabricante. A FRP foi dissolvida em água, imediatamente antes do uso.

3.1.3 Material Botânico

A FRP foi obtida das cascas da *Croton celtidifolius* pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti no Departamento de Química da UFSC, utilizando a metodologia descrita abaixo. As cascas de *Croton celtidifolius* Baill foram coletadas em março de 2000, na cidade de Orleans, Santa Catarina e a espécie foi identificada pelo Professor Daniel de Barcelos Falkenberg no Departamento de Botânica, UFSC, onde se encontra depositada uma excicata sob número de voucher, FLOR 31272.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração e caracterização da fração FRP

3.2.1.1 Extração

Para a extração da FRP, as cascas da *Croton celtidifolius* foram secas sob ventilação, cortadas em pequenos pedaços e maceradas exaustivamente em etOH 80 %, a temperatura ambiente durante sete dias. O extrato foi filtrado e o solvente evaporado sob vácuo formando um extrato bruto hidroalcoólico que foi solubilizado em acetona de maneira a obter uma solução saturada. Em seguida, foi adicionada uma grande quantidade de água que ocasionou a formação de um precipitado. Este precipitado foi removido por filtração e a solução foi transferida para um rotavapor para eliminação da acetona. A solução aquosa resultante foi submetida a uma extração com ETOAc e após remoção do solvente orgânico, obteve-se a FRP.

3.2.1.2 Caracterização

O estudo fitoquímico foi executado por fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, seguido de análise dos compostos isolados por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN). A análise em cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) mostrou que a fração FRP contém catequina 27,4 %; epicatequina 1,3 %; galocatequina 6,4 %; catequina-(4 α -8)-catequina 16,7 %; galocatequina-(4 α -8)-catequina 4,9 % e 43,3 % de proantocianidinas oligoméricas. Procedeu-se a tiólise da FRP seguida da análise em MEKC, a qual mostrou que as proantocianidinas oligoméricas são compostos majoritários constituídos por unidades de catequina e epicatequina na razão de 1,5 para 1.

Nas análises eletroforéticas foi utilizado um aparelho da Agilent Technologies HP^{3D}CE (Palo Alto, CA, U.S.A.) equipado com um detector “diode array” operado em 207 nm. Procedeu-se a separação a 25 °C em um capilar de

sílica fundida (60 cm x 375 µm diâmetro externo x 50 µm diâmetro interno) da Polymicro Technologies. Entre cada análise, o capilar foi lavado por 2 min com solução tampão. As amostras e os padrões foram injetados hidrodinamicamente a 50 mbar (4996.2 Pa) por 6 s com pressão negativa. A voltagem de separação aplicada foi de 20 kV de polaridade positiva. A aquisição e o tratamento dos dados foram executados com software HP Chemstation. A identificação dos picos foi feita por comparação de tempo de migração e os dados dos espectros obtidos foram comparados com padrões.

A tiólise da FRP foi seguida pelo procedimento descrito por Herrero-Martinez e colaboradores (2003). A fração FRP (10 mg) foi dissolvida em metanol (1 mL), em seguida uma alíquota (200 µL) foi adicionada para reação de tiólise que consiste em cisteína (50 mg) e 37 % de ácido clorídrico (20 µL) dissolvidos em metanol (930 µL). A mistura foi mantida a 65 °C por 20 min, e então a reação foi interrompida com 0,1 % v/v de solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) (1,2 mL), e injetado no eletroforese capilar.

3.2.2 Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em leito arterial mesentérico (LAM), artéria mesentérica e aorta torácica isolados de ratos normotensos

3.2.2.1 Isolamento do LAM

As preparações de leito arterial mesentérico foram isoladas dos animais conforme descrito por McGregor (1965). Os ratos foram anestesiados com uma mistura de quetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/Kg) e, em

seguida submetidos à laparotomia; o leito arterial mesentérico foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto com gaze umedecida com solução de Krebs. Os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE50) de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia e o leito vascular mesentérico removido. O intestino delgado foi então separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal.

3.2.2.2 Medida da Pressão de Perfusão do LAM

Após o isolamento, as preparações vasculares foram transferidas para uma cuba (volume de 50 mL) e constantemente perfundidas com solução de Krebs-Henseleit [(mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 0,9; NaHCO₃ 25; glicose 11] por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior a qual foi conectada a uma bomba peristáltica. A solução de Krebs-Henseleit, mantida a 37 °C e areada com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂), foi infundida à velocidade de 4 mL/min e a pressão de perfusão foi registrada continuamente em um computador, por um equipamento de análise de pressão arterial Digi-Med (Modelo 190, NY, EUA), conectado a um software de integração Digi-Med (Modelo 200). Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal se manteve entre 15 e 25 mm Hg. As drogas foram

dissolvidas em PBS e perfundidas nas concentrações desejadas, ou administradas *in bolus* diretamente no sistema (volume = 100 µL), próximo à cânula conectada na artéria mesentérica.

3.2.2.3 Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP em LAM e estudo do mecanismo de ação

Após os 30 min de repouso, uma concentração submáxima de Phe (750-1500 µg) foi adicionada ao líquido de perfusão para promover contração dos vasos e aumentar a pressão de perfusão das preparações em torno de 70 a 100 mm Hg além da pressão de perfusão basal. A Phe esteve continuamente presente no líquido de perfusão durante o experimento, exceto no experimento com Krebs despolarizante, onde o mesmo é capaz de contrair o vaso *per se*. Quando a pressão de perfusão chegou a um platô, foi administrado 200 nM de ACh (*in bolus*) para avaliar a presença do endotélio funcional, e quando houve 75 % ou mais de relaxamento, o endotélio foi considerado íntegro. Após o teste do endotélio, foram realizadas Curvas Concentração Resposta (CCR) à FRP (0,1 – 100 µg; *in bolus*). O efeito vasodilatador da FRP foi expresso como porcentagem de redução do efeito pressórico da Phe.

Para verificar a participação de produtos derivados do endotélio no efeito vasorrelaxante da FRP, os experimentos foram realizados na presença de indometacina (3 µM; inibidor da enzima ciclooxigenase), atropina (3 µM; antagonista de receptores muscarínicos), ioimbina (3 µM; antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos), pirilamina (1 µM; antagonista de receptores histaminérgicos), L-NOARG (10 µM, inibidor da enzima NOS) que foram adicionados ao líquido de perfusão. Também foram realizados experimentos

em vasos perfundidos com Krebs despolarizante (60 mM), para inibir o EDHF. Com o objetivo de avaliar a participação da via do EDHF (canais de potássio), o efeito vasorrelaxante da FRP também foi investigado em leito arterial mesentérico perfundido com glibenclamida (1 μ M; bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP), ouabaína (100 μ M; inibidor da bomba Na^+/K^+ -ATPase), BaCl_2 (100 μ M; bloqueador de canais de potássio retificadores de influxo), e 4-AP (5 mM; bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem). Com o objetivo de avaliar o efeito somatório das vias NO e EDHF na atividade vasorrelaxante da FRP, os vasos foram perfundidos concomitantemente com Krebs despolarizante (40 mM) e L-NOARG (10 μ M). Neste protocolo, a concentração de KCl foi ajustada para manter a mesma pressão de perfusão obtida nos outros protocolos. As concentrações das drogas utilizadas foram determinadas em estudos anteriores realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais. As drogas foram adicionadas ao banho 20 minutos antes da adição de Phe e não alteraram o efeito pressórico da Phe *per se*.

3.2.2.4 Isolamento da artéria mesentérica de ratos

Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 seguido de exsanguinação feita pela secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade abdominal, a artéria mesentérica foi delicadamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit e os tecidos adiposos e conectivos adjacentes foram removidos (Cortês et al., 2001).

Os vasos foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit, mantido à 37 °C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados SOFT & SOLUTIONS (KitCad 8). A tensão de repouso das preparações correspondeu a 0,5 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 min.

Após o período de equilíbrio (60 min) as preparações foram contraídas com Phe (1 μM) e a presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da ACh (1 μM) induzir ao relaxamento das preparações. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 75 % foram consideradas com endotélio íntegro.

Nos experimentos onde se pretendeu investigar a relevância do endotélio vascular na capacidade vasorrelaxante da FRP, foi realizada a remoção da camada de células endoteliais (Corrêa et al., 1991). Para este procedimento, uma das hastes metálica foi levemente friccionada contra a superfície interna das preparações. A lesão do endotélio vascular foi considerada após a verificação da ausência total de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh, 1 μM), em vasos contraídos previamente com Phe (1 μM). Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução fisiológica e mantidas em repouso por 30 minutos.

3.2.2.5 Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em artéria mesentérica isolada de ratos

Após o período de repouso foram realizadas curvas concentração resposta cumulativas (CCRc) à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica precontraídos com Phe (1 µM) na presença e ausência de endotélio funcional. Para verificar a participação de alguns mediadores vasorrelaxantes derivados do endotélio envolvidos no efeito da FRP, foram realizadas CCRc à FRP na presença ODQ (10 µM; inibidor da enzima guanilato ciclase), HOE140 (0,01 µM; antagonista de receptores B₂), ChTx (100 nM; inibidor dos canais de potássio ativados por cálcio de condutância alta e intermediária), apamina (100 nM; inibidor dos canais de potássio ativados por cálcio de baixa condutância) e ChTx (100 nM) + Apamina (100 nM), adicionadas simultaneamente, para avaliar o efeito somatórios dos canais na ação da fração. As concentrações das drogas utilizadas foram determinadas em estudos anteriores realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais. As drogas foram adicionadas 20 minutos antes da adição de Phe e não alteraram o efeito vasoconstritor da Phe *per se*.

3.2.2.6 Montagem das preparações isoladas de anel de aorta torácica de rato

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ seguido de exsanguinação feita pela secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta foi delicadamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit, e os tecidos adiposos e conectivos adjacentes foram removidos (Andriambeloson et al., 1997).

Os vasos foram seccionados na forma de anéis de 3 - 4 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total

de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit, mantida à 37 °C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados SOFT & SOLUTIONS (KitCad 8). A tensão de repouso das preparações correspondeu a 1,0 g e a solução nutritiva foi substituída a cada 15 min.

Após o período de equilíbrio (60 min) as preparações foram contraídas com Phe (1 μM) e a presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da ACh (1 μM) induzir ao relaxamento das preparações. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 75 % foram consideradas com endotélio íntegro.

Nos experimentos onde se pretendeu investigar a relevância do endotélio vascular na capacidade vasorrelaxante da FRP, foi realizada a remoção da camada de células endoteliais (Corrêa et al., 1991). Para este procedimento, uma das hastes metálicas foi levemente friccionada contra a superfície interna das preparações. A lesão do endotélio vascular foi considerada após a verificação da ausência total de relaxamento induzido pela ACh (1 μM), em vasos contraídos previamente com Phe (1 μM). Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução fisiológica e mantidas em repouso por 30 min.

3.2.2.7 Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP na reatividade vascular em aorta torácica isolada de ratos

Após o período de repouso, os anéis de aorta foram pré-contraídos com Phe (1 μM). Quando a resposta contrátil chegou a um platô, foram realizadas

CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) na presença e ausência de endotélio funcional. Para tentar identificar o composto ativo presente na fração, foram realizadas CCRc aos compostos isolados (catequina, galocatequina, dímeros, trímeros, tetrâmeros e polímeros). As concentrações utilizadas nas CCRc de cada composto foram calculada com base nas quantidades presentes dos mesmos na FRP em cada ponto da curva, ou seja, os pontos na curva representam exatamente a concentração dos mesmos na FRP.

Para verificar a participação de alguns mediadores vasorrelaxantes derivados do endotélio envolvidos no efeito da FRP, foram realizadas CCRc à FRP na presença de um inibidor da enzima NOS, L-NOARG (10 µM); de um inibidor da enzima guanilato ciclase ODQ (1 µM); um inibidor da enzima COX, indometacina (1 µM); de um antagonista dos receptores muscarínicos, atropina (1 µM); de um inibidor não seletivo dos canais de potássio, TEA (500 µM) e de dois inibidores de canais de potássio ativados por cálcio administrados simultaneamente, ChTx (100 nM) e Apamina (100 nM). Para avaliar a participação da via da PI3K na ativação da enzima NOS foi utilizado Wortmannina (30 nM), um inibidor da enzima PI3K. As drogas foram adicionadas 20 minutos antes da adição de Phe e não alteraram o efeito vasoconstritor da Phe *per se*.

Para verificar o envolvimento do cálcio extracelular na ativação da enzima NOS pela FRP, foram realizadas curvas CCRc à FRP (0,01 – 100 µg/mL) na presença e ausência de Ca²⁺ (CaCl₂) na solução fisiológica (Krebs-Henseleit), ou em presença de um bloqueador de influxo de cálcio, lantânio (100 µM) em vasos pré-contraídos com PDBu (15 e 20 nM, na presença e na ausência de cálcio na solução fisiológica, respectivamente). O lantânio foi

adicionado ao banho 20 min antes da administração de PDBu. O PDBu foi utilizado uma vez que a Phe necessita de cálcio do meio extracelular para sustentar a contração da musculatura lisa vascular (Andriambelason et al., 1999). Nos experimentos realizados na ausência de cálcio na solução fisiológica, foi adicionado EGTA (0,1 mM).

Com o objetivo de avaliar a participação das proteínas de membrana e da fosfolipase C (PLC) na ativação da enzima NOS pela FRP, foram realizadas CCRc (0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) à FRP em preparações contraídas com PDBu (10-20 nM) em presença de NEM (10 μM , agente alquilante de sulfidrilas) e neomicina (1 mM; inibidor da PLC). As drogas foram adicionadas à cuba e após 20 minutos foram realizadas curvas concentração resposta cumulativas à FRP.

Em outro grupo experimental, procurou-se avaliar a participação das proteínas G na ativação da enzima NOS pela FRP, e para tanto foram utilizadas toxina pertussis (PTx, 600 ng/mL; inibidor das proteínas G_i e G_o) e toxina colérica (CTx, 600 ng/mL; ativador das proteínas G_s). Os anéis de aorta foram pré-incubados por 12 horas à 37 °C em meio de cultura (DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino) contendo 600 ng/mL de ambas as toxinas, em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO_2 . Após o período de incubação, os anéis foram transferidos para as cubas de vidro e adaptados a transdutores, onde foram realizadas as CCRc à FRP (0,01 – 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em vasos pré-contraídos com Phe.

Para avaliar a participação da fosfolipase A_2 (PLA_2), da PKC e da tirosina quinase na ativação da enzima óxido nítrico sintase pela FRP foram utilizadas as seguintes drogas: quinacrina e ONO-RS-082 (10 μM e 1 μM , respectivamente; inibidores da PLA_2); GF109203X (5 μM ; inibidor da proteína

quinase C); tirfostina A-23 e genisteína (30 μ M para ambos inibidores da tirosina quinase) (Andriambelason et al., 1999). As drogas foram adicionadas à solução de Krebs-Henseleit 20 minutos antes da realização das CCRc (0,01 – 100 μ g/mL) à FRP em anéis pré-contraídos com Phe (1 μ M).

3.2.3 Ensaios biológicos *in vivo* (Aterosclerose Experimental)

3.2.3.1 Animais e protocolo experimental

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr KO, com 12 semanas de idade (Cyrus et al., 2002). Os animais foram divididos em grupos (n = 8 - 10) e receberam dieta hipercolesterolêmica (HC - contendo 1,25 % de colesterol), obtida do departamento de nutrição da UNICAMP, ou dieta comercial (DC), durante noventa dias concomitantemente com o tratamento com diferentes doses de FRP, veículo (água) ou sinvastatina (10 mg/kg; controle positivo). Os grupos experimentais foram os seguintes:

- **Grupo Selvagem:** animais selvagens que receberam dieta DC e veículo;
- **Grupo Selvagem + FRP:** animais selvagens que receberam dieta DC e tratamento com FRP (10 mg/kg);
- **Grupo Controle:** animais controle (LDLr KO) que receberam dieta DC e veículo;
- **Grupos Controle + FRP:** animais controle (LDLr KO) que receberam dieta DC e tratamento com FRP (10 mg/Kg);
- **Grupo Controle Hipercolesterolêmico:** animais controle (LDLr KO) que receberam dieta HC e veículo;

- **Grupos Hipercolesterolêmicos Tratados:** animais (LDLr KO) que receberam dieta hipercolesterolêmica e tratamento com diferentes doses de FRP (0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 mg/kg, respectivamente).
- **Grupo Controle Positivo:** animais (LDLr KO) que receberam a dieta hipercolesterolêmica e tratamento com sinvastatina (10 mg/kg).

O tratamento dos animais com diferentes doses de FRP ou veículo (controle) foi realizado diariamente, uma vez ao dia, por via oral (gavagem). O peso dos animais foi avaliado no início e final do período de tratamento e a ingestão alimentar avaliada diariamente.

3.2.3.2 Obtenção do Soro e Determinação de Lipoproteínas

Após o término do tratamento os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). Em seguida, foi realizada a abertura da cavidade abdominal, a veia cava inferior foi localizada e o sangue do animal removido e transferido para um microtubo. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 3000 rotações por minutos (RPM) durante 15 min e o soro obtido foi utilizado para a determinação do colesterol total e da fração HDL utilizando reagentes comerciais. A determinação da fração colesterol VLDL + LDL foi realizada indiretamente, através da diferença entre colesterol total e fração HDL, pela equação: lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) + LDL = Colesterol Total – Fração HDL

3.2.3.3 Reatividade Vascular

A aorta torácica foi removida após a eutanásia e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica a 37 °C, e os tecidos adiposos e

conectivos adjacentes foram removidos. Os vasos foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit, mantido a 37°C, pH 7,4 e aeradas com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados SOFT & SOLUTIONS (KitCad 8). A tensão de repouso das preparações correspondeu a 0,5 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 min.

Após o período de equilíbrio (60 min), os anéis de aorta foram contraídos com concentrações crescentes cumulativas de Phe (1 nM a 3 μM), e assim que foi obtido um platô de contração, foi verificada a capacidade de relaxamento dos vasos com concentrações crescentes cumulativas de ACh (1 nM a 3 μM).

3.2.3.4 Análise histológica: Área de lesão aterosclerótica

Após a retirada da aorta, os corações foram perfundidos através do ventrículo direito com salina seguida de formaldeído 10 %. Os corações foram fixados por 24 h em formaldeído 10 % e então embebidos em gelatina 5, 10 e 25 %. O processamento histológico e coloração dos cortes foram realizados como descrito por Paigen e colaboradores (1987). Resumidamente, após a aplicação de Tissue Freezing Medium nos blocos de gelatina contendo os corações, estes foram cortados transversalmente em criostato a uma temperatura de -25 °C com uma espessura de 20 μm cada corte, a partir do início da aorta, totalizando uma área de 480 μm, utilizando-se para a localização desta área a visualização microscópica das válvulas semi-lunares. Os cortes foram corados com Oil Red "O" e contracorados com *Light Green* e

hematoxilina de Harris, e observados em microscopia óptica.

3.2.4 Apresentação dos Resultados e Análise Estatística

Os relaxamentos induzidos pela FRP foram apresentados como porcentagem de relaxamento em relação à contração máxima induzida pela Phe ou PDBu. Os valores de relaxamento foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média).

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ou Dunnet. As diferenças ponto a ponto entre os valores experimentais obtidos com diferentes grupos, que apresentaram níveis de probabilidade iguais ou menores do que 5 % ($p < 0,05$ %) foram considerados estatisticamente significantes.

4.1 Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em LAM, artéria mesentérica e aorta torácica isoladas de ratos normotensos

4.1.1 Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP em LAM e estudo do mecanismo de ação

Em experimentos realizados em LAM pré-contraído com Phe, foram realizadas CCR à FRP (0,1 – 100 ug) administradas *in bolus*. A FRP apresentou um efeito vasorrelaxante dependente da concentração, demonstrado pela redução da pressão de perfusão, como pode ser observado na figura 04.

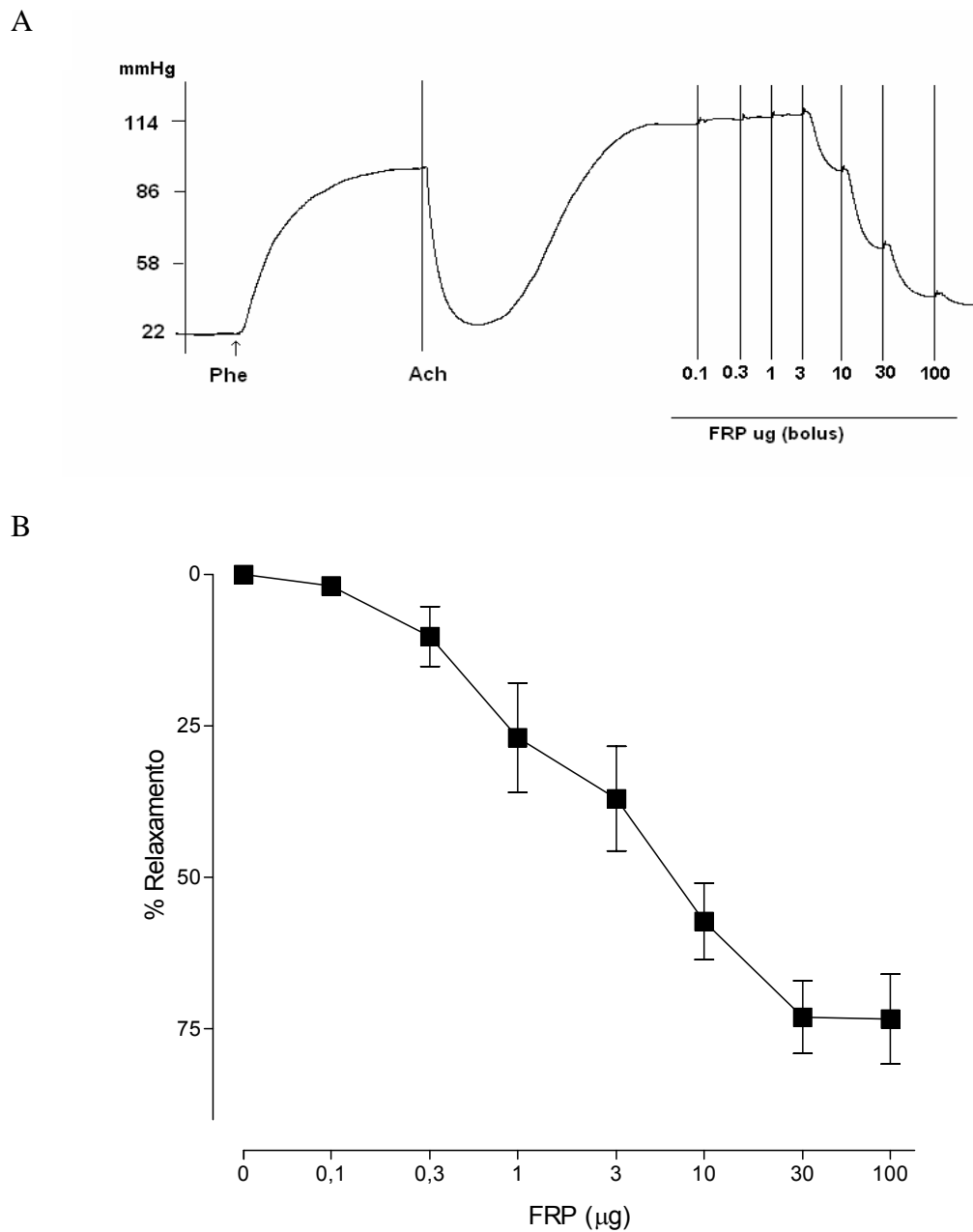


Figura 04. Efeito vasorrelaxante da FRP em LAM: (A) Registro típico da pressão de perfusão (mm Hg) demonstrando o efeito vasorrelaxante da FRP (B) CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ *in bolus*) em LAM perfundidos continuamente com Phe (750 - 1500 µg). Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo.

