



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**HIDEMBURGO GONÇALVES ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO VASODILATADORA DO EXTRATO AQUOSO  
OBTIDO DAS FOLHAS DE *Alpinia zerumbet* K. SCHUM EM AORTA DE RATOS**

**FORTALEZA-CE**

**2012**

HIDEMBURGO GONÇALVES ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO VASODILATADORA DO EXTRATO AQUOSO  
OBTIDO DAS FOLHAS DE *Alpinia zerumbet* K. SCHUM EM AORTA DE RATOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.  
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