Foram realizadas CCR à FRP na presença de indometacina (3 µM), atropina (3 µM), ioimbina (3 µM) ou pirlamina (1 µM), para investigar se o efeito

vasorrelaxante da FRP, os quais não foram capazes de alterar o efeito vasorrelaxante da fração (Fig 05 e Tabela 03).

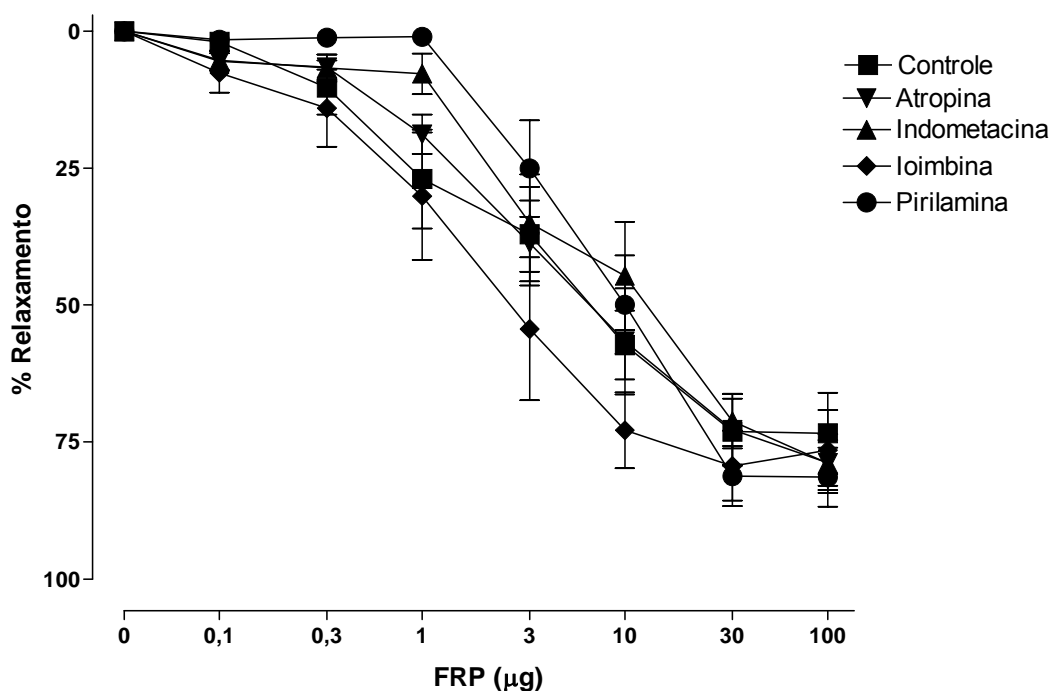


Figura 05: Efeito vasorrelaxante da FRP em LAM na presença de indometacina, atropina, ioimbina e pirlamina: CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ *in bolus*) em LAM perfundido continuamente com Phe (750 - 1500 µg). Efeito da indometacina (3 µM), atropina (3 µM), ioimbina (3 µM) e da pirlamina (1 µM) em preparações com endotélio funcional, adicionados 20 minutos antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo.

O pré-tratamento dos vasos com L-NOARG (10 µM) e com Krebs despolarizante (60 mM) reduziu significativamente o efeito vasodilatador da fração em 71 % e 27 %, respectivamente, quando testados isoladamente (Fig 06), e aboliram o efeito da fração quando utilizados concomitantemente [L-NOARG (10 µM) e Krebs despolarizante (40 mM)] (Fig 06 e Tabela 03) quando testadas em LAM.

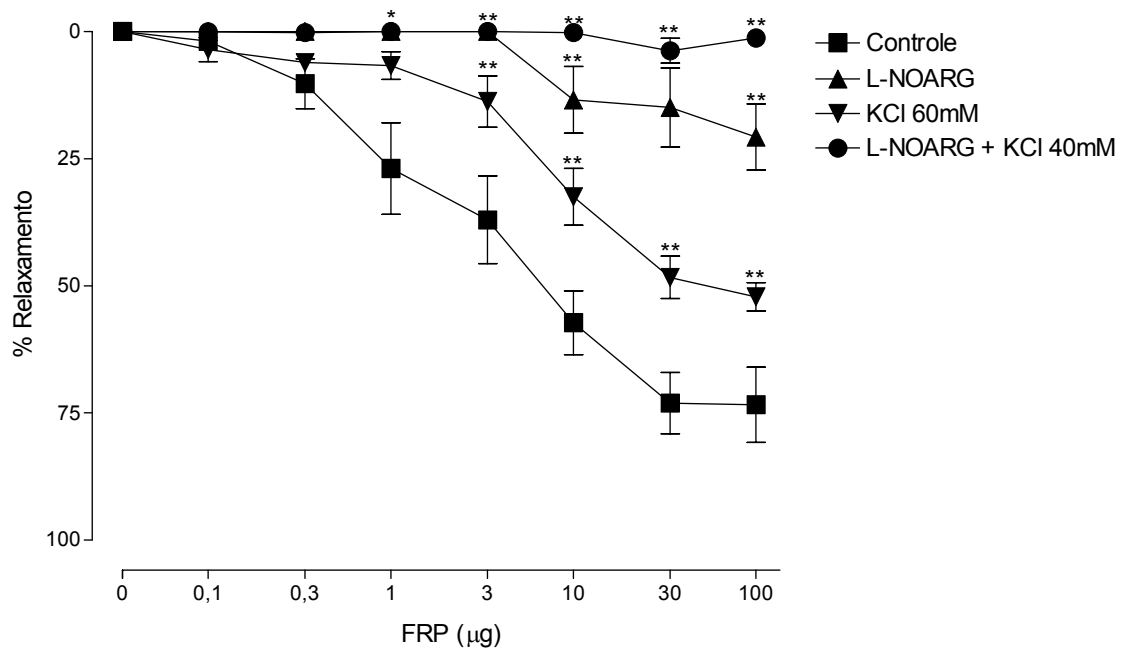


Figura 06: Efeito vasorrelaxante da FRP em LAM na presença de L-NOARG e do Krebs despolarizante: CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ *in bolus*) em LAM perfundido continuamente com Phe (750 - 1500 µg). Efeito da L-NOARG (10 µM), do Krebs despolarizante (60 mM) e de ambos perfundidos simultaneamente (L-NOARG, 10 µM + Krebs despolarizante, 40 mM) em preparações com endotélio funcional, adicionados 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao controle (FRP) (ANOVA/ Dunnett).

Com o objetivo de avaliar a participação de diferentes canais de potássio (EDHF) no efeito vasorrelaxante da FRP, os vasos foram perfundidos com glibenclamida (1 µM), ouabaína (100 µM), BaCl₂ (100 µM) e 4-AP (5 mM), e nenhum dos inibidores de canais de potássio foi capaz de produzir qualquer alteração no efeito da FRP (Fig 07 e Tabela 03).

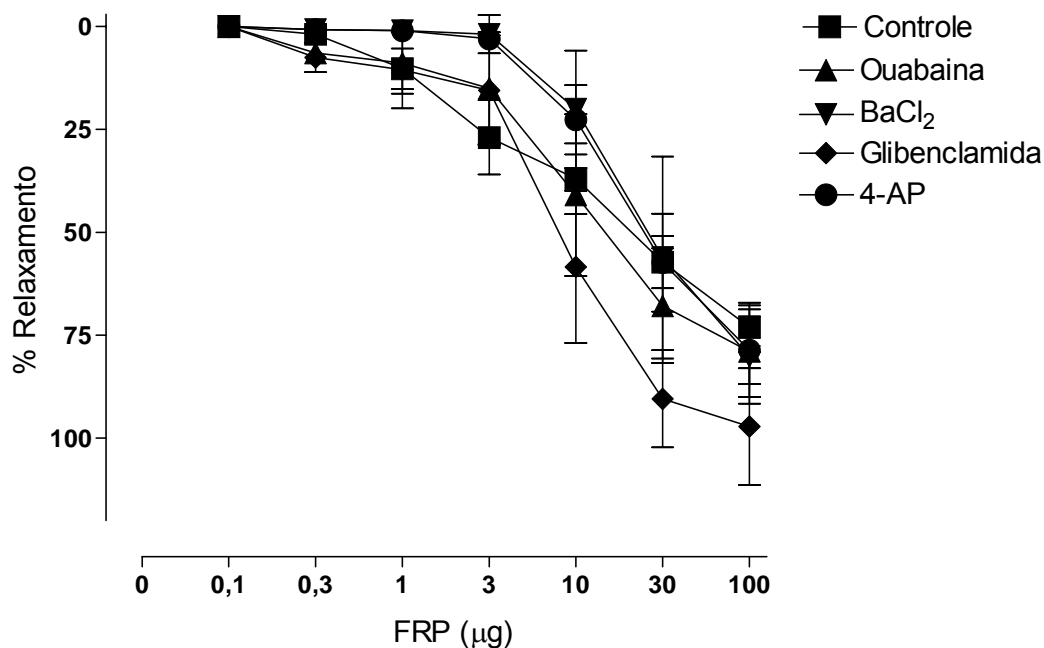


Figura 07: Efeito vasorrelaxante da FRP em LAM na presença de glibenclamida, ouabaina, BaCl₂ e 4-aminopiridina: CCR à FRP (0,1 – 100 µg/ *in bolus*) LAM perfundido continuamente com Phe (750 - 1500 µg). Efeito da glibenclamida (1 µM), ouabaina (100 µM), BaCl₂ (100 µM) e da 4-AP (5 mM) em preparações com endotélio funcional, adicionados 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo.

Tabela 03: Valores de relaxamento máximo (R_{máx}) expressos em porcentagem dos valores obtidos para FRP em LAM pré-contraído com Phe, com ou sem diferentes tratamentos.

Grupo experimental	R _{máx} (%)
PRF	73,4 ± 4,4
+ Indometacina	78,9 ± 5,4
+ Atropina	78,8 ± 4,2
+ Ioimbina	79,3 ± 6,4
+ Pirilamina	81,4 ± 5,4

+ L-NOARG	20,8 ± 6,5**
+ Krebs despolarizante	52,2 ± 2,8**
+ LNOARG + Krebs despolarizante	1,3 ± 1,3**
+ Ouabaína	78,9 ± 11,1
+ BaCl ₂	81,8 ± 12,5
+ Glibenclamida	94,6 ± 16,8
+ 4-AP	79,6 ± 6,7

Valores expressos como Média ± EPM; ** $p < 0,1$ em relação ao grupo FRP.

4.1.2 Avaliação do efeito da FRP na reatividade vascular em artéria mesentérica isolada de ratos normotensos

Para continuar investigando o efeito vasorrelaxante da FRP em vasos de pequeno calibre, os experimentos foram conduzidos em artéria mesentérica isolada. A adição cumulativa CCRc de FRP (0,1 – 100 µg/mL) produziu um efeito vasorrelaxante dependente da concentração em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com Phe (1 µM) com o endotélio íntegro (Fig 08). Entretanto, quando a camada de células endoteliais foi retirada mecanicamente, a resposta relaxante da FRP foi praticamente abolida, quando comparada com o efeito da fração em vasos com endotélio íntegro (Fig 08 e Tabela 04).

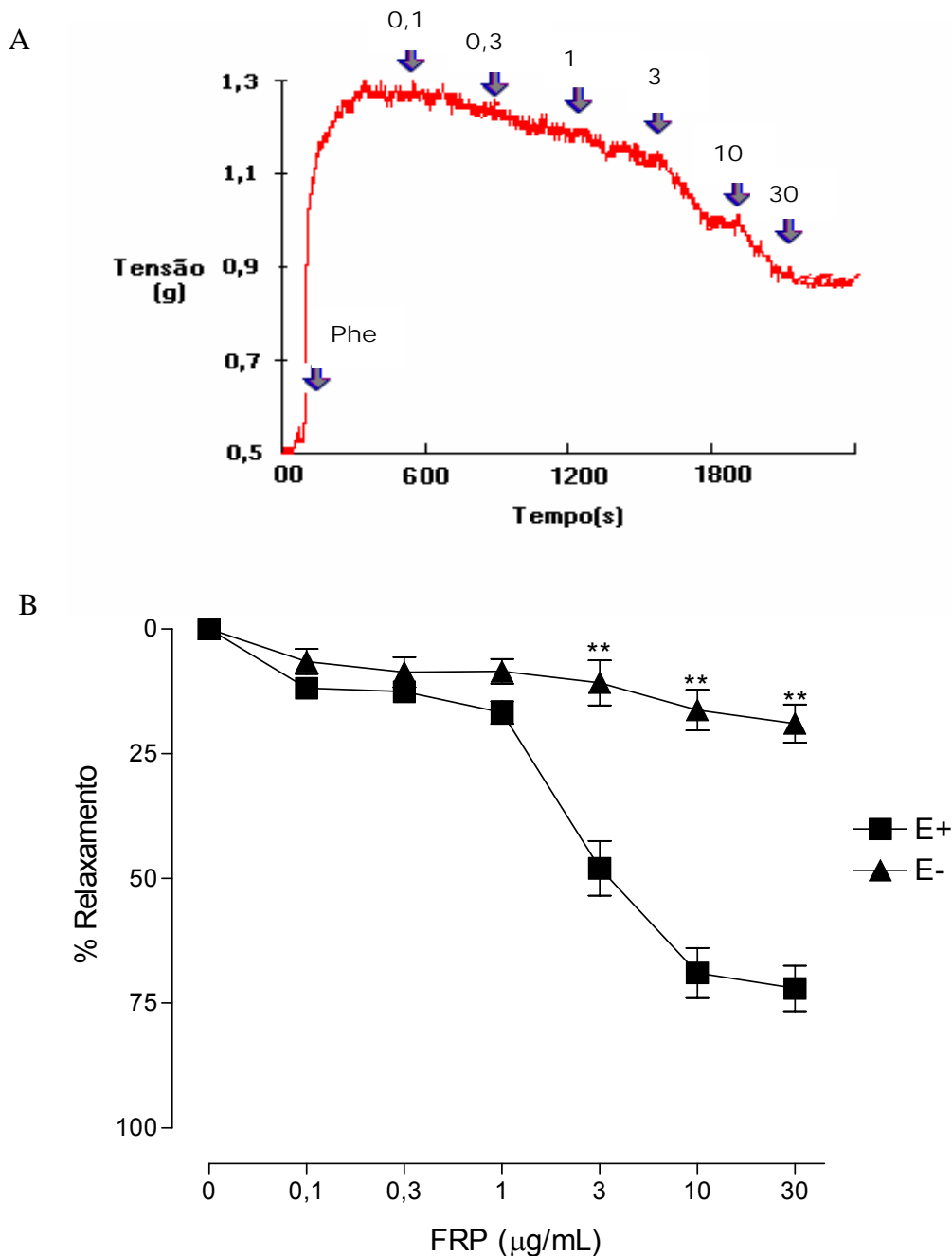


Figura 08: Efeito vasorrelaxante da FRP em artéria mesentérica isolada: (A) Registro típico da CCRc à FRP (0,1 – 30 µg/mL) (B) Curva concentração resposta cumulativa (CCRc) à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com (E+) e sem (E-) endotélio funcional. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo E+ (ANOVA/Dunnett).

Para confirmar a participação da via NO-GMPc, as artérias mesentéricas foram pré-incubadas com ODQ (10 µM), um inibidor da enzima guanilato

ciclase. Esta estratégia confirmou os dados obtidos em LAM, uma vez que o ODQ foi capaz de reduzir significativamente o efeito vasorrelaxante da FRP, como observado na figura 09. Em outro grupo experimental, foi testado o efeito do HOE140, um antagonista de receptores B₂ da bradicinina, o qual não foi capaz de alterar o efeito da FRP (Fig 09 e Tabela 04).

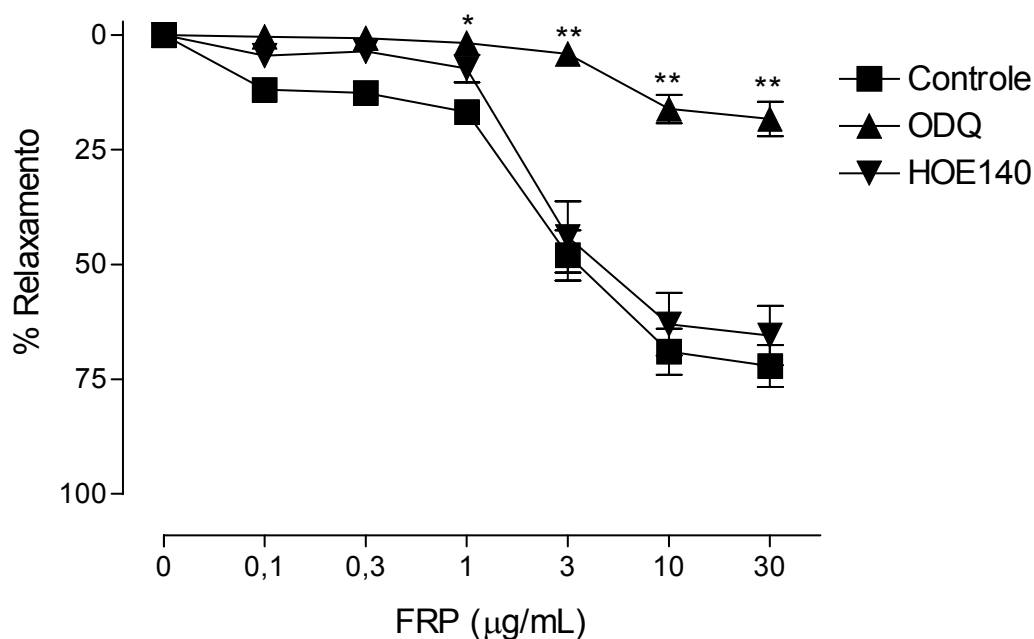


Figura 09: Efeito vasorrelaxante da FRP em artéria mesentérica isolada na presença de ODQ e HOE140: CCRc à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito do ODQ (10 µM) e do HOE140 (0,01 µM), adicionados 20 minutos antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. * p<0,05; **p<0,01 representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (FRP) (ANOVA/ Dunnett).

Em vasos pré-contraídos com Phe (1 µM), o efeito máximo vasorrelaxante da FRP foi significativamente reduzido (49,2 %) quando os vasos foram previamente incubados com ChTx (100 nM) e apamina (100 nM) (Fig 10). A ChTx isoladamente também foi capaz de reduzir o efeito vasorrelaxante da FRP, entretanto a apamina não foi (Fig 10 e Tabela 04). Estes dados sugerem

a participação dos canais de potássio ativados por cálcio de condutância alta e intermediária no efeito final da fração.

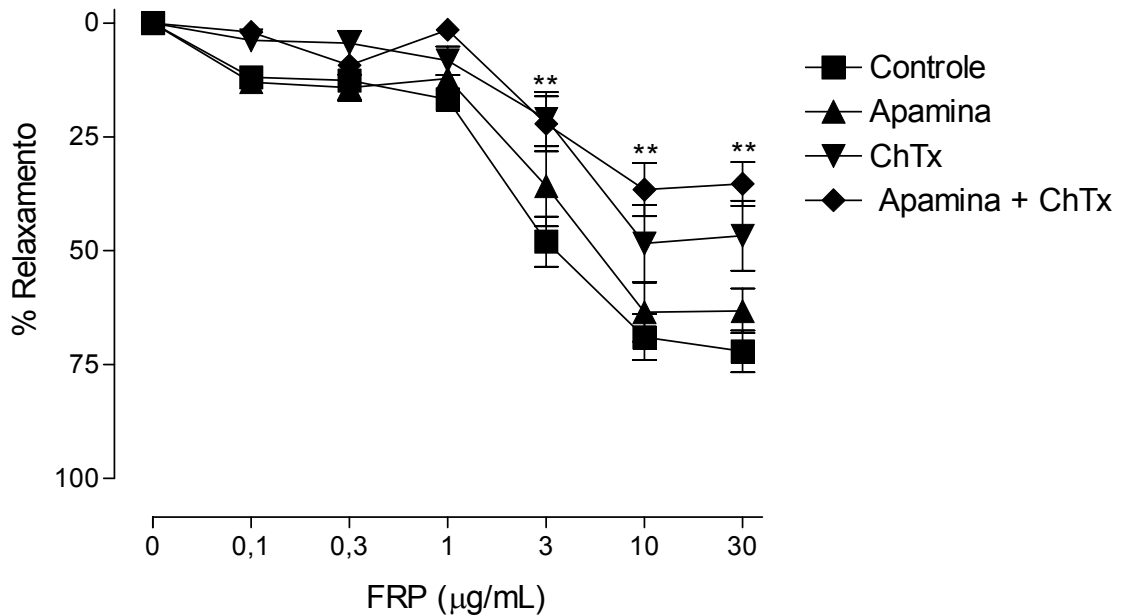


Figura 10: Efeito vasorrelaxante da FRP em artéria mesentérica isolada de ratos na presença de ChTx e apamina: CCRc à FRP (0,1 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da ChTx (100 nM), da apamina (100 nM) e de ambas as toxinas incubadas simultaneamente (ChTx, 100 nM + apamina, 100 nM), adicionados 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. **p<0,01 representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (FRP) (ANOVA/ Dunnett).

Tabela 04: Valores de R_{máx} expressos em porcentagem dos valores obtidos para FRP em artéria mesentérica isolada pré-contraída com Phe, com ou sem diferentes tratamentos.

Grupo experimental	R _{máx} (%)
FRP E+	72,1 ± 4,6
FRP E-	19,0 ± 3,8**
+ ODQ	18,3 ± 3,8**
+ HOE140	65,5 ± 6,5
+ Apamina	63,5 ± 4,9
+ ChTx	48,5 ± 8,5**
+ Apamina + ChTx	36,6 ± 5,9**

Valores expressos como Média ± EPM; ** $p < 0,1$ em relação ao grupo FRP E+.

4.1.3 Caracterização do efeito vasorrelaxante da FRP na reatividade vascular em aorta torácica isolada de ratos

O efeito vasorrelaxante da FRP também foi avaliado em vasos de grande calibre. Em anéis de aorta torácica pré-contraídos com Phe (1 μ M), a FRP (0,1 – 100 μ g/mL) produziu um efeito vasodilatador dependente da concentração, em vasos com o endotélio íntegro (Fig 11 e Tabela 05). Entretanto, quando o endotélio foi removido mecanicamente, o efeito vasodilatador da fração foi abolido, como pode ser visualizado na Fig 11.

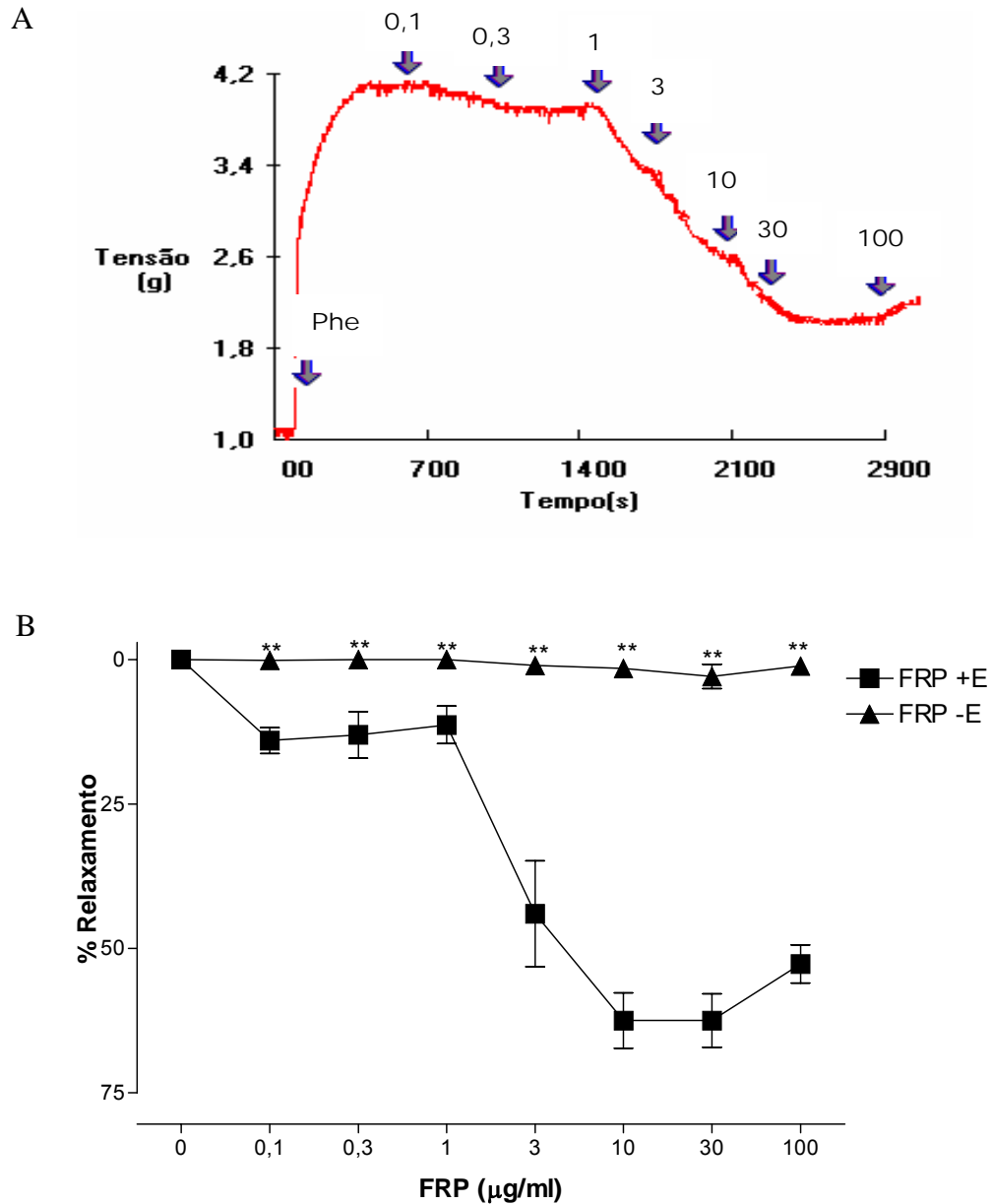


Figura 11: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato: (A) Registro típico da CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL); (B) CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com (+E) e sem (-E) endotélio funcional. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. **p<0,01 representa a diferença significativa em relação ao grupo +E (ANOVA/ Dunnett).

Quando se utilizou os compostos isolados a partir da FRP (monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros e polímeros), em concentrações equivalentes às encontradas na fração, em anéis de aorta torácica pré-contraídos com

Phe (1 μ M), observou-se que os compostos isoladamente apresentam atividade vasorrelaxante dependente da concentração comparada à FRP. Nas concentrações mais elevadas, o dímero, trímero e tetrâmero apresentaram efeito vasorrelaxante (Fig 12).

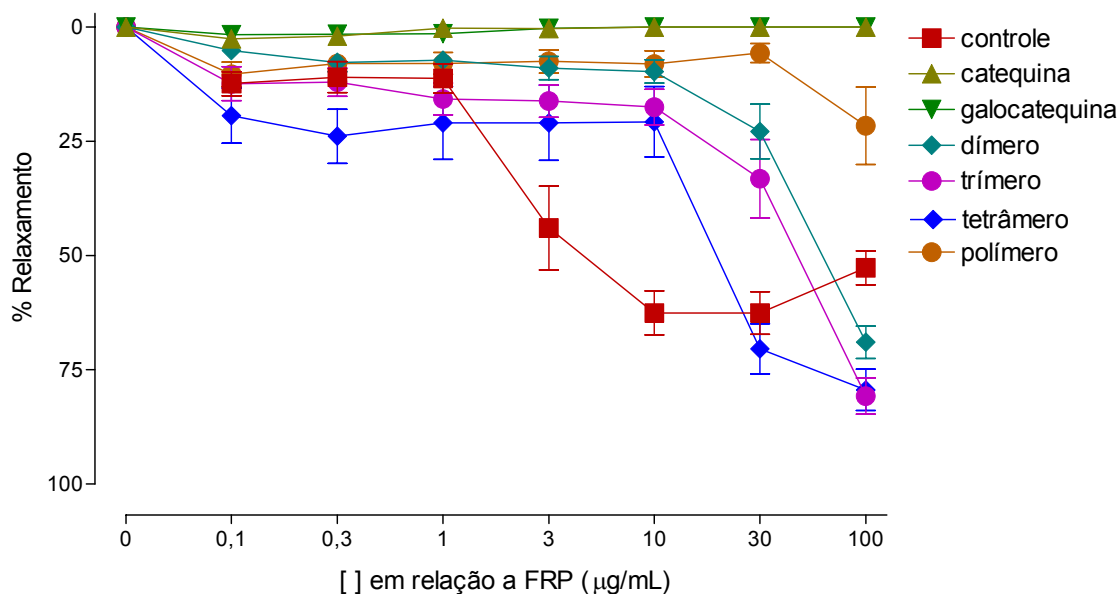


Figura 12: Efeito vasorrelaxante dos compostos isolados da FRP em aorta torácica isolada de rato: CCRc à FRP (controle) e aos compostos isolados presentes na FRP em concentrações equivalentes às encontradas na fração em anéis de aorta torácica pré-contraídos com Phe (1 μ M) em preparações com endotélio funcional. As concentrações expressas no eixo das abscissas representam a concentração relativa à FRP de cada um dos compostos isolados em cada ponto da curva original da fração. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação \pm EPM de 6 a 8 experimentos por grupo.

Para identificar sobre qual via a FRP está agindo no endotélio, foram realizadas CCRc à FRP (0,1 – 100 μ g/mL) em presença de indometacina (1 μ M), atropina (1 μ M), TEA (500 μ M), e em presença simultânea de ChTx (100 nM) e apamina (100 nM). Nenhum destes tratamentos alterou o efeito vasorrelaxante da FRP (Fig 13 e Tabela 05).

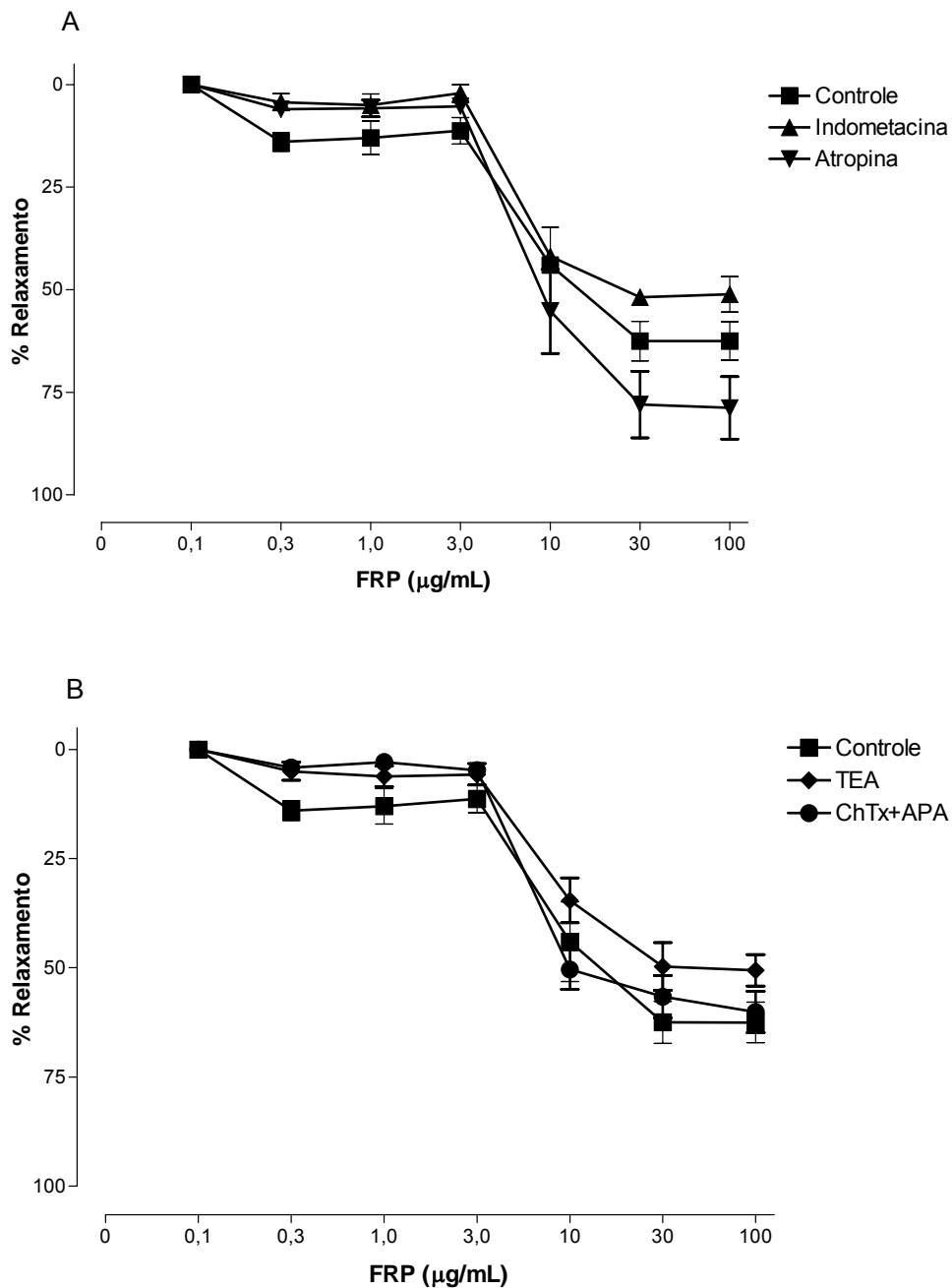


Figura 13: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato na presença de indometacina, atropina, TEA e ChTx + apamina: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da indometacina (1 µM), atropina (1 µM), TEA (500 µM), e da presença de ChTx (100 nM) + apamina (100 nM) adicionados 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo.

Entretanto, assim como nos experimentos realizados em LAM, o pré-tratamento dos vasos com um inibidor da enzima NOS, L-NOARG (10 μ M), e um inibidor da enzima guanilato ciclase, ODQ (1 μ M) foram capazes de reduzir o efeito máximo FRP em 100 % e 95 %, respectivamente (Fig 14 e Tabela 05).

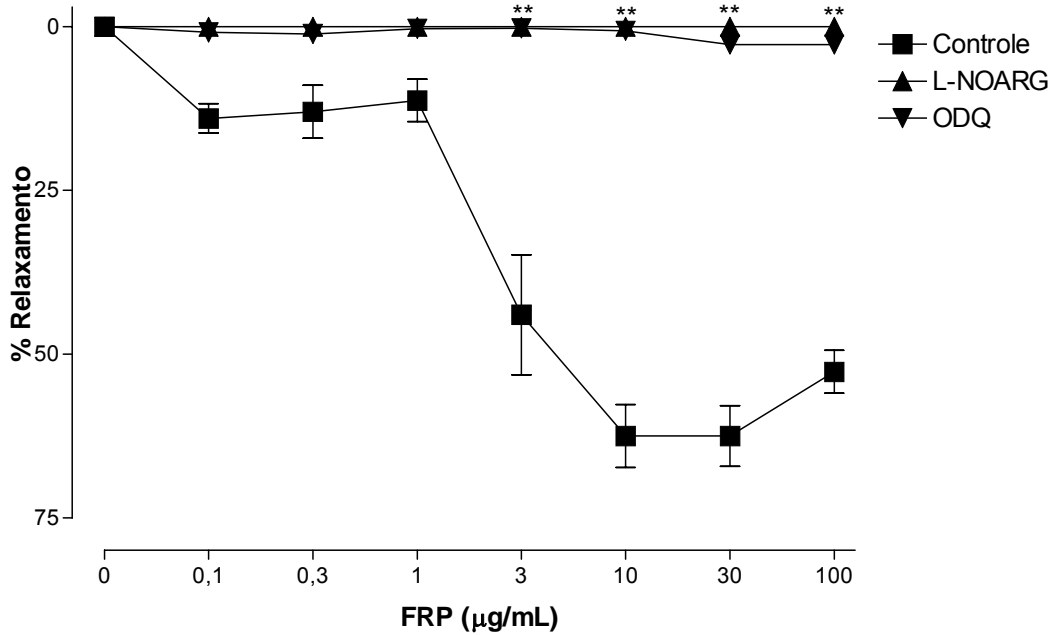


Figura 14: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato na presença de L-NOARG e ODQ: CCRc à FRP (0,1 – 100 μ g/mL) em anéis de aorta torácica pré-contraídos com Phe (1 μ M) em preparações com endotélio funcional. Efeito do L-NOARG (10 μ M) e do ODQ (1 μ M) adicionados 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação \pm EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. **p<0,01 representa a diferença significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 05: Valores de R_{máx} expressos em porcentagem dos valores obtidos para FRP em aorta isolada pré-contraída com Phe, com ou sem diferentes tratamentos.

Grupo experimental	R _{máx} (%)
PFR E+	62,5 ± 4,6
PRF E-	2,9 ± 2,1**
+ Indometacina	52,4 ± 4,3
+ Atropina	78,8 ± 7,6
+ TEA	50,5 ± 3,5
+ Apamina + ChTx	60,1 ± 4,7
+ L-NOARG	0,0 ± 0,0**
+ ODQ	2,7 ± 1,0**
+ Genisteína	90,8 ± 4,6
+ Tirfostina A23	59,1 ± 2,9
+ GF109203X	86,0 ± 3,9
+ Quinacrina	72,0 ± 6,1
+ ONO-RS-082	52,0 ± 3,6
+ Wortmannina	21,2 ± 2,4**

Valores expressos como Média ± EPM; ** $p < 0,1$ em relação ao grupo FRP.

Em vasos pré-contraídos com PDBu (15-20 nM), a FRP apresentou um efeito vasodilatador (Fig 15 e Tabela 06) semelhante àquele observado em vasos pré-contraídos com Phe. O efeito vasorrelaxante da FRP foi abolido quando o Ca²⁺ foi retirado da solução nutritiva e foi significativamente diminuído quando na presença de um bloqueador do influxo de Ca²⁺, lantânio (100 μM) (Fig 15 e Tabela 06).

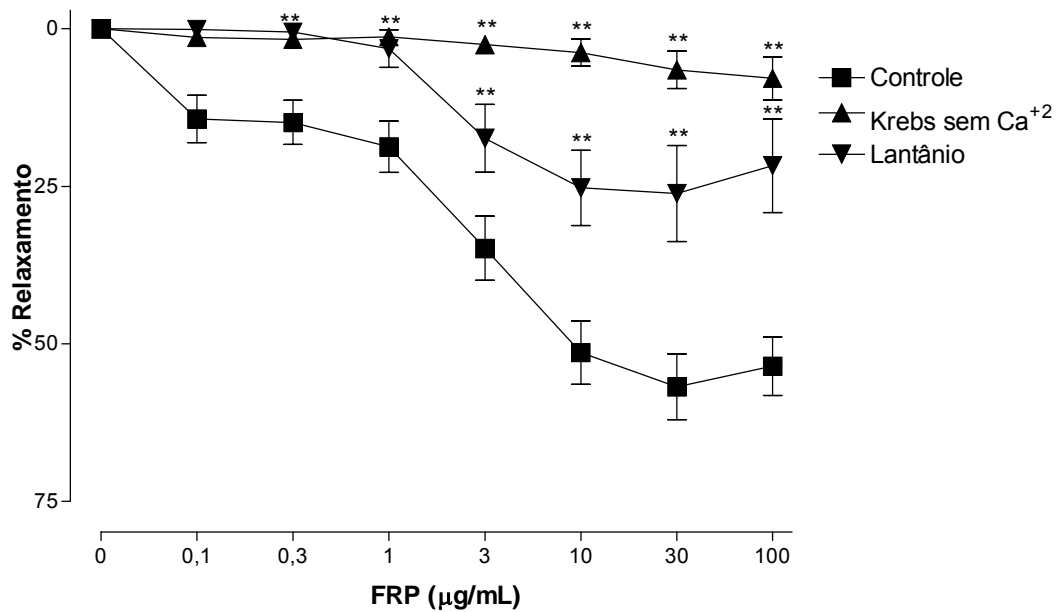


Figura 15: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato na presença e ausência de Ca^{2+} e na presença de lantânio: CCRc à FRP (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica pré-contraídos com PDBu (15 - 20 nM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da ausência de Ca^{2+} (Krebs sem Ca^{2+}) e do Lantânio (100 μM), adicionado 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação \pm EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (FRP) (ANOVA/ Dunnett).

O pré-tratamento dos vasos com o inibidor da enzima PI3K, wortmannina (30 nM) promoveu uma redução significativa da vasodilatação induzida pela FRP em aorta torácica isolada de ratos (Fig 16 e Tabela 05), sugerindo que a ativação da enzima NOS é dependente da fosforilação iniciada pela ativação da PI3K, além daquela induzida pelo influxo de Ca^{2+} .

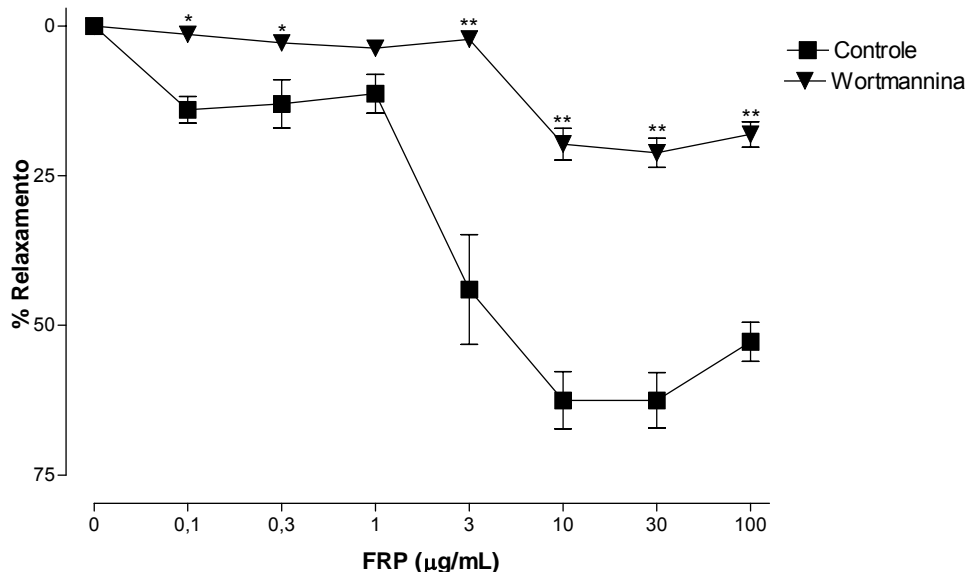


Figura 16: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato na presença de wortmannina: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica pré-contraídos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito do wortmannin (30 nM) adicionado 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA/Dunnett).

O resultado anterior sugere que a fração induz o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular endotelial promovendo o efeito vasorrelaxante da FRP. Por este motivo, as prováveis fontes de Ca^{2+} foram estudadas utilizando-se diferentes drogas. Um agente alquilante de sulfidrilas, NEM (10 µM) diminuiu significativamente o efeito vasorrelaxante da FRP, como pode ser observado na figura 17. Da mesma forma, um inibidor da enzima PLC, neomicina (1 mM) também foi capaz de reduzir significativamente o efeito da FRP, em vasos contraídos previamente com PDBu (Fig 17 e Tabela 06).

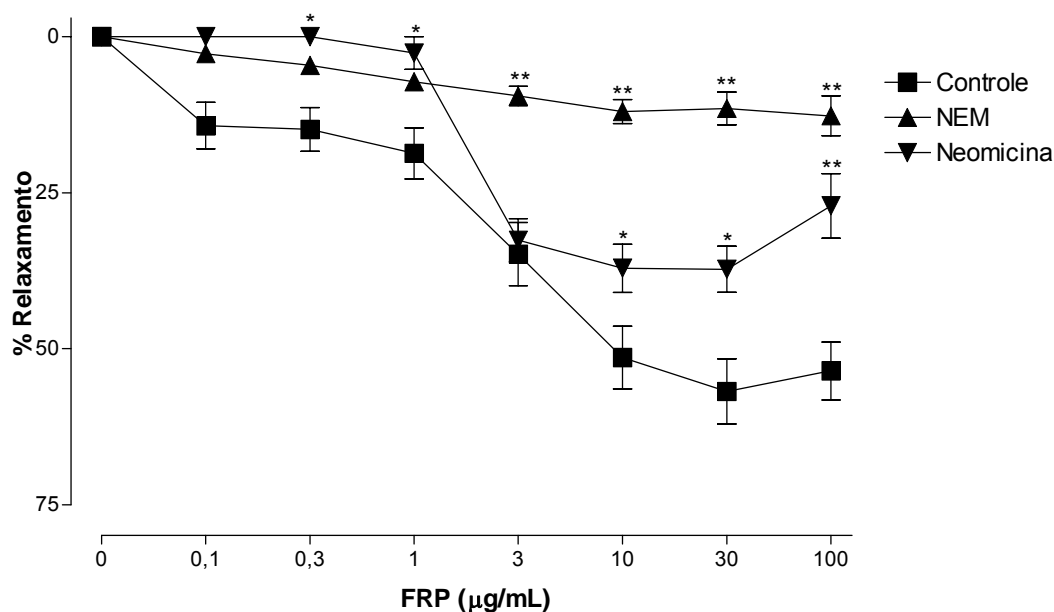


Figura 17: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato na presença de NEM e neomicina: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica pré-contraídos com PDBu (15 - 20 nM) em preparações com endotélio funcional. Efeito do NEM (10 µM) e da neomicina (1 mM), adicionado 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (FRP) (ANOVA/ Dunnett).

Tabela 06: Valores de $R_{m\acute{a}x}$ expressos em porcentagem dos valores obtidos para FRP em aorta isolada pré-contraída com PDBu, com ou sem diferentes tratamentos.

Grupo experimental	$R_{m\acute{a}x}$ (%)
PFR na presença de cálcio	$56,8 \pm 5,2$
PRF na ausência de cálcio	$6,5 \pm 2,9^{**}$
+ Lantânio	$26,1 \pm 7,6^{**}$
+ NEM	$12,7 \pm 3,2^{**}$
+ Neomicina	$37,2 \pm 3,6^*$

Valores expressos como Média ± EPM; ** $p < 0,1$ em relação ao grupo FRP.

Para investigar outras possíveis vias envolvidas no influxo de cálcio na célula endotelial, os vasos foram incubados com dois diferentes inibidores da enzima PLA₂, quinacrina e ONO-RS-082, em vasos pré-contraídos com Phe. Da mesma forma, os inibidores da enzima tirosina quinase, genisteína e tirfostina A23 não promoveram qualquer alteração no efeito da fração (Fig 18 e Tabela 05). Também foi utilizado um inibidor da PKC, GF109203 (5 μM), em vasos pré-contraídos com Phe, que não foi capaz de inibir o efeito vasorrelaxante da FRP (Fig 18 e Tabela 05).

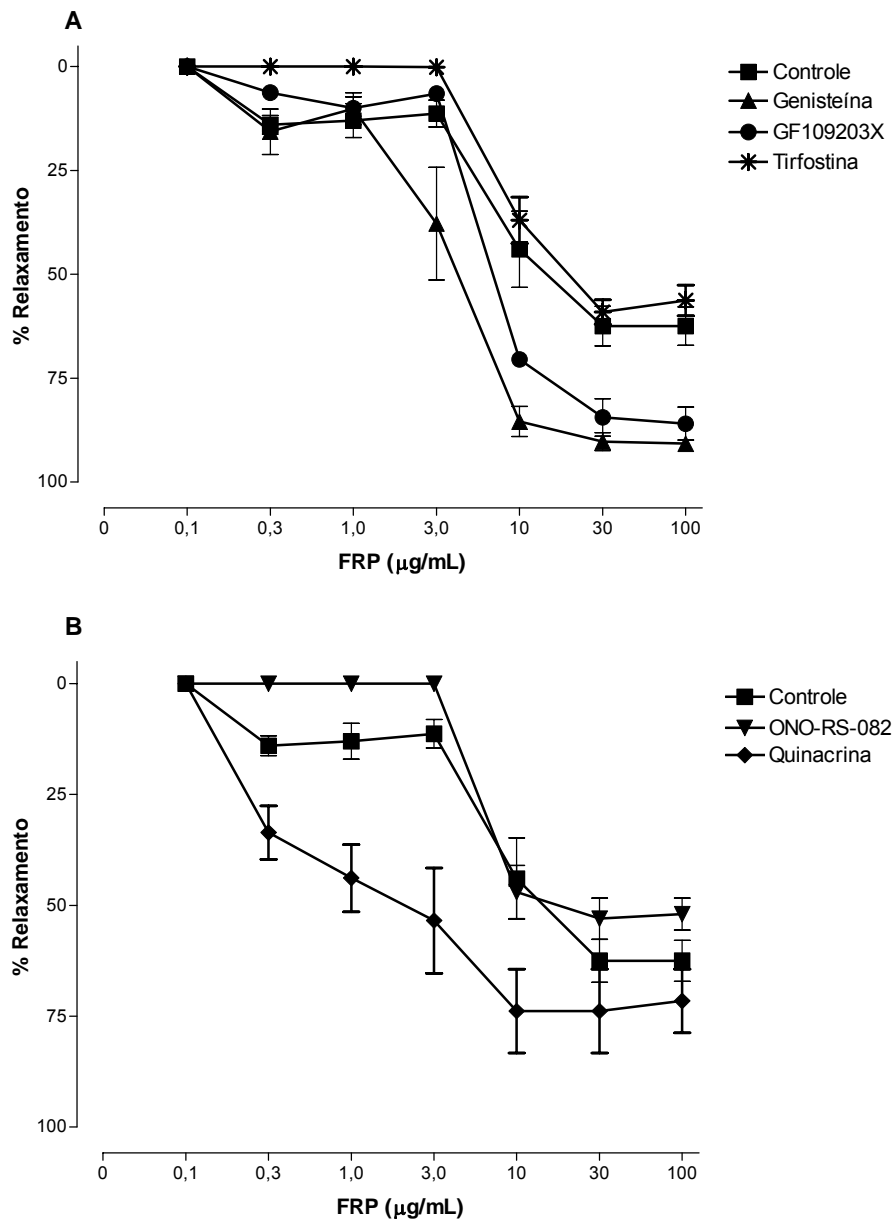


Figura 18: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato na presença de genisteína, tirfostina A23, quinacrina, GF109203X e ONO-RS-082: CCRC à FRP (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta pré-contraídos com Phe (1 μM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da genisteína (30 μM), tirfostina A23 (30 μM), quinacrina (10 μM), GF109203X (5 μM), e do ONO-RS-082 (1 μM), adicionado 20 min antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação \pm EPM de 6 a 8 experimentos por grupo.

Além disso, os anéis foram incubados por 12 h em meio de cultura (DMEM) contendo 600 ng/mL de PTx ou CTx, para avaliar a participação de receptores

acoplados à proteína G no efeito vasorrelaxante da FRP. Entretanto, o tratamento com ambas as toxinas não alterou o perfil de resposta dos vasos à FRP, como demonstrado na Fig 19 e na tabela 07.

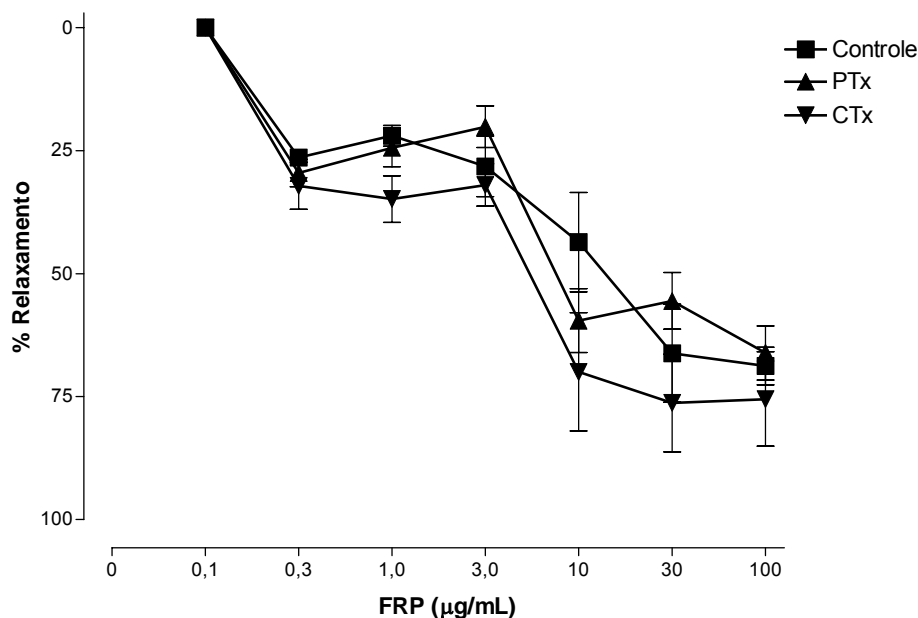


Figura 19: Efeito vasorrelaxante da FRP em aorta torácica isolada de rato na presença de PTx e CTx: CCRc à FRP (0,1 – 100 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de ratos Wistar machos pré-contráidos com Phe (1 µM) em preparações com endotélio funcional. Efeito da PTx (600 ng/mL) e da CTx (600 ng/mL) em anéis pré-incubados por 12 h antes da realização da curva. Os resultados estão expressos como médias das porcentagens de relaxamento em relação à contração máxima de cada preparação ± EPM de 6 a 8 experimentos por grupo.

Tabela 07: Valores de R_{máx} expressos em porcentagem dos valores obtidos para FRP em aorta isolada pré-contráida com Phe, com ou sem diferentes tratamentos.

Grupo experimental	R _{máx} (%)
FRP	68,8 ± 3,8
+ PTx	66,1 ± 5,5
+ CTx	75,5 ± 9,6

4.2 Ensaio biológico *in vivo*

4.2.1 Determinação de Lipoproteínas

Após o tratamento de noventa dias, o sangue dos camundongos foi retirado e foram determinados os níveis de colesterol total, colesterol HDL e colesterol VLDL+LDL. Conforme esperado, os animais LDLr KO apresentaram níveis séricos de colesterol total mais altos, quando comparados aos animais selvagens, mesmo quando alimentados com dieta comercial. Quando os animais LDLr KO recebem dieta HC, as concentrações séricas de colesterol aumentam significativamente. O tratamento com FRP nos animais controle, tanto selvagens quanto nocautes, que receberam dieta comercial não produziram alterações significativas nos níveis de lipídios (Fig 20A). Não se observou diferença estatística entre o nível de colesterol total dos animais controle que receberam dieta HC e os animais tratados com FRP nas diferentes doses (Fig 20B), nem nos animais tratados com sinvastatina (Fig 20B).

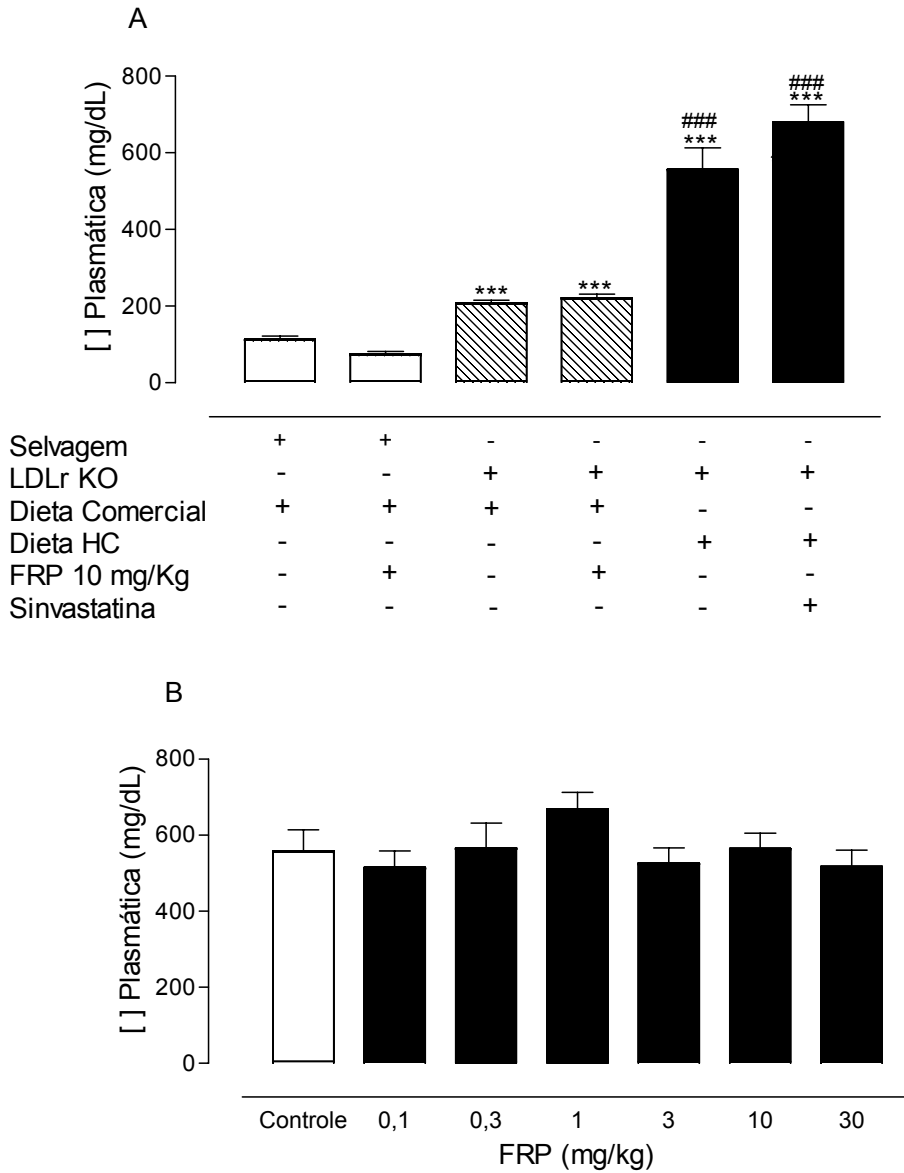


Figura 20: Determinação de colesterol total no soro de animais C57/Bl6 selvagens e LDLr KO. (A) Animais controle selvagens ou nocautes que receberam dieta DC ou HC, tratados com veículo, FRP (10 mg/kg) ou sinvastatina (10 mg/kg). (B) Animais que receberam dieta HC, tratados com FRP (0,1 - 30 mg/kg) ou veículo (controle). Cada barra representa a média \pm EPM de 8 a 10 animais de cada grupo experimental. *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle selvagem e ### $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo nocaute tratado com dieta comercial (ANOVA/Tukey).

Quando se avaliou os níveis de colesterol HDL, não foram observadas diferenças significativas entre nenhum grupo experimental (Fig 21A e B).

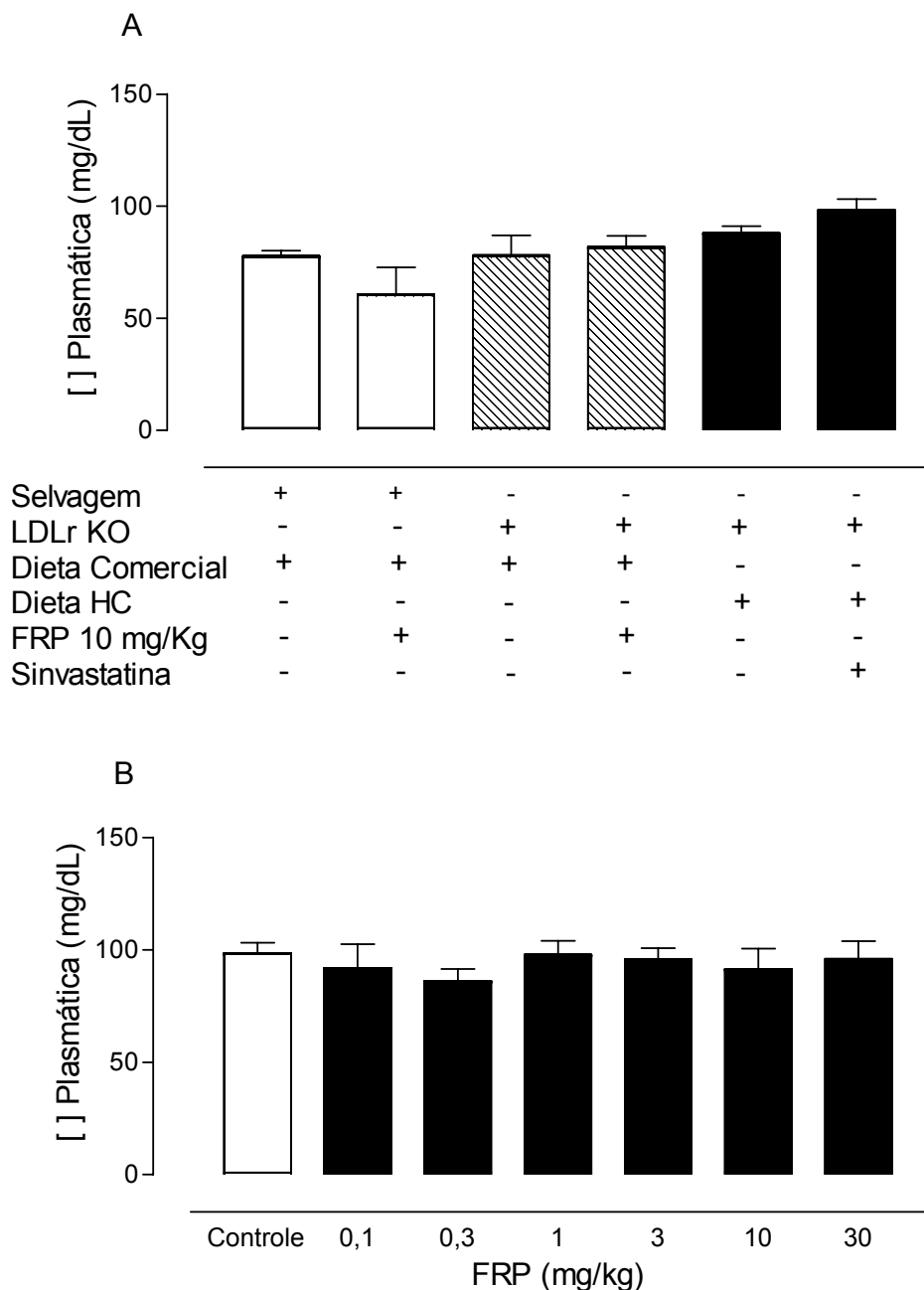


Figura 21: Determinação de colesterol HDL no soro de animais C57/Bl6 selvagens e LDLr KO. (A) Animais controle selvagens ou nocautes que receberam dieta DC ou HC, tratados com veículo, FRP (10 mg/kg) ou sinvastatina (10 mg/kg). (B) Animais que receberam dieta HC, tratados com FRP (0,1 - 30 mg/kg) ou veículo (controle). Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 animais de cada grupo experimental.

As frações VLDL+LDL foram calculadas e foi observado que não existe diferença estatística entre o colesterol total dos animais controle que receberam dieta HC e os animais tratados com FRP nas diferentes doses (Fig 22B), nem nos animais tratados com sinvastatina (Fig 22A). Também não ocorreram diferenças significativas entre os animais nocautes controle e tratado com FRP que receberam dieta comercial. Da mesma forma, não houve diferença entre os níveis de colesterol VLDL + LDL entre os animais selvagens tratados ou não com FRP. Entretanto, quando comparamos os grupos tratados com dieta comercial e dieta HC, observamos que os animais que receberam dieta HC apresentaram níveis de colesterol VLDL + LDL muito mais elevados em relação os animais que receberam dieta comercial (Fig 22A).

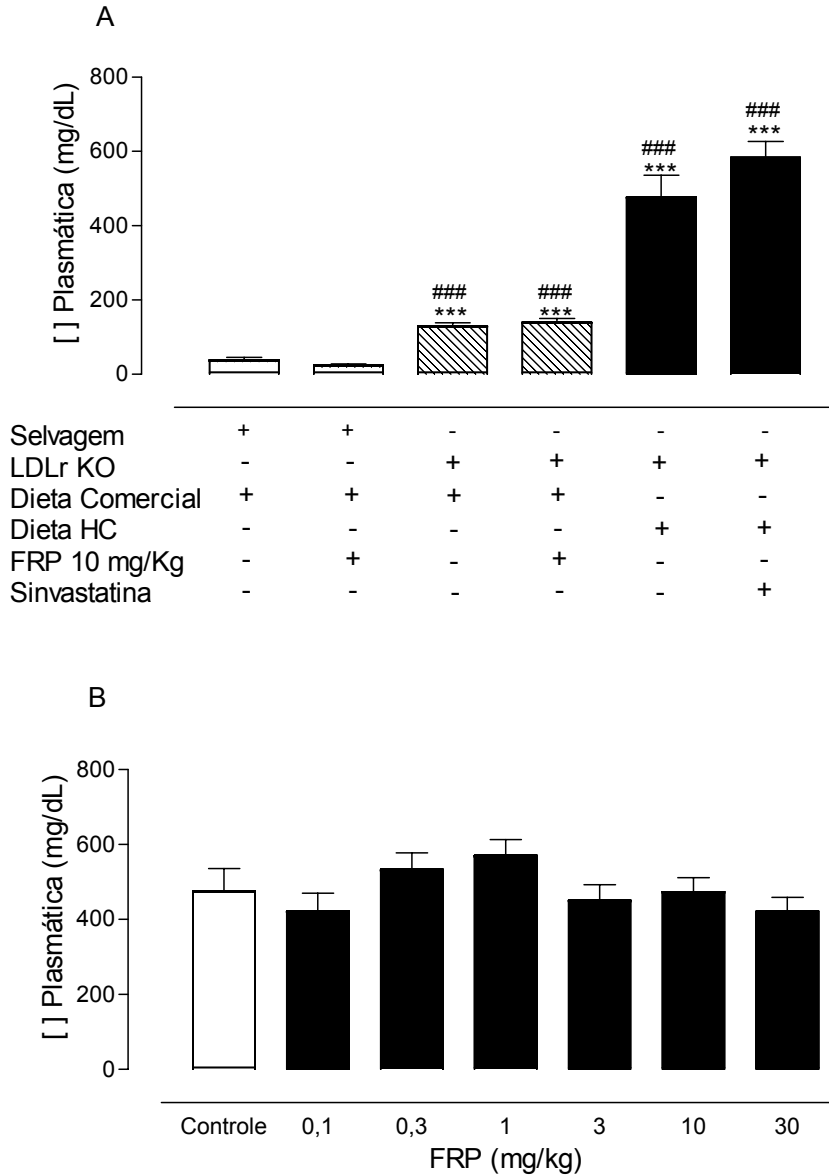


Figura 22: Determinação de colesterol VLDL + LDL no soro de animais C57/Bl6 selvagens e LDLr KO. (A) Animais controle selvagens ou nocautes que receberam dieta comercial ou HC, tratados com veículo, FRP (10 mg/kg) ou sinvastatina (10 mg/kg). (B) Animais que receberam dieta HC, tratados com FRP (0,1 - 30 mg/kg) ou veículo (controle). Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 8 a 10 animais de cada grupo experimental. *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle selvagem e ### $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo nocaute tratado com dieta comercial (ANOVA/Tukey).

4.2.2 Reatividade Vascular

A Figura 23 ilustra os resultados obtidos na reatividade vascular frente ao agente contrátil Phe em aorta torácica isolada dos camundongos LDLr KO e selvagens. Observa-se que as aortas dos animais selvagens e LDLr KO tratados com FRP que receberam dieta DC apresentaram menor responsividade à Phe, quando comparados com os seus respectivos controle (selvagens e LDLr KO que receberam apenas dieta DC). Além disso, os animais selvagens apresentaram maior responsividade à Phe aos animais LDLr KO, como observado na figura 23A e na tabela 05 . O tratamento com dieta HC *per se* nos animais LDLr KO reduziu a capacidade contrátil dos vasos, tanto de animais LDLr KO, quanto comparados com o grupo LDLr KO que recebeu dieta DC. O tratamento com sinvastatina também não foi capaz de melhorar a capacidade contrátil dos vasos (Fig 23A e Tabela 05). O tratamento dos animais com FRP em diferentes doses não foi capaz de restaurar a capacidade contrátil dos vasos dos animais LDLr KO que receberam dieta HC, como pode ser observado na figura 23B e na tabela 05.

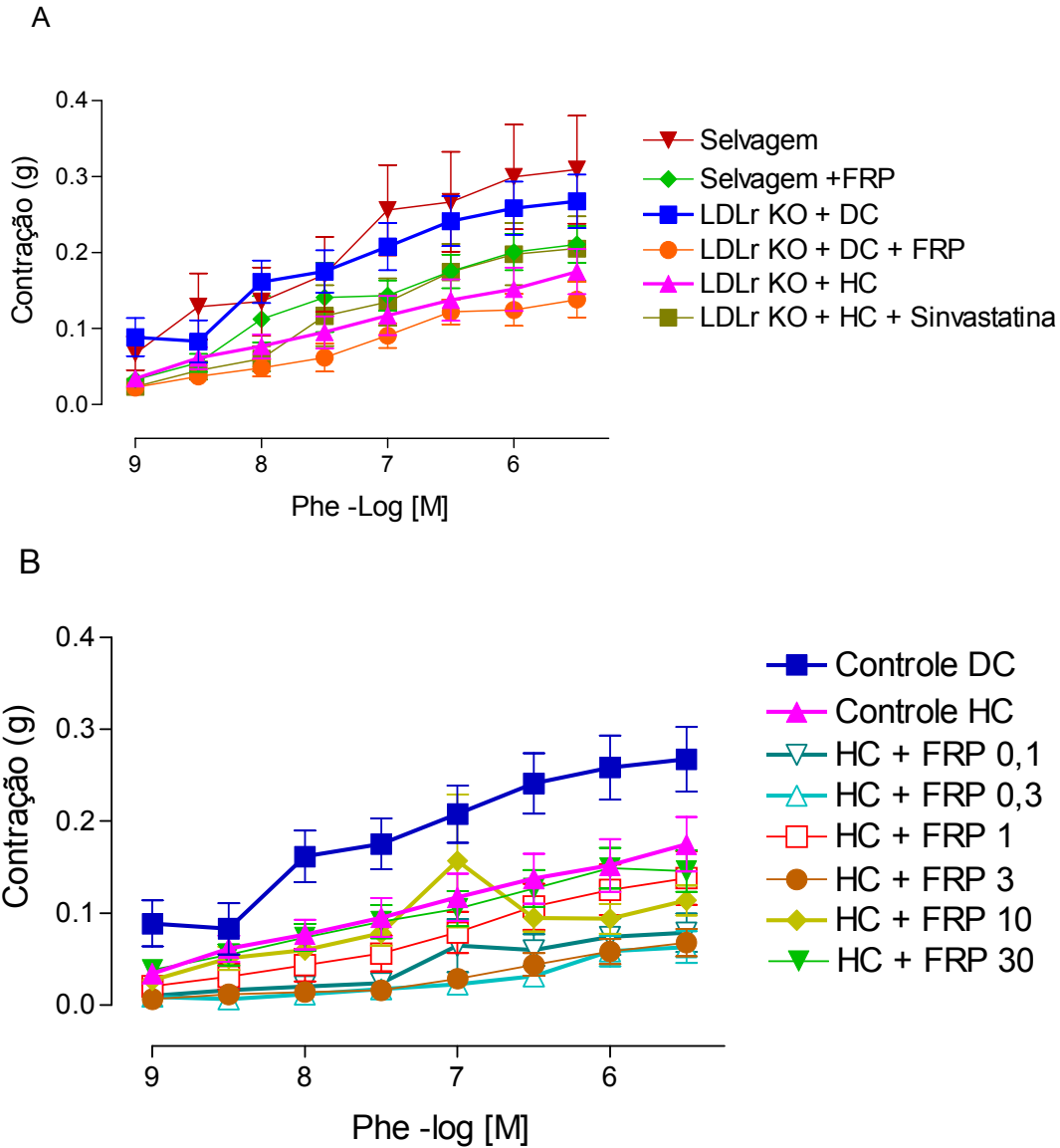


Figura 23: CCRc à Phe (1nM - 3 μ M) em anéis de aorta torácica de camundongos C57BI6 selvagens e LDLr KO. (A) animais controle selvagens ou LDLr KO que receberam dieta DC ou HC, tratados com veículo, FRP (10 mg/kg) ou sinvastatina (10 mg/kg). (B) Animais LDLr KO que receberam dieta DC ou HC, tratados com FRP (0,1 - 30 mg/kg) ou veículo (controle). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 experimentos por grupo.

Tabela 08: Valores de contração máxima (Cmax) expressos em gramas dos anéis de aorta torácica de camundongos C597Bl6 selvagens e LDLr KO, que receberam dieta DC ou HC, tratados com veículo, fração ou sinvastatina (10 mg/Kg).

Grupo experimental	Cmáx (g)
Selvagem	0,309 ± 0,070
Selvagem + FRP 10 mg/kg	0,211 ± 0,024#
LDLr KO + DC	0,260 ± 0,035
LDLr KO + DC + FRP10 mg/kg	0,138 ± 0,020**
LDLr KO + HC	0,175 ± 0,029**
LDLr KO + HC + Sinvastatina	0,205 ± 0,042*
LDLr KO + HC + FRP 0,1 mg/Kg	0,078 ± 0,020***
LDLr KO + HC + FRP 0,3 mg/Kg	0,063 ± 0,017***
LDLr KO + HC + FRP 1 mg/Kg	0,138 ± 0,029**
LDLr KO + HC + FRP 3 mg/Kg	0,068 ± 0,014***
LDLr KO + HC + FRP 10 mg/Kg	0,114 ± 0,016**
LDLr KO + HC + FRP 30 mg/Kg	0,149 ± 0,020**

Valores expressos como Média ± EPM; # $p < 0,5$ em relação ao grupo selvagem. * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$ e *** $p < 0,01$ em relação ao grupo LDLr KO + DC

Quando se observa as CCRc de reatividade dos vasos à ACh, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos experimentais, controles selvagens e LDLr KO, tratados com dieta DC e HC, tratados com veículo, FRP ou sinvastatina, como demonstrado na figura 24A e B.

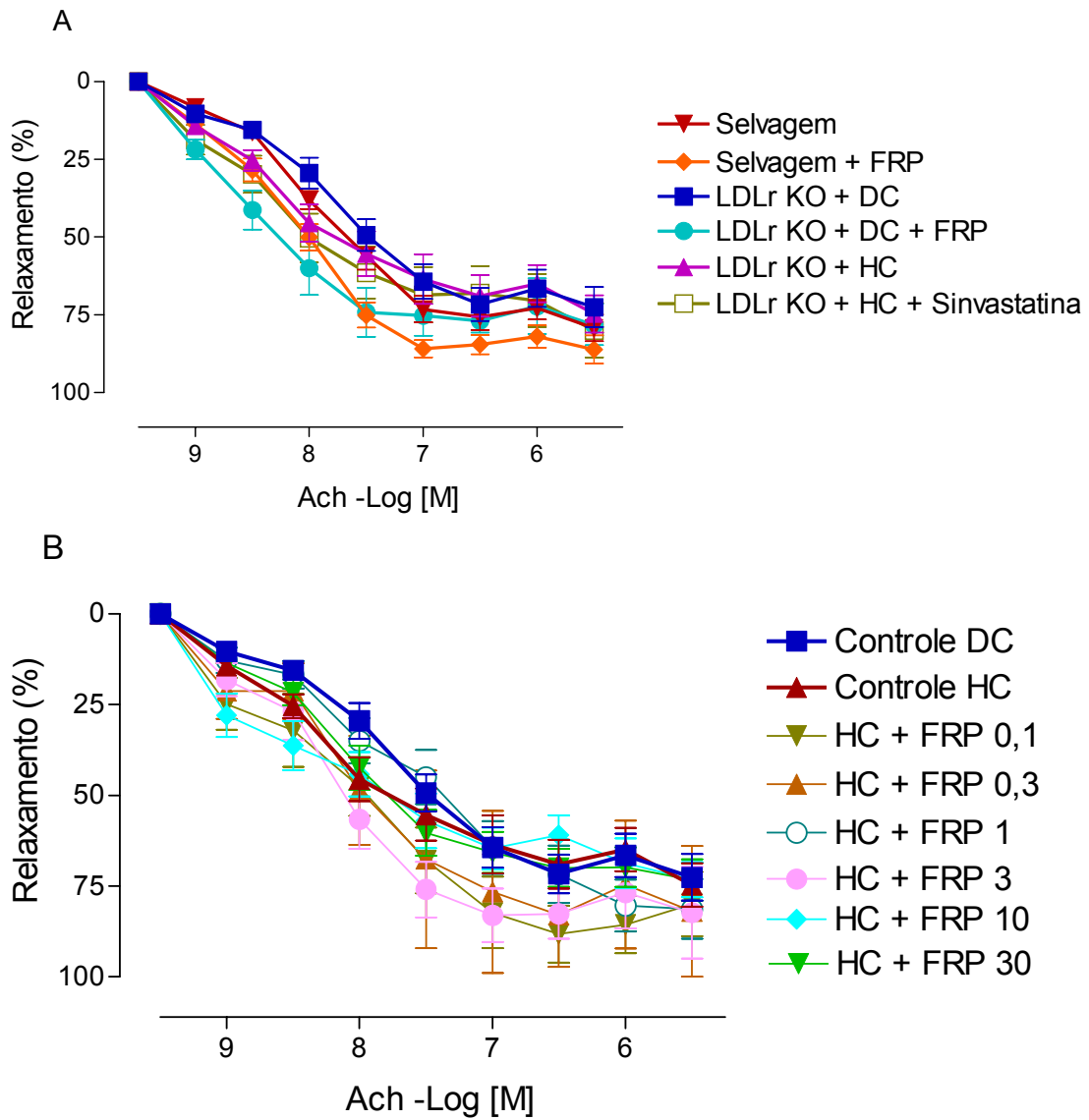


Figura 24: CCRc à ACh (1nM - 3 μ M) em anéis de aorta torácica de camundongos C57Bl6 selvagens e LDLr KO. (A) Animais controle selvagens ou LDLr KO que receberam dieta DC ou HC, tratados com veículo, FRP (10 mg/kg) ou sinvastatina (10 mg/kg). (B) Animais LDLr KO que receberam dieta DC ou HC, tratados com FRP (0,1 - 30 mg/kg) ou veículo (controle). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 experimentos por grupo.

4.2.3 Análise histológica: área de lesão aterosclerótica

Os resultados obtidos nas determinações de lipídios e na reatividade vascular sugerem que a FRP não foi capaz de inibir a formação de placas ateroscleróticas nos animais tratados com dieta HC. Para confirmar estas suposições, foram realizados cortes histológicos e corados com Oil Red "O" para visualização das placas ateroscleróticas. Os animais que receberam dieta DC apresentaram poucos depósitos de gordura na válvula aórtica (Fig 25A), quando comparado com os cortes histológicos dos animais que receberam dieta HC (Fig 25B). Nos animais tratados com FRP observou-se um grande depósito de gordura nas valvas das válvulas aórticas, semelhantes às aquelas observadas nos controles que receberam dieta HC (Fig 25C). Estes resultados confirmam que a FRP não foi capaz de impedir o desenvolvimento da aterosclerose experimental nos animais LDLr KO, em nossas condições experimentais.

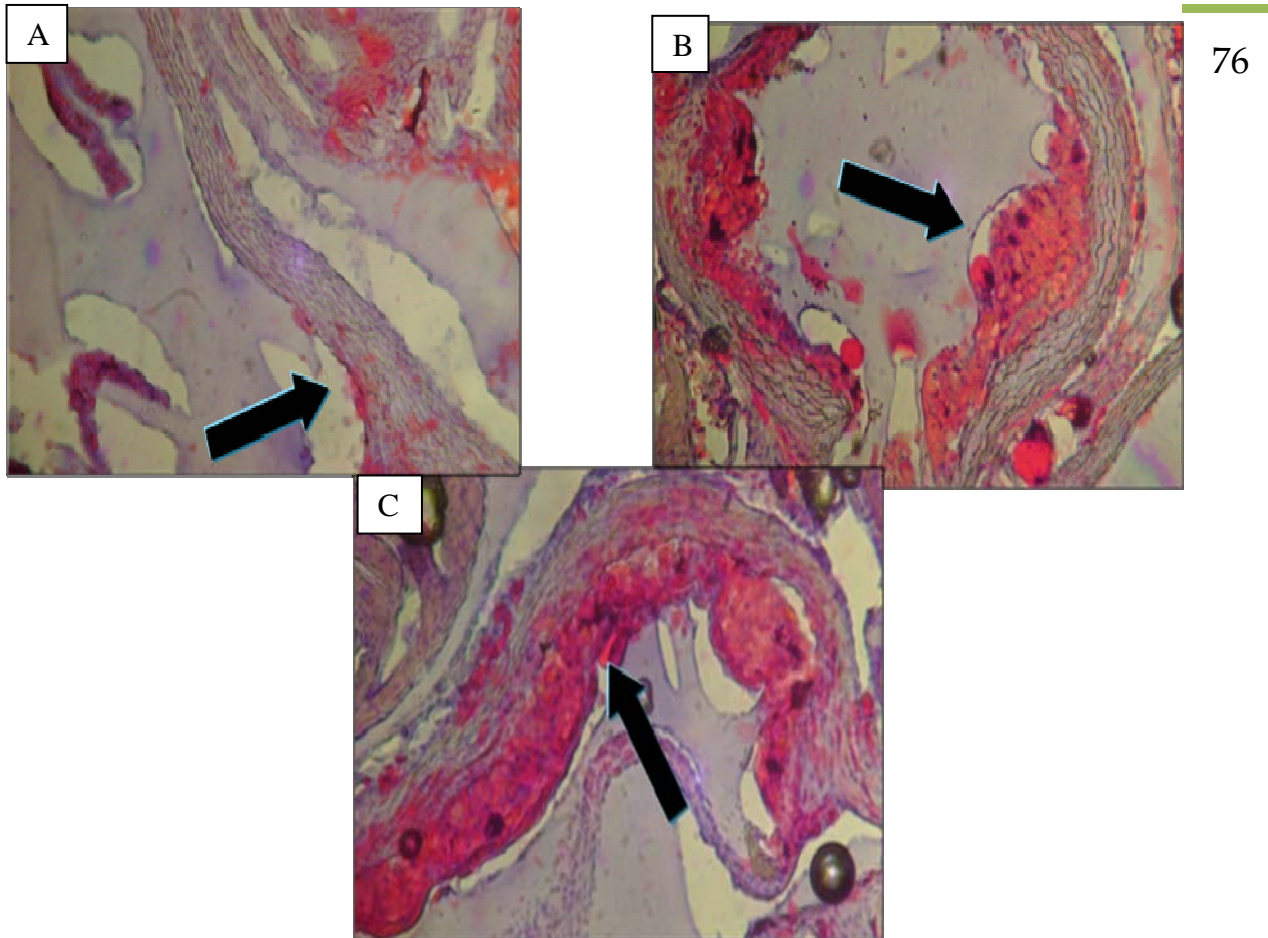


Figura 25: Figuras representativas da área de lesão em cortes histológicos da raiz da aorta de camundongos LDLr KO corados com Oil Red “O”. A marcação em vermelho representa as áreas de deposição de lipídios na luz do vaso (sinalizado com setas): (A) Corte representativo do grupo controle que recebeu dieta DC; (B) Corte representativo do grupo controle que recebeu dieta HC; (C) Corte representativo do grupo tratado com FRP 30 mg/mL.

Novas moléculas de origem natural oferecem uma grande oportunidade para avaliar não somente novas classes químicas de medicamentos, mas também mecanismos de ação novos e potencialmente relevantes (Rocha et al., 2001; Balunas e Kinghorn, 2005). Nos últimos anos são crescentes os estudos sobre compostos de origem natural com ação no SCV, principalmente os compostos polifenólicos ou polifenóis. Entre estes estudos destacam-se aqueles sobre as atividades das proantocianidinas. As proantocianidinas apresentam diversas atividades biológicas sobre o SCV. Como descrito, a *Croton celtidifolius* apresenta uma composição química variada em suas cascas, mas é especialmente caracterizada pela presença de proantocianidinas com atividades biológicas também já citadas.

Diferentes trabalhos na literatura descrevem o efeito vasorrelaxante de frações e compostos isolados obtidos a partir de plantas, bem como o estudo dos mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos. São vários os tipos de metabólitos secundários responsáveis por desencadear efeitos desta natureza. Entre os mais recorrentes na literatura encontram-se os poliflavonóides, onde está inserido o grupo das proantocianidinas. Neste trabalho, a FRP apresentou efeito vasorrelaxante dependente do endotélio em vasos de pequeno calibre (LAM e artéria mesentérica isolada de ratos) e vasos de grande calibre (aorta torácica isolada de ratos). A FRP apresenta diferentes proantocianidinas em sua composição, incluindo monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros e polímeros. Entretanto, nenhum destes compostos quando avaliados isoladamente apresentaram o mesmo efeito quando comparado com a FRP,

sugerindo que o efeito da FRP se deve a um sinergismo ou somação de efeitos dos diferentes compostos.

Estudos epidemiológicos sugerem a existência de uma correlação negativa entre o consumo de alimentos ou bebidas ricas em polifenóis e a incidência de doenças cardiovasculares e infarto (Stoclet et al., 2004; Norata et al., 2007). Além disso, pesquisas com plantas medicinais especialmente ricas em flavonóides e outros compostos fenólicos têm demonstrado um importante efeito vasodilatador por mecanismos dependentes de endotélio, especialmente relacionados com aumento da produção de NO (Fitzpatrick et al., 1995; Waslawik et al., 1997; Schuldt et al., 2000, Jiang et al., 2005; Schuldt et al., 2005). Este efeito dos flavonóides pode ser importante no que diz respeito ao desenvolvimento de novos medicamentos, pois a perda ou atenuação da biodisponibilidade do NO produzido pelo endotélio é um dos marcadores bioquímicos primários da disfunção endotelial encontradas em muitas doenças cardiovasculares, como hipertensão e aterosclerose (Boo e Jo, 2003).

A regulação da vasodilatação mediada pelo endotélio é realizada por três componentes majoritários: a PGI₂, o NO e o EDHF (Chauhan et al., 2003). A via NO-GMPc apresenta um importante papel na regulação do tônus vascular, no controle do fluxo sanguíneo e na pressão arterial (Gardiner et al., 1990). Nas células endoteliais, a NOS está ligada à membrana celular, associada à cavéola, sendo regulada negativamente pela caveolina (Gewalting e Kodja, 2002). A estimulação das células endoteliais por agonistas provoca dissociação do complexo NOS/caveolina e permite a ativação da NOS pelo complexo Ca⁺²/CaM (Fleming e Busse, 1999; Mombouli e Vanhoutte, 1999),

que irá converter L-arginina em L-citrulina e NO. O NO *per se*, medeia respostas fisiológicas no endotélio e em outros alvos celulares, por mecanismos que incluem a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (Fleming e Busse, 1999). O NO produzido, por sua vez, liga-se ao grupo hemeprótico da GCs no músculo liso, que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de -3,5- guanosina (GMPc). No músculo liso vascular, a elevação do GMPc atua diretamente na proteína quinase G, inibindo a ativação da PLC, estimulando a bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e reduzindo a sensibilidade do cálcio às proteínas contráteis (Mambouli e Vanhoutte, 1999), levando à dilatação dos vasos sanguíneos. No LAM (rede vascular de pequeno calibre) e na artéria mesentérica isolada de ratos, fica claramente demonstrado que o efeito vasodilatador da FRP depende parcialmente da ativação da via NO-GMPc, uma vez que nossos resultados demonstram que a perfusão do LAM com L-NOARG, um inibidor da enzima NOS, bem como a pré-incubação de artérias mesentéricas com ODQ, reduziram significativamente o efeito vasorrelaxante da FRP. Desta forma, a FRP poderia estimular a NOS endotelial a produzir NO e promover relaxamento das células musculares lisas vasculares por um aumento do GMPc nestas células.

O NO pode ser liberado das células endoteliais pela ativação de diferentes receptores (Vanhoutte, 1999; Moncada e Higgs, 2006). O efeito vasorrelaxante da FRP não é dependente da ativação de receptores muscarínicos, histaminérgicos, α_2 -adrenérgicos e da bradicinina, uma vez que a atropina, a pirilamina, a ioimbina e o HOE140, que bloqueiam os respectivos

receptores ativados por estes mediadores, não reduzem o efeito vasodilatador da FRP.

A ativação da GCs é provavelmente o mecanismo primário pelo qual o NO produz relaxamento da musculatura lisa vascular. Entretanto, outras proteínas também podem estar envolvidas. O NO produz uma hiperpolarização do músculo liso vascular em alguns tipos de vasos sanguíneos, especialmente os de pequeno calibre. Neste caso, o relaxamento em resposta ao NO é resistente a inibidores da GC. Este componente vasorrelaxante adicional foi denominado EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio) (Mambouli e Vanhoutte, 1997; Cortês et al., 2001). Vários estudos têm apontado o íon K^+ , como o verdadeiro responsável pelos efeitos mediados via EDHF (Edwards *et al*, 1998; Hecker, 2000; Dora e Garland, 2001). Outros autores têm ainda apontado alguns candidatos como possíveis EDHF, dentre eles, certos metabólitos do ácido araquidônico (ácidos epoxi-eicosatrienóicos e seus análogos - EETs); o peróxido de hidrogênio e as junções comunicantes ou "gap junctions" (Matoba *et al*, 2000; Goto *et al*, 2000; Matoba *et al*, 2002). Dada a atual controvérsia com relação à identidade do agente promovedor do relaxamento em vasos de pequeno calibre, muitos autores têm simplesmente descrito este mecanismo como um efeito "EDHF-like" (Coleman *et al*, 2001; Savage *et al*, 2003).

A contribuição do NO e do EDHF na vasodilatação dependente do endotélio varia de acordo com o vaso sanguíneo estudado (Garland et al., 1995). Em particular, o EDHF apresenta uma pequena importância na dilatação de vasos de condutância, enquanto que apresenta uma maior contribuição na

vasodilatação dependente do endotélio em artérias de resistência (Chauhan et al., 2003). Em LAM isolado de ratos, os receptores muscarínicos induzem vasodilatação por dois componentes primários, um sensível ao L-NAME e outro sensível aos bloqueadores dos canais de potássio, presumivelmente mediados via NO e EDHF, respectivamente (Adegbo e Triggle, 1993; Pimentel et al., 2007). Em nossos experimentos, quando testados isoladamente, o L-NOARG e o Krebs despolarizante foram capazes de reduzir a magnitude do relaxamento causado pela FRP. Entretanto, a combinação de L-NOARG e das altas concentrações de K^+ aboliu o efeito vasorrelaxante da FRP. Esses dados sugerem que a FRP promove o seu efeito pela ativação da via NO/GMPc e por promover hiperpolarização do músculo liso vascular induzido por abertura de canais de potássio.

Substâncias vasodilatadoras e o próprio estresse de cisalhamento (*shear stress*) podem induzir vários graus de hiperpolarização da membrana plasmática das células endoteliais, refletindo a ativação de diferentes canais de potássio endoteliais (Mombouli e Vanhoutte, 2007). Baseado no efeito de bloqueadores seletivos, os canais de potássio envolvidos na hiperpolarização derivada do endotélio parecem ser aqueles sensíveis à ChTx (canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de condutância alta e intermediária), à apamina (canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de condutância baixa), à glibenclamida (canais de K^+ dependentes de ATP), ao bário (canais de K^+ dependentes retificadores de influxo), à 4-AP (canais de K^+ dependentes de voltagem) (Mombouli e Vanhoutte, 2007), ou à ouabaína (inibidor da bomba Na^+/K^+ -ATPase) (Edwards et al., 1998). Tem sido postulado que o aumento do efluxo de K^+

decorrente da ativação de canais $K_{Ca^{2+}}$ por produtos naturais, pode aumentar as concentrações de potássio no espaço mioendotelial, seguido de hiperpolarização das células musculares lisas (Bhat et al., 2001; Schuldt et al., 2005). Esta hiperpolarização pode induzir o relaxamento por reduzir a probabilidade de abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, e por consequência, diminuir o influxo de Ca^{2+} e reduzir as concentrações de Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i$ no músculo liso. Alternativamente, a hiperpolarização pode reduzir a taxa de renovação de IP_3 intracelular estimulado pela ação de agonistas sobre os receptores de membrana (Feletou e Vanhoutte, 1999; Busse et al., 2002). Os resultados obtidos demonstraram a participação dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} na ação da FRP, uma vez que a administração concomitante de caribdotoxina (ChTx) e apamina foi capaz de reduzir o efeito vasorrelaxante evocado por esta fração.

A atividade da eNOS está sujeita a um cuidadoso controle de ativação e inativação desenvolvido por múltiplos mecanismos interconectados de regulação, como por exemplo: expressão e transcrição da eNOS; localização subcelular; interações proteína-proteína; regulação da atividade enzimática da eNOS por modificação da atividade de proteínas envolvidas no controle da ativação da enzima (Ca^{2+} / CaM e palmitoilação reversível); fosforilação e S-nitrosilação (Fleming e Busse, 1999; Dudzinski et al., 2006).

O aumento do $[Ca^{2+}]_i$ no endotélio ou na célula do músculo liso vascular exerce influências opostas no diâmetro dos vasos sanguíneos: no músculo liso vascular os vasoconstritores agem através do aumento do $[Ca^{2+}]_i$, enquanto os vasodilatadores têm o efeito oposto. Em contraste, uma elevação no $[Ca^{2+}]_i$

endotelial induz o relaxamento do músculo liso vascular adjacente (Tran et al., 2000, Ledoux et al., 2006). Tem sido extensivamente descrito que a maior via de ativação para produção endotelial de NO envolve a mobilização de Ca^{2+} , a qual resulta em uma elevação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ livre e ativação da eNOS (Buckley et al., 1995), e que o aumento da produção do NO pelas células endoteliais coincide com a elevação das concentrações de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Busse e Mulsch, 1990; Buckley et al., 1995; Demura et al., 1998; Ray e Marshall, 2006). O aumento no $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ser decorrente da mobilização do Ca^{2+} presente em estoques intracelulares, bem como pela entrada de Ca^{2+} por canais catiônicos (Busse et al., 1988, Martin et al., 2002).

Assim como foi demonstrado em experimentos com LAM e artéria mesentérica isolada de ratos, observou-se que o efeito vasodilatador da FRP em vasos de grande calibre também depende da ativação da via NO/GMPc, uma vez que o L-NOARG e o ODQ reduzem significativamente o efeito desta fração quando avaliada em experimentos de aorta torácica isolada de ratos. Desta forma, a FRP estimula a produção de NO endotelial e induz relaxamento do músculo liso vascular por aumentar a concentração de GMPc intracelular nestas células. A liberação de NO pelas células endoteliais estimulada por agonistas, como a ACh e a BK, é mediada predominantemente via mecanismos dependentes do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Busse e Mulsch, 1990; Tran et al., 2000, Fleming e Busse, 2003) e requer um influxo de Ca^{2+} sustentado para estimular a eNOS (Luckhoff e Busse, 1990) a produzir NO e subseqüentemente promover vasorrelaxamento dependente do endotélio. Por exemplo, quando agonistas como a Bk ou a ACh são utilizados para estimular

a produção de NO endotelial, a adição de agente quelante de Ca^{2+} na solução demonstram que o efeito vasorrelaxante da FRP foi prevenido após remoção do Ca^{2+} do líquido nutritivo e também em presença de um bloqueador do influxo de Ca^{2+} (lantânio), sugerindo que o influxo de Ca^{2+} nas células endoteliais é um passo decisivo envolvido neste efeito. Entretanto, não pode ser excluído o possível nutritiva ou a adição de um antagonista de CaM são capazes de abolir a produção de NO e também o relaxamento dependente do endotélio (Fleming e Busse, 2003). Nossos resultados papel do Ca^{2+} liberado de estoques intracelulares no relaxamento induzido pela FRP.

Em células endoteliais, a mobilização de cálcio de fontes intra e extracelulares pode ocorrer em decorrência da ativação de várias vias, como a estimulação da PLC, PLA_2 , tirosina quinase, ou atividade da PKC, secundários às vias dependentes ou independentes da ativação de receptores de membrana (Ayajiki et al., 1996; Andriambelason et al., 1999). O Ca^{2+} pode ser liberado de estoques intracelulares pelo IP_3 o qual é formado pela ação da PLC (Ray e Marshall, 2006). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a neomicina, um inibidor da PLC, reduz significativamente o relaxamento produzido pela FRP, sugerindo a ativação da PLC, com subsequente aumento da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e, por conseqüência, a ativação da eNOS. Outras vias que envolvem a entrada de Ca^{2+} na célula endotelial incluem a via da PLA_2 , PKC e tirosina quinase (Andriambelason et al., 1999). Neste estudo, nenhum dos inibidores específicos destas diferentes vias alterou de maneira significativa o efeito vasorrelaxante da FRP, sugerindo que a indução da produção de NO pelas células endoteliais não está relacionada à ativação das

vias da PLA₂ e de fosforilação de proteínas intracelulares pelas enzimas PK C e tirosina quinase.

Vários trabalhos sugerem que a ativação de receptores acoplados à proteínas G apresentam um papel importante em mecanismos que induzem o influxo de Ca²⁺ em células endoteliais com subsequente produção de agentes vasoativos (Graier et al., 1992), como o NO (Ohno et al., 1993; Malek et al., 1999; Martin et al., 2002). Foi descrito que o NEM é capaz de inativar as proteínas G, com algum grau de seletividade em concentrações inferiores a 10 µM, por alquilar sulfidrilas de proteínas (Li e Van Breemen, 1995; Andriambelason et al., 1999). Em nosso estudo, o tratamento das artérias com NEM aboliu a resposta da FRP. A participação da proteína G continuou sendo estudada utilizando toxina pertussis e toxina colérica. Os resultados demonstram que ambas as toxinas utilizadas não foram capazes de alterar o efeito da FRP, sugerindo que as proteínas G sensíveis a essas toxinas não estão envolvidas no efeito vasorrelaxante da FRP. Esses resultados apontam para um possível efeito da FRP sobre canais de Ca²⁺, uma vez que o NEM pode alquilar diferentes proteínas da membrana plasmática, incluindo canais de Ca²⁺. Os possíveis canais envolvidos no influxo de cálcio nas células endoteliais são aqueles que abrem em resposta à depleção dos estoques de cálcio, os quais podem ser estimulados por agonistas como a ACh (Li e Van Breemen, 1995; Andriambelason et al., 1999).

Conforme descrito anteriormente, existem diferentes mecanismos regulatórios da atividade da enzima eNOS, e a fosforilação tem sido reconhecida como um mecanismo regulatório crítico para o controle da

atividade da enzima. Existem pelo menos cinco sítios específicos de fosforilação da eNOS reconhecidos: a Ser1177, Ser633, Ser615, Thr495 e Ser164 (baseados na seqüência de aminoácidos humana), que podem ser fosforilados ou desfosforilados por diferentes proteínas quinases ou fosfatases, como a tirosina quinase, PKC, proteína quinase B/Akt, proteína quinase G e proteína quinase A (PKA), proteína quinase ativada por AMP, proteína quinase dependente de calmodulina e proteínas fosfatases (Boo e Jo, 2003; Mount et al., 2007). O sítio de fosforilação da eNOS mais extensivamente estudado é a Ser1177, que apresenta um importante papel na estimulação da atividade da eNOS em resposta a vários estímulos fisiológicos, como o *shear stress*, VEGF, estrógeno, peróxido de hidrogênio, fator de crescimento tipo insulina-I, entre outros (Boo e Jo, 2003). A Ser1177 pode ser fosforilada por múltiplas proteínas quinases, dependendo do estímulo imposto (Boo e Jo, 2003; Lenasi et al., 2003). Por exemplo, o *shear stress*, atuando sobre células endoteliais, promove a ativação da PI3K com subsequente ativação da serina quinase Akt e PKA, as quais irão fosforilar a eNOS na Ser1177 e aumentar a atividade da enzima (Fleming e Busse, 2003; Leung et al., 2006). A ativação da PI3K fosforila o fosfatilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), resultando em fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) que subsequentemente liga-se a Akt/PKB. A ativação da via PI3K/Akt é um passo chave para diversos efeitos biológicos, incluindo proliferação, crescimento e sobrevivência celular (Dimmeler et al., 1999; Leung et al., 2006). Da mesma forma, vários trabalhos descrevem que diferentes compostos são capazes de ativar a enzima PI3K, desencadeando o aumento da produção de NO, bem como outros eventos celulares (Zeng et al., 2000;

Lenasi et al., 2003; Ndiaye et al., 2004; Sun et al., 2006; Leung et al., 2006). A utilização de um inibidor da enzima PI3K, Wortmannin, em aorta torácica isolada de ratos inibiu o efeito vasorrelaxante da FRP, sugerindo que a fração também apresenta efeito vasorrelaxante por induzir a fosforilação da enzima eNOS.

Como o *shear stress* é a influência regulatória mais importante para induzir vasodilatação mediada por NO e PGI₂, especialmente devido a ativação da via PI3K/Akt, pode-se especular que as proantocianidinas estariam agindo como o próprio *shear stress*. O *shear stress* provoca uma reorganização do citoesqueleto endotelial, liberando mediadores e promovendo alteração na expressão de genes, suprimindo genes relacionados à disfunção endotelial e aumentando a expressão de genes protetores (Garcia-Cardena et al., 2001; Brooks et al., 2002). Corroborando estas especulações, um elegante trabalho demonstrou que proantocianidinas eram capazes de ativar a via do NO por promover uma resposta do tipo pseudo *shear stress* em células endoteliais (Corder et al. 2004), sinalizando que seria possível supor que as proantocianidinas da FRP poderiam promover a liberação do NO por promover uma resposta semelhante ao *shear stress* nas células endoteliais dos anéis de aorta.

Como descrito anteriormente, alguns estudos têm demonstrado que a severidade da disfunção endotelial está relacionada com o risco para desenvolvimento ou recorrência de uma doença cardiovascular. Além disso, a disfunção endotelial se refere a um conjunto de alterações no fenótipo da célula endotelial que pode contribuir para o desenvolvimento e expressão clínica da

aterosclerose (Levine et al., 1995). Enquanto os mecanismos precisos ainda permanecem obscuros, a disfunção endotelial parece contribuir fortemente para o desenvolvimento da doença, na qual fatores inflamatórios promovem a adesão de monócitos e linfócitos T, formação das células espumosas, digestão da matriz extracelular, além de migração e proliferação de células do músculo liso vascular, levando a formação e progressão da placa aterosclerótica (Widlansky et al., 2003). Enquanto isso, NO ou compostos relacionados, apresentam potente atividade antiaterogênica. O NO liberado das células endoteliais trabalha em conjunto com a PGI₂ para promover a inibição da agregação plaquetária, inibir a adesão de neutrófilos nas células endoteliais e expressão de moléculas de adesão. Em altas concentrações, o NO também é capaz de inibir a proliferação das células do músculo liso vascular (Schulz et al., 2008).

Enquanto a aterosclerose está associada com uma série de alterações no fenótipo da célula endotelial, a contribuição da vasodilatação dependente do endotélio tem surgido como um indicador acessível de “integridade da função” das células endoteliais. A proposta é corroborada por trabalhos que descrevem que a diminuição da biodisponibilidade do NO, que é gerado pela isoforma endotelial da NOS, seja o passo inicial na patogênese da doença vascular provocada pela hipercolesterolemia e aterosclerose (Shaul, 2003). Então, estímulos que aumentam a produção de NO derivado do endotélio poderiam reduzir a formação das placas de ateroma na aterosclerose. Como observado nos ensaios de reatividade vascular, a FRP obtida da *C. celtidifolius* é capaz de induzir a produção de NO pelas células endoteliais por mecanismos que

envolvem influxo de Ca^{2+} nas células endoteliais, bem como fosforilação da enzima eNOS.

Nos últimos anos tem sido crescente o número de estudos sobre compostos de origem natural com potencial antiaterogênico, principalmente os polifenólicos. Os compostos polifenólicos obtidos do vinho tinto e do chá-verde são hábeis em prevenir a progressão da aterosclerose em modelos animais, sugerindo que estes compostos têm propriedades protetoras, pelo menos em parte, por retardar a progressão das lesões ateroscleróticas iniciais que em estágios avançados são passíveis de sofrer ruptura e ocasionar um quadro de trombose (Norata et al., 2007). Entre estes compostos destacam-se os estudos sobre as atividades das proantocianidinas.

A aterosclerose é uma patologia difícil de ser estudada em humanos, e isso se deve ao fato dela apresentar uma evolução lenta, envolver múltiplos fatores de difícil controle em estudos clínicos e, portanto, gerar resultados de interpretação complexa. Por isso, criou-se a necessidade para o desenvolvimento de modelos animais (Fekete, 1993). O camundongo tornou-se a espécie cada vez mais usada para as investigações biomédicas (Malakoff, 2000), sendo evidente sua aplicação em muitas áreas de pesquisa incluindo a fisiopatologia vascular. A utilização desse animal na pesquisa em aterosclerose tem diversas vantagens sobre outras espécies. Uma delas é a extensiva informação genética disponível em numerosas linhagens co-sangüíneas (Paigen et al., 1990).

Não há conhecimento de que linhagens de camundongos desenvolvam aterosclerose de maneira espontânea. Além disso, muitas linhagens destes

animais respondem fracamente à dieta de colesterol e desenvolvem apenas estrias gordurosas no arco aórtico (Paigen et al., 1990). Os camundongos C57BL/6 são os mais susceptíveis ao desenvolvimento de aterosclerose induzida pela dieta, e para aumentar a sensibilidade destes animais, foram desenvolvidos camundongos LDLr KO. Estes animais apresentam níveis plasmáticos alterados de lipoproteínas e são susceptíveis ao desenvolvimento da aterosclerose quando alimentados com uma dieta enriquecida com ácidos graxos e colesterol (Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al., 1994, Kowala et al., 2000), favorecendo a ocorrência de hiperlipidemia plasmática, decorrente do aumento de VLDL e LDL (Gerrity, 1981; Virmani et al., 2000; Zadellar et al., 2007). Na aterosclerose, o uso dessa espécie e modelo permite avaliar diversos aspectos associados à aterosclerose, desde análises morfológicas caracterizadas por simples acúmulos de células específicas até a formação de lesões mais complexas que constituem processos de calcificação (Kristensen, 1997). Após um período de dieta HC, as lesões formadas nos animais C57BL/6 LDLr KO encontram-se restritas ao arco aórtico. Estas lesões são caracterizadas pelo depósito de colesterol, alguns sob a forma de cristais, e macrófagos. Após um período prolongado com esta dieta, há a ocorrência de lesões mais avançadas com acúmulos celulares e de colágeno (Stewart-Phillips e Lough, 1991). De maneira geral, estas lesões são pequenas e consistem predominantemente do acúmulo de macrófagos carregados de lipídeos chamados de células espumosas (*foam cells*) (Stewart-Phillips e Lough, 1991; Roselaar et al., 1996).

Medicamentos com atividade hipolipemiante apresentam bons resultados no tratamento de pacientes com doença arterial coronariana (Rader e Daugherty, 2008). Os mecanismos responsáveis por essa ação são bem estabelecidos, e no contexto geral da doença, reduções significativas do colesterol sérico em indivíduos com aterosclerose têm demonstrado ser uma estratégia importante para o tratamento dos pacientes com risco de doença arterial coronariana, sempre aliado à reeducação alimentar e prática de atividades físicas. O modelo utilizado para avaliação da atividade antiaterogênica da FRP é bastante descrito na literatura (Cyrus et al., 2002; 2003; 2006). Após um tratamento crônico dos animais C57BL/6 selvagens e C57BL/6 LDLr KO com a FRP durante noventa dias, o sangue foi coletado e os parâmetros lipídicos foram avaliados. Nos animais C57BL/6 LDLr KO, observa-se que o colesterol total e LDL apresentam níveis mais altos do que os animais selvagens, mesmo quando tratados com DC, confirmando dados da literatura (Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al., 1994, Kowala et al., 2000). Quando os animais recebem dieta hipercolesterolêmica, os níveis de lipídios se elevam muito, quando comparados com o grupo que recebe dieta comercial. Os animais tratados com FRP, em todas as doses utilizadas, não apresentaram diferenças nos parâmetros lipídicos, colesterol total, HDL e VLDL + LDL, excluindo a possibilidade de a fração apresentar atividade hipolipemiante no modelo estudado. Da mesma forma que a FRP, a sinvastatina também não foi capaz de alterar as concentrações séricas de lipídios dos animais LDLr KO tratados com dieta HC. Esse efeito já era esperado, uma vez que o mecanismo de ação primário das estatinas é a inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril

coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). Com a inibição desta enzima, a síntese endógena de colesterol cessa e a célula expõe os receptores de LDL, o que induz a captação de colesterol circulante e redução dos níveis séricos de colesterol total e LDL (Endo, 1992). Os animais LDLr KO não apresentam tais receptores, portanto é admissível que a estatina falhe em promover redução dos lipídios séricos destes animais. Entretanto, essa classe de medicamentos apresenta uma série de efeitos pleiotrópicos, como atividade antiinflamatória e antitrombótica, que justificam a sua escolha como controle positivo.

Apesar de falhar como agente hipolipemiante, a atividade antiaterogênica da FRP não poderia ser descartada. A aterosclerose é considerada uma desordem inflamatória crônica que pode ter componentes infecciosos ou auto-ímmunes (Ross, 1999; Libby, 2000). No ambiente vascular a LDL é submetida a modificações, originando inicialmente, a LDL-minimamente oxidada, a qual apresenta inúmeras propriedades inflamatórias (Ross, 1999; Lusis, 2000). Em uma segunda etapa, a LDL é extensivamente oxidada originando partículas altamente oxidadas (LDL-ox) (Steinberg, 1997; Williams e Fisher, 2005; Galle et al., 2006). A LDL-ox estimula a produção de uma série de fatores inflamatórios, como proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP-1), fator estimulador de colônia para monócitos (M-CSF) e moléculas de adesão (VCAM-1), que irão intensificar ainda mais o processo inflamatório (Libby, 2002; Tedgui e Mallat, 2006). Essas informações sinalizam que não apenas uma redução nos níveis de lipídios circulantes pode ser importante na inibição do desenvolvimento da aterogênese, mas também compostos com atividade antiinflamatória poderiam ser interessantes para o tratamento ou prevenção da

doença (Norata et al., 2007). Nesse contexto, a *C. celtidifolius* parece ser uma alternativa a ser avaliada quanto ao seu potencial antiaterogênico, uma vez que ela apresenta proantocianidinas em sua composição e como descrito anteriormente, as proantocianidinas apresentam diversas atividades antiinflamatórias e protetoras do sistema cardiovascular. Neste sentido, a *C. celtidifolius* apresenta atividade antioxidante e antiinflamatória (Nardi et al., 2003; 2007), além de promover vasodilatação dependente do endotélio, conforme resultados presentes neste estudo. Nos animais C57BL/6 LDLr KO que receberam dieta comercial, observa-se um pequeno depósito de gordura na raiz da aorta, enquanto que nos animais C57BL/6 LDLr KO que receberam dieta HC ocorreu um grande depósito de gordura, quando avaliados histologicamente em lâminas coradas com Oil Red "O". Quando os animais foram tratados com FRP não houve redução significativa do ateroma, como foi demonstrado nos cortes histológicos da aorta de camundongos tratados com a maior dose testada de FRP. Corroborando este resultado, foi observada uma redução na contratilidade das aortas obtidas dos camundongos tratados com dieta hipercolesterolêmica controles e tratados com FRP, sugerindo que ocorreu um dano significativo na estrutura e/ou responsividade dos vasos a agentes constritores. Quanto ao potencial vasorrelaxante, ainda restam dúvidas quanto ao comprometimento de estruturas e mediadores responsáveis por esta atividade, uma vez que, como os vasos não apresentam atividade contrátil normal, não é possível avaliar com segurança a reatividade vascular ao agente vasorrelaxante ACh.

Não obstante, é importante ressaltar que os resultados destes experimentos não permitem excluir uma possível atividade antiaterogênica da FRP. Alguns trabalhos indicam o uso de um tempo de tratamento menor dos animais, quanto à exposição à dieta HC, pois as lesões ateroscleróticas apresentadas pelos animais tratados por 12 semanas são muito extensas, quando comparado com trabalhos que utilizam tratamentos de 2 semanas (Krieger et al., 2006), sugerindo que o modelo utilizado pode não ser o mais adequado ou sensível para as avaliações propostas por este trabalho. Outro ponto importante a ser investigado é com relação à via de administração utilizada no tratamento dos camundongos. Utilizamos a via oral por ter similaridade com o uso popular da planta e por ser também a via de administração de medicamentos mais utilizada pela população. Entretanto, não apresentamos dados capazes de confirmar a correta absorção da fração e, por conseguinte, não podemos afirmar que a fração não apresenta atividade antiaterogênica.

O presente estudo demonstra que a FRP, obtida das cascas da *Croton celtidifolius*, apresenta efeito vasorrelaxante dependente de endotélio em artérias de pequeno e grande calibre, que é mediado em parte pela ativação da via (NO/GMPc). Em vasos de grande calibre, fica demonstrado que o mecanismo de ativação da via (NO/GMPc) envolve o influxo de Ca^{2+} do meio extracelular pela ativação de proteínas sensíveis ao NEM e de estoques intracelulares, via ativação da PLC. A fração também parece promover a fosforilação da enzima eNOS. Além disso, fica demonstrado que em vasos de pequeno calibre, a FRP também promove vasodilatação por promover

hiperpolarização do músculo liso vascular induzido por abertura de canais K_{Ca}^{2+} (Fig 26). Esse conjunto de dados sugere que a FRP da *Croton celtidifolius* tem propriedades moduladoras da função endotelial, melhorando-a. Essa capacidade poderia ser útil para o tratamento de doenças que se caracterizem por apresentar disfunção endotelial, como a hipertensão arterial. Novos experimentos são necessários para confirmar tal hipótese, mas os dados obtidos nesse trabalho podem servir de base para experimentos futuros que visam incluir as proantocianidinas obtidas da *Croton celtidifolius* no hall das substâncias benéficas sobre o sistema cardiovascular.

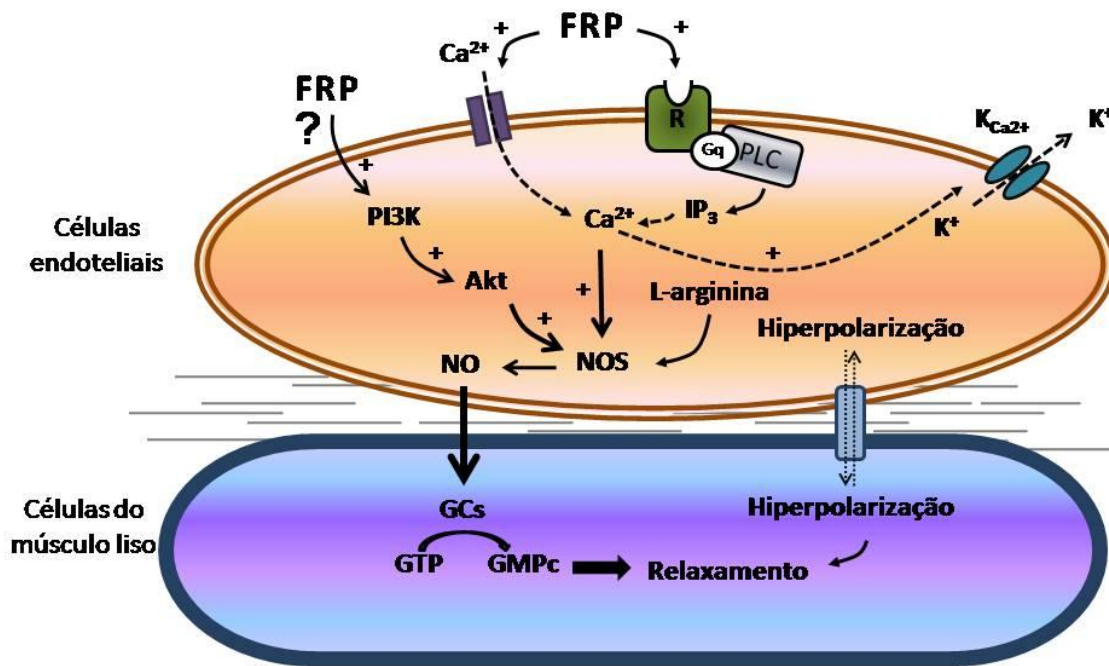


Figura 26: Diagrama esquemático do mecanismo vasorrelaxante da FRP: A FRP medeia a ativação de canais de Ca^{2+} ou de um receptor acoplado à proteína G (R) com subsequente ativação da PLC, nas células endoteliais. Os canais de Ca^{2+} induzem o influxo de Ca^{2+} do meio extracelular e a PLC pode estimular a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, aumentando a concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ativando a enzima NOS nas células endoteliais. Além disso, a eNOS também é fosforilada pela via PI3K/Akt, que também culmina com sua ativação e produção de NO. O NO difunde-se da célula endotelial para a célula muscular lisa e ativa a enzima GCs que converte o GTP em GMPc que induz relaxamento do músculo liso, promovendo vasodilatação. Além disso, em vasos de pequeno calibre, a FRP também induz a ativação de $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ e promover hiperpolarização da célula endotelial e conseqüentemente da célula do músculo liso que também contribui para a atividade vasorrelaxante da FRP.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

1. A FRP obtida da *C. celtidifolius* apresenta atividade vasorrelaxante em LAM, artéria mesentérica isolada e aorta torácica isolados de rato;
2. O mecanismo da atividade vasodilatadora em vasos de pequeno calibre envolve a participação da via NO/GMPc e hiperpolarização do músculo liso vascular induzido por abertura de canais K_{Ca}^{2+} ;
3. O mecanismo da atividade vasodilatadora em vasos de grande calibre envolve a participação da via NO/GMPc;
4. A ativação da via NO/GMPc pela FRP envolve o influxo de Ca^{2+} do meio extracelular pela ativação de proteínas sensíveis ao NEM e de estoques intracelulares, via ativação da PLC;
5. A ativação da via NO/GMPc pela FRP também envolve mecanismos dependentes da fosforilação da eNOS pela via PI3K/Akt;
6. A FRP não apresenta atividade antiaterogênica no modelo de aterogênese induzida pela dieta em camundongos C57/BL6 LDLr KO.

7. Referências Bibliográficas

- Adegbo AS, Triggle CR. Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanism in perfused rat mesenteric arterial bed. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 21:423-429; 1993.
- Albino de Almeida AB, Melo PS, Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Carli L, Nunes DS, Haun M, Souza Brito AR. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **Eur. J. Pharmacol.** 472(3):205-212; 2003.
- Alvarez E, Campos-Toimil M, Justiniano-Basaran H, Lugnier C, Orallo F. Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. **Br. J. Pharmacol.** 147(3):269-280; 2006.
- Amaral ACF, Barnes RA. Alkaloids of *Croton celtidifolius*. **Planta Med.** 63:485; 1997.
- Andriambelason E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. **Br. J. Pharmacol.** 120(6):1053-1058; 1997.
- Andriambelason E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 33(2):248-254; 1999.
- Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. **Cardiovasc. Res.** 73(2):404-413; 2007.
- Arts IC. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. **J. Nutr.** 138(8):1561S-1566S; 2008.
- Athikomkulchai S, Prawat H, Thasana N, Ruangrunsi N, Ruchirawat S. COX-1, COX-2 inhibitors and antifungal agents from *Croton hutchinsonianus*. **Chem. Pharm. Bull.** 54(2):262-264; 2006.
- Ayajiki K, Kindermann M, 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.** 78(5):750-758; 1996.
- Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4β-8)-epicatechin] in rats. **Free Radic. Biol. Med.** 33(1):142-148; 2002.

7. Referências Bibliográficas

- Baccelli C, Navarro I, Block S, Abad A, Morel N, Quetin-Leclercq J. Vasorelaxant activity of diterpenes from *Croton zambesicus* and synthetic trachylobanes and their structure-activity relationships. **J. Nat. Prod.** 70(6):910-917; 2007.
- Badimòn L; Martinèz-González J. Endotelio em La proteccion vascular: nuevos conocimientos. **Rev. Esp. Cardiol.** 55(1):17-26; 2002.
- Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi MS, Preuss HG, Vinson JA. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Mutat. Res.** 523-524:87-97; 2003.
- Balick MJ, Cox PA. Plants, People, and Culture: the Science of Ethnobotany. **New York: Scientific American Library;** 1977.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.** 78(5):431-441; 2005.
- Barnes RA, Soeiro OM, Lopes JÁM. The alkaloids of *Croton salutaris* and *Croton celtidifolius*. **Ann. Acad. Bras. Cienc.** 52:187; 1980.
- Bentivegna SS, Whitney KM. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. **Food Chem. Toxicol.** 40(12):1731-1743; 2002.
- Bhat KPL, Kosmeder II JW, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. **Antioxid. Redox Signal.** 3:1041-1064; 2001.
- Bighetti EJ, Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Brito AR. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **J. Pharm. Pharmacol.** 51(12):1447-1453; 1999.
- Bighetti EJ, Souza-Brito AR, de Faria EC, Oliveira HC. Chronic treatment with bark infusion from *Croton cajucara* lowers plasma triglyceride levels in genetic hyperlipidemic mice. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 82(6):387-392; 2004.
- Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** 285(3):C499-508; 2003.
- Boucher MJ, Jean D, Vézina A, Rivard N. Dual role of MEK/ERK signalling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. **Am. J. Gastro. and Liver Physiol.** 286:G736-G746; 2004.
- Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? **Atherosclerosis.** 197(1):1-11; 2008.

7. Referências Bibliográficas

- Briskin DP. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiol.** 124(2): 507-514; 2000.
- Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. **Physiol. Genomics.** 9(1):27-41; 2002.
- Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage. **Ann. Rev. of Biochem.** 52:223-261; 1983.
- Bryan RM, You R, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor. **Anesthesiology.** 102:1261-1277; 2005.
- Buckley BJ, Mirza Z, Whorton AR. Regulation of Ca²⁺-dependent nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells. **Am. J. Physiol.** 269:C757-65; 1995.
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacol. Sci.** 23:374-380; 2002.
- Busse R, Luckhoff A, Winter I, Mulsch A, Pohl U. Fendiline and calmidazolium enhance the release of endothelium-derived relaxant factor and of prostacyclin from cultured endothelial cells. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 337(1):79-84; 1988.
- Busse R, Mulsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS Lett.** 265(1-2):133-136; 1990.
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Filho VC, Yunes RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.** 14(6):401-418; 2000.
- Calixto JB, Santos AR, Cechinel Filho V, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Med. Res. Rev.** 18:225–258; 1998.
- Calixto JB. Biological activity of plants extracts: novel analgesic drugs. **Exp. Op. Emer. Drugs.** 2:261-279; 2001.
- Camurça-Vasconcelos AL, Bevilaqua CM, Morais SM, Maciel MV, Costa CT, Macedo IT, Oliveira LM, Braga RR, Silva RA, Vieira LS. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Vet. Parasitol.** 148(3-4):288-294; 2007.
- Carlini EA. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 75(3):501-512; 2003.

7. Referências Bibliográficas

- Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF, et al. Effects of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. **Neurosci. Lett.** 328:281-284; 2002.
- Chauhan S, Rahman A, Nilsson H, Clapp L, MacAllister R, Ahluwalia A. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. **Cardiovasc. Res.** 57:207-216; 2003.
- Chen SF, Fei X, Li SH. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. **Microvasc. Res.** 50(1):119-128; 1995.
- Cheng M, Gao HQ, Xu L, Li BY, Zhang H, Li XH. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidins extracts in streptozocin induced diabetic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 50(5):503-509; 2007.
- Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B, Shah PK. Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. **Circulation.** 109(20):2448-2453; 2004.
- Coleman HÁ, Tare M, Parkington HC. EDHF is not K⁺ but may be due to spread of current from the endothelium in guinea pig arterioles. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 280 (6):H2478-2483; 2001.
- Corder R, Warburton RC, Khan NQ, Brown RE, Wood EG, Lees DM. The procyanidin-induced pseudo laminar shear stress response: a new concept for the reversal of endothelial dysfunction. **Clin. Sci. (Lond).** 107(5):513-517; 2004.
- Corrêa DS, Rabetti AC, Rae GA. ATP-sensitive potassium channels do not mediate vasorelaxation by acetylcholine or iloprost. **Braz. J. Med. and Biol. Res.** 24:729-734; 1991.
- Côrtes SF, Rezende BA, Corriu C, Medeiros IA, Teixeira MM, Lopes MJ, Lemos VS. Pharmacological evidence for the activation of potassium channels as the mechanism involved in the hypotensive and relaxant effect of dioclein in rat small resistance arteries. **Br. J. Pharmacol.** 133:849-858; 2001.
- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.** 60:52-60; 1997.
- Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk C, Tang S, Praticò D. Effect Of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor deficient mice. **Circulation.** 106:1282-1287; 2002.

7. Referências Bibliográficas

- Cyrus T, Yao Y, Tung LX, Praticò D. Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin. **Atherosclerosis**. 184(1):8-14; 2006.
- DalBó S, Jurgensen S, Horst H, Ruzza AA, Soethe DN, Santos AR, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **J. Pharm. Pharmacol.** 57:765-771; 2005.
- DalBó S, Jurgensen S, Horst H, Ruzza AA, Soethe DN, Santos AR, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 85:317-23; 2006.
- De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochem. Syst. Ecol.** 27:445-459; 1999.
- De Smet PA. Herbal remedies. **N. Engl. J. Med.** 347(25):2046-2056; 2002.
- Dell'Agli M, Buscialà A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. **Cardiovasc. Res.** 63:593-602; 2004.
- Demura Y, Ishizaki T, Ameshima S, Okamura S, Hayashi T, Matsukawa S, Miyamori I. The activation of nitric oxide synthase by copper ion is mediated by intracellular Ca^{2+} mobilization in human pulmonary arterial endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.** 125(6):1180-1187; 1998.
- Depréz S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Antioxid. Redox Signal.** 3(6):957-967; 2001.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**. 399(6736):601-605; 1999.
- Dora KA, Garland CJ. Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K^+ in the rat isolated mesenteric artery. **Am. J. Physiol. Heart Physiol.** 280:H2424- H2429; 2001.
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 46:235-276; 2006.
- Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**. 19:269-272; 1998.

- El Babili F, Fabre N, Moulis C, Fouraste I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. **Fitoterapia**. 77(5):384-387; 2006.
- Esmeraldino LE, Souza AM, Sampaio SV. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**. 12(8):570-576; 2005.
- Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovasc. Diabetol**. 5:4; 2006.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. **Bull. World Health Organ**. 63(6):965-981; 1985.
- Farnsworth NR, Blomster RN, Messmer WM. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. **LLOYDIA**. 32:1-28; 1969.
- Fekete S. Animal models in experimental atherosclerosis: a critical review. **Acta Vet. Hung**. 41:3-9; 1993.
- Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Where Are We Now? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. 26:1215-1225; 2006.
- Féléto M, Vanhoutte PM. The alternative: EDHF. **J. Mol. Cell. Cardiol**. 31:15-22; 1999.
- Fimognari C, Lenzi M, Hrelia P. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates and anthocyanins: mechanisms of action and structure-activity relationship. **Curr. Med. Chem**. 15(5):440-447; 2008.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen P, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. **J. Cardiovasc. Pharmacol**. 26:90-95; 1995.
- Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. 284(1):R1-12; 2003.
- Fleming I, Busse R. NO: the primary EDRF. **J. Mol. Cell. Cardiol**. 31:5-14; 1999.
- Fujii H, Sun B, Nishioka H, Hirose A, Aruoma OI. Evaluation of the safety and toxicity of the oligomerized polyphenol oligonol. **Food and Chem. Toxicol**. 45:378-387; 2007.

7. Referências Bibliográficas

- Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**. 185:219-226; 2006.
- Garcia-Cardena G, Comander J, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA Jr. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 98(8):4478-4485; 2001.
- Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. **Hypertension**.15:486-492; 1990.
- Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends Pharmacol. Sci**. 16:23-30; 1995.
- Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. **Trends Cardiovasc. Med**. 11(3-4):103-112; 2001.
- Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. Transition of blood-borne monocytes into foam cells lesions. **Am. J. Pathol**. 103:181–90; 1981.
- Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc. Res**. 55:250–260; 2002.
- Giang PM, Jin HZ, Son PT, Lee JH, Hong YS, Lee JJ. ent-Kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS-induced NF-kappaB activation and NO production. **J. Nat. Prod**. 66(9):1217-1220; 2003.
- Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**. 16:104-503; 2001.
- Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. 283(1):F1-10; 2002.
- Goto K, Fujii K, Kansui Y, Abe I, Iida M. Critical role of gap junctions in endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric arteries. **Clin. Exp. Pharmacol. Phys**. 29:595-602; 2000.
- Govindarajan R, Vijayakumar M, Rao ChV, Pushpangadan P, Asare-Anane H, Persaud S, Jones P, Houghton PJ. Antidiabetic activity of *Croton klotzianus* in rats and direct stimulation of insulin secretion in-vitro. **J. Pharm. Pharmacol**. 60(3):371-376; 2008.

7. Referências Bibliográficas

- Graier WF, Schmidt K, Kukovetz WR. Is the bradykinin-induced Ca^{2+} influx and the formation of endothelium-derived relaxing factor mediated by a G protein? **Eur. J. Pharmacol.** 225(1):43-49; 1992.
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL. Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation **J. Agric. Food Chem.** 51: 7513-7521, 2003.
- Guerra PM, Nodari OR. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (eds). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª edição. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis, UFSC, p. 15; 2001.
- Guerrero MF, Puebla P, Carrón R, Martín ML, San Román L. Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus*. **J. Ethnopharmacol.** 94(1):185-189; 2004.
- Gupta M, Mazumder UK, Vamsi MLM, Sivakumar T, Kandar CC. Anti-steroidogenic activity of the of two Indian medicinal plants in mice. **J. Ethnopharmacol.** 90(1):21-25; 2004.
- Gurgel LA, Sidrim JJ, Martins DT, Cechinel Filho V, Rao VS. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **J. Ethnopharmacol.** 97(2):409-412; 2005.
- Guyton JR, Klemp KF. The lipid-rich core region of human atherosclerotic fibrous plaques. Prevalence of small lipid droplets and vesicles by electron microscopy. **Am. J. Pathol.** 134(3):705-717; 1989.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nat. Rev. Immunol.** 6(7):508-519; 2006.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **New Eng. J. Med.** 352(16):1685-1695; 2005.
- Harrison D, Griendling KK, Lanmessenger U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.** 91:7A-11A; 2003.
- Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T. Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. **Atherosclerosis.** 189(2):350-357; 2006.
- Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chem. Pharm. Bull.** 38(3):717-720; 1990.

7. Referências Bibliográficas

- Hecker M. endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction? **News Physiol.Sci.** 15:1-5; 2000.
- Herrero-Martinez MJ, Rafols C, Roses M, Bosch E, Lozano C, Torress JL. Micellar electrokinetic chromatography estimation of size and composition of procyanidins after thiolysis wit cysteine. **Electrophoresis.** 24:1404-1410; 2003.
- Herrmann J, Lerman A. The endothelium: dysfunction and beyond. **J. Nucl. Cardiol.** 8(2):197-206; 2001.
- Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Rodríguez JA, Haun M, Nunes DS, Souza Brito AR. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.** 69(3):229-234; 2000.
- Ho SC, Hwang LS, Shen YJ, Lin CC. Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. **J. Agric. Food Chem.** 55(26):10664-10670; 2007.
- Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. **Am. J. Clin. Nutr.** 76(4):798-804; 2002.
- Hou DX, Luo D, Tanigawa S, Hashimoto F, Uto T, Masuzaki S, Fujii M, Sakata Y. Prodelphinidin B-4 3'-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK1-NF-kappaB pathway. **Biochem. Pharmacol.** 74(5):742-751; 2007.
- Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 30: 535-560; 1990.
- Inoue R, Jensen LJ, Shi J, Morita H, Nishida M, Honda A, Ito Y. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. **Circ. Res.** 99(2):119-131; 2006.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus mediated gene delivery. **J. Clin. Invest.** 5:123-127; 1993.
- Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. **J. Clin. Invest.** 93:1885-1893; 1994.

7. Referências Bibliográficas

- Jiang R, Lau K, Hon P, Mak TCW, Woo K, Fung K. Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. **Curr. Med. Chem.** 12 (2):237-246; 2005.
- Jones K. Review of sangre de drago (*Croton lechleri*)--a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. **J. Altern. Complement. Med.** 9(6):877-896; 2003.
- Kadár A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiov. Surg.** 9(2):109-121; 2001.
- Katiyar SK. Matrix metalloproteinases in cancer metastasis: molecular targets for prostate cancer prevention by green tea polyphenols and grape seed proanthocyanidins. **Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets.** 6(1):17-24; 2006.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat. Rev. Drug Disc.** 4(3):206-220; 2005.
- Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Ariga T. Increase of antioxidant potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidins-rich extract from grape seeds. **J. Agric. Food. Chem.** 47:1892-1897; 1999.
- Kowala MC, Recce R, Beyer S, Gu C, Valentine M. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. **Atherosclerosis.** 149:323-330; 2000.
- Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, Estrela HF, Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FR. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide.** 14(1):12-20; 2006.
- Kristensen SD, Ravn HB, Falk E. Insights into the pathophysiology of unstable coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.** 80:5-9; 1997.
- Kruth HS. Subendothelial accumulation of unesterified cholesterol. An early event in atherosclerotic lesion development. **Atherosclerosis.** 57(2-3):337-341; 1985.
- Kuo PC, Shen YC, Yang ML, Wang SH, Thang TD, Dung NX, Chiang PC, Lee KH, Lee EJ, Wu TS. Crotonkinins A and B and related diterpenoids from *Croton tonkinensis* as anti-inflammatory and antitumor agents. **J. Nat. Prod.** 70(12):1906-1909; 2007.

7. Referências Bibliográficas

- Kurokawa K. Salt, kidney and hypertension: why and what to learn from genetic analyses? **Nephron**. 89(4):369-376; 2001.
- Kuruvilla L, Kartha CC. Molecular mechanisms in endothelial regulation of cardiac function. **Mol. Cell Biochem**. 253(1-2):113-123; 2003.
- Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? **Circulation**. 109(21):27-33; 2004.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**. 21:69-78; 2006.
- Lenasi H, Kohlstedt K, Fichtlscherer B, Mülsch A, Busse R, Fleming I. Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495. **Cardiovasc. Res**. 59(4):844-853; 2003.
- Leung KW, Cheng YK, Mak NK, Chan KK, Fan TP, Wong RN. Signaling pathway of ginsenoside-Rg1 leading to nitric oxide production in endothelial cells. **FEBS Lett**. 580(13):3211-3216; 2006.
- Levine GN, Keaney JF Jr, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. **N. Engl. J. Med**. 332(8):512-521; 1995.
- Li L, Van Breemen C. Na⁺-Ca²⁺ exchange in intact endothelium of rabbit cardiac valve. **Circ. Res**. 76(3):396-404; 1995.
- Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. **Cur. Op. in Lipidol**. 7(5):330-335; 1996.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. **Circulation**. 105:1135-1143; 2002.
- Libby P. Changing concepts of atherogenesis. **J. Intern. Med**. 247(3):349-358; 2000.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**. 420:868–874; 2002.
- Lima-Accioly PM, Lavor-Porto PR, Cavalcante FS, Magalhães PJ, Lahlou S, Morais SM, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve in vitro. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**. 33(12):1158-1163; 2006.
- Lin HP, Kulp SK, Tseng PH, Yang YT, Yang CC, Chen CS, Chen CS. Growth inhibitory effects of celecoxib in human umbilical vein endothelial cells are

7. Referências Bibliográficas

- mediated through G1 arrest via multiple signaling mechanisms. **Mol. Cancer Ther.** 3(12):1671-1680; 2004.
- Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 169(2):203-214; 2003.
- Lopes MI, Saffi J, Echeverrigaray S, Henriques JA, Salvador M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **J. Ethnopharmacol.** 95(2-3):437-445; 2004.
- Luckhoff A, Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. **Pflugers. Arch.** 416(3):305-311; 1990.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. **Nature.** 407: 233-224; 2000.
- Magalhães PJ, Lahlou S, Jucá DM, Coelho-de-Souza LN, da Frota PT, da Costa AM, Leal-Cardoso JH. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 22(2):169-177; 2008.
- Magalhães PJ, Lahlou S, Leal-Cardoso JH. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 18(5):539-546, 2004.
- Magalhães PJ, Lahlou S, Vasconcelos dos Santos MA, Pradines TL, Leal-Cardoso JH. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Med.** 69(9):874-877; 2003.
- Malakoff D. The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. **Science.** 288:248–253; 2000.
- Malek AM, Jiang L, Lee I, Sessa WC, Izumo S, Alper SL. Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI-3-kinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 254(1):231-242; 1999.
- Marston A, Hostettmann K. Plant molluscicides. **Phytochemistry.** 24:639-652; 1985.
- Martin S, Andriambeloson E, Takeda K, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. **Br. J. Pharmacol.** 135(6):1579-1587; 2002.

7. Referências Bibliográficas

- Masuda K, Hori T, Tanabe K, Kano Y, Hirayama A, Nagase S. Proanthocyanidin promotes free radical-scavenging activity in muscle tissues and plasma. **Appl Physiol. Nutr. Metab.** 32(6):1097-1104; 2007.
- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 290:909-913; 2002.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **J. Clin Invest.**106:1521-1530; 2000.
- Matsuura R, Moriyama H, Takeda N, Yamamoto K, Morita Y, Shimamura T, Ukeda H. Determination of antioxidant activity and characterization of antioxidant phenolics in the plum vinegar extract of cherry blossom (*Prunus lannesiana*). **J. Agric. Food Chem.** 56(2):544-549; 2008.
- McCarron RM, Chen Y, Tomori T, Strasser A, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M. Endothelial-mediated regulation of cerebral microcirculation. **J. Physiol. Pharmacol.** 57(11):133-144; 2006.
- McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **J. Physiol.** 177:21-30; 1965.
- Mesia GK, Tona GL, Penge O, Lusakibanza M, Nanga TM, Cimanga RK, Apers S, Van Miert S, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ. Antimalarial activities and toxicities of three plants used as traditional remedies for malaria in the Democratic Republic of Congo: *Croton mubango* , *Nauclea pobeguini* and *Pyrenacantha staudtii*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 99(4):345-357; 2005.
- Michiels C. Endothelial Cell Functions. **J. Cell. Physiol.** 196:430–443; 2003.
- Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.** 285(6):L1179-1183; 2003.
- Mombouli J, Vanhoutte PM. endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 31:61-74; 1999.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium derived hyperpolarizing factors: Updating the unknown. **Trends. Pharmacol. Sci.**18:252-256; 1997.
- Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br. J. Pharmacol.**147:193–201; 2006.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and phamacology. **Pharmacol. Rev.** 43:109-142; 1991.

7. Referências Bibliográficas

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.** 65:55–63; 1983.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 42(2):271-279; 2007.
- Mukherjee R, Axt EM. Ciclitols from *Croton celtidifolius*. **Phytochemistry.** 23: 2682-2684; 1984.
- Nardi GM, DalBó S, Monache FD, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.** 107:73-78; 2006.
- Nardi GM, Felippi R, DalBó S, Siqueira-Júnior JM, Arruda DC, Delle Monache F, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine.** 10:176-184; 2003.
- Nardi GM, Siqueira JM, Delle Monache F, Pizzolatti MG, Ckless K, Ribeiro-do-Valle RM. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine.** 14:115-122; 2007.
- Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. 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.** 19(3):455-457; 2005.
- Ndiaye M, Chataigneau T, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. 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.** 142(7):1131-1136; 2004.
- Neel JV, Salzano FM, Junqueira PC, Keiter F, Lewis DM. Studies on the Xavante indians of the Brazilian Mato Grosso. **Am. J. Hum. Gen.** 16:52-60; 1964.
- Nisbet LJ, Moore M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Curr. Opin. Biotechnol.** 8(6):708-712; 1997.
- Norata GD, Marchesi P, Passamonti S, Pirillo A, Violi F, Catapano AL. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. **Atherosclerosis.** 191(2):265-271; 2007

7. Referências Bibliográficas

- Ohno M, Gibbons GH, Dzau VJ, Cooke JP. Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling. **Circulation.** 88(1):193-197; 1993.
- Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry.** 32:507-521; 1993.
- Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Med.** 55(2):117-22; 1989.
- Oliveira AC, Leal-Cardoso JH, Santos CF, Morais SM, Coelho-de-Souza AN. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34(11):1471-1474; 2001.
- Oliver WJ, Cohen EL, Neel JV. Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomano indians, a "no-salt" culture. **Circulation.** 52:146-151; 1975.
- Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. **Caries Res.** 27(2):124-129, 1993.
- Paigen B, Holmes PA, Novak EK, Swank RT. Analysis of atherosclerosis susceptibility in mice with genetic defects in platelet function. **Arteriosclerosis.** 10(4):648-652; 1990.
- Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis.** 68(3):231-240; 1987.
- Paula AC, Toma W, Gracioso JS, Hiruma-Lima CA, Carneiro EM, Souza Brito AR. The gastroprotective effect of the essential oil of *Croton cajucara* is different in normal rats than in malnourished rats. **Br. J. Nutr.** 96(2):310-315; 2006.
- Phan MG, Phan TS, Hamada Y, Otsuka H. Cytotoxic diterpenoids from Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis* GAGNEP. **Chem. Pharm. Bull.** 53(3):296-300; 2005.
- Pimentel AML, Costa CA, Carvalho LCRM, Brandão RM, Rangel BM, Tano T, Soares de Moura R, Resende AC. The Role of NO-cGMP pathway and potassium channels on the relaxation induced by clonidine in the rat mesenteric arterial bed. **Vascul. Pharmacol.** 46:353-359; 2007.
- Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** 7(10):803-815, 2007.

- Pornpakakul S, Liangsakul J, Ngamrojanavanich N, Roengsumran S, Sihanonth P, Piapukiew J, Sangvichien E, Puthong S, Petsom A. Cytotoxic activity of four xanthones from *Emericella varicolor*, an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*. **Arch. Pharm. Res.** 29(2):140-144; 2006.
- Porto PAL, Laranjinha JAN, Freitas VAP. Antioxidant protection of low density lipoprotein by proanthocyanidins: structure/activity relationships. **Biochem. Pharmacol.** 66:947-954; 2003.
- Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature.** 451(7181):904-913, 2008.
- Rao VS, Gurgel LA, Lima-Júnior RC, Martins DT, Cechinel-Filho V, Santos FA. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **J. Ethnopharmacol.** 113(2):357-360; 2007.
- Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L.. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. **Mol. Nut. Food Res.** 49:159-174; 2005.
- Ray CJ, Marshall JM. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. **J. Physiol.** 570:85-96; 2006.
- Ray S, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross SM, Kothari SC, Preuss HG, Stohs SJ. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 09(3-4):165-197; 2001.
- Reed JD. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **J. Anim. Sci.** 73(5):1516-1528; 1995.
- Reidy MA. Growth factors and arterial smooth muscle cell proliferation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 714:225-230; 1994.
- Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. **Am. J. Pathol.** 144(5):962-74; 1994.
- Risco E, Ghia F, Vila R, Iglesias J, Alvarez E, Cañigueral S. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Med.** 69(9):785-794; 2003.
- Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, Chance R, Dinesen B, Frank B, Gingerich R, Goldstein D, Widemeyer HM, Haffner S, Hales CN, Jarett L,

- Polonsky K, Porte D, Skyler J, Webb G, Gallagher K. Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. **Diabetes**. 45(2):242-256; 1996.
- Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opi. Pharmacol**. 1(4):364-369; 2001.
- Rodríguez JA, Hiruma-Lima CA, Souza Brito AR. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Hum. Exp. Toxicol**. 23(9):455-461; 2004.
- Roselaar SE; Kakkanathu PX, Daugherty A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE $-/-$ and LDL receptor $-/-$ mice. Decreasing density with disease progression. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. 16:1013–1018; 1996.
- Rosenfeld JC, Savarese RP, De Laurentis DA. Management of extremity ischemia secondary to radiation therapy. **J. Cardiovasc. Surg**. 28(3):266-269; 1987.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med**. 340:115-126; 1999.
- Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. **Transplant. Proc**. 25(2):2041-2043; 1993.
- Rossi D, Bruni R, Bianchi N, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, Lista A, Paganetto G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. **Phytomedicine**. 10(2-3):139-144; 2003.
- Rubio AR, Morales-Segura MA. Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control. **Arch. Med. Res**. 35:1-11; 2004.
- Runnie I, Salleh MN, Mohamed S, Head RJ, Abeywardena MY. Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in the isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. **J. Ethnopharmacol**. 92:311-316; 2004.
- Sano A, Uchida R, Saito M, Shioya N, Komori Y, Tho Y, Hashizume N. Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**. 53(2):174-182; 2007.
- Santos FA, Jeferson FA, Santos CC, Silveira ER, Rao VS. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sci**. 77(23):2953-2963; 2005.

7. Referências Bibliográficas

- Santos RD. (Coord.). III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** 77(III):1-48; 2001.
- Santos RI. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários.** In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª edição. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis, UFSC, p. 15; 2001.
- Santos SC, Mello JCP. Taninos In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia – Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC; 1999.
- Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidins against ischemic reperfusion injury. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 3:1289-1297; 1999.
- Savage D, Perkins J, Hong Lim C, Bund SJ. Functional evidence that K⁺ is the nonnitric oxide, non-prostanoid endothelium-derived relaxing factor in rat femoral arteries. **Vascul. Pharmacol.** 40(1):23-28; 2003.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry.** 30:3875-3883; 1991.
- Schuldt EZ, Bet A C, Hort MA, Ianssen C, Maraschin M, Ckless K, Ribeiro-do-Valle RM. An ethyl acetate fraction obtained from a Southern Brazilian red wine relaxes rat mesenteric arterial bed through hyperpolarization and NO-cGMP pathway. **Vascul. Pharmacol.** 43(1):62-68; 2005.
- Schuldt EZ, Ckless K, Simas ME, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 35(2):234-239; 2000.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxid. Redox Signal.** 10(6):1115-1126; 2008.
- Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 100(1):15-18; 2005.
- Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. **J. Physiol.** 547(Pt 1):21-33, 2003.
- Shu Y Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.** 61:1053-1071; 1998.

7. Referências Bibliográficas

- Silva EL, Piskula M, Terao J. Enhancement of antioxidant ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. **Free Rad. Biol. Med.** 24(7/8):1209-1216; 1998.
- Silva RM, Santos FA, Rao VS, Maciel MA, Pinto AC. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes Obes. Metab.** 3(6):452-456; 2001b.
- Silva RM, Santos FA, Rao VS, Maciel MA, Pinto AC. The lipid-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from Benth. in mice fed on high-fat diet. **J. Pharm. Pharmacol.** 53(4):535-539; 2001a.
- Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27(2):266-274; 2007.
- Siqueira R, Leal-Cardoso J, Couture R, Lahlou S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 33(3):238-247; 2006b
- Siqueira RJ, Magalhães PJ, Leal-Cardoso JH, Duarte GP, Lahlou S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sci.** 78(20):2365-2372; 2006a.
- Smith LB, Downs RJ, Klein RM. Euforbiaceas in: **Flora Ilustrada Catarinense.** 408p. (1988).
- Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbé A, Storey DM. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. **Caries Res.** 41(5):342-349; 2007.
- Stary HC. Changes in the cells of atherosclerotic lesions as advanced lesions evolve in coronary arteries of children and young adults, in: Glagov, S.; Newman, W.P.; Scaffer, S.A. (Eds.), **Pathobiol. Hum. Atheroscl. Pla.** Springer, New York, p.93–106, 1990
- Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J. Biol. Chem.** 272:20963-20966; 1997.
- Stewart-Phillips JL, Lough J. Pathology of atherosclerosis in cholesterol-fed, susceptible mice. **Atherosclerosis.** 90:211–218; 1991.
- Stocker R, Keaney Jr JF. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiol. Rev.** 84:1381–1478; 2004.

- Stoclet J, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak M, Bedoui J E, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. **Eur. J. Pharmacol.** 500:299-313; 2004.
- Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V, Alvarado C. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. **J. Ethnopharmacol.** 105(1-2):99-101; 2006.
- Suárez AI, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Tillett S, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. **J. Ethnopharmacol.** 88(1):11-14; 2003.
- Sun Y, Sumi D, Kumagai Y. Serine 1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase caused by 2,4,6-trinitrotoluene through PI3K/Akt signaling in endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 214(1):55-60, 2006.
- Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Legault J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **J. Ethnopharmacol.** 103(1):99-102; 2006.
- Taubert D, Breitenbach T, Lazar A, Censarek P, Harlfinger S, Berkels R, Klaus WG, Roesen R. Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants, **Free Rad. Biol. Med.** 35(12):1599-1607; 2003.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. **Physiological Reviews.** 86:515-581; 2006.
- Theis N, Lerda M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **Int. J. Plant Sci.** 164:S93–S102; 2003.
- Tieppo M, Porawski M, Salvador M, Moreira AJ, Collado PS, González-Gallego J, Marroni NP. Croton cajucara Benth. leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat. **Biol. Pharm. Bull.** 29(1):161-165; 2006.
- Toufektsian MC, de Lorgeril M, Nagy N, Salen P, Donati MB, Giordano L, Mock HP, Peterek S, Matros A, Petroni K, Pilu R, Rotilio D, Tonelli C, de Leiris J, Boucher F, Martin C. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. **J. Nutr.** 138(4):747-752; 2008.
- Tran QK, Ohashi K, Watanabe H. Calcium signalling in endothelial cells. **Cardiovasc. Res.** 48(1):13-22; 2000.
- Tsacheva I, Rostan J, Iossifova T, Vogler B, Odjakova M, Navas H, Kostova I, Kojouharova M, Kraus W. Complement inhibiting properties of dragon's blood from *Croton draco*. **Z. Naturforsch [C].** 59(7-8):528-532; 2004.

- Uchida S, Hirai K, Hatanaka J, Hanato J, Umegaki K, Yamada S. Antinociceptive effects of St. John's wort, *Harpagophytum procumbens* extract and Grape seed proanthocyanidins extract in mice. **Biol. Pharm. Bull.** 31(2):240-245; 2008.
- Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and vascular disease. In: Panza JA, Cannon RO. 3^a eds. **Endothelium, Nitric Oxide, and Atherosclerosis**. Armonk, NY: Futura Publishing Co. Inc.p.79-95; 1999.
- Verpoorte R. Exploration of nature's chemodiversity the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Disc. Today.** 3:232-238; 1998.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP. Lessons sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1262–1275; 2000.
- Wazlawik E, Da Silva M A, Peters RR, Correia JF, Farias MR, Calixto JB, Ribeiro-do-Valle RM. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. **J. Pharm. Pharmacol.** 49(4):433-437; 1997.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. **J. Am. Coll. Cardiol.** 42(7):1149-1160; 2003.
- Williams KJ, Fisher EA. Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? **Curr. Op. in Clin. Nut. and Met. Care.** 8:139-146; 2005.
- Wu XA, Zhao YM, Yu NJ. A novel analgesic pyrazine derivative from the leaves of *Croton tiglium* L. **J. Asian Nat. Prod. Res.** 9(3-5):437-441; 2007.
- Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Clin. Med. Res.** 4(1):53-65, 2006.
- Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. **Curr. Op. Pharmacol.** 4:110–115; 2004.
- Youngsa-ad W, Ngamrojanavanich N, Mahidol C, Ruchirawat S, Prawat H, Kittakoop P. Diterpenoids from the roots of *Croton oblongifolius*. **Planta Med.** 73(14):1491-1494; 2007.
- Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27(8):1706-1721; 2007.

7. Referências Bibliográficas

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. **Circulation**. 101(13):1539-1545; 2000.

119

Zhang FL, Gao HQ, Wu JM, Ma YB, You BA, Li BY, Xuan JH. Selective inhibition by grape seed proanthocyanidin extracts of cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products in endothelial cells. **J. Cardiovasc. Pharmacol**. 48(2):47-53; 2006.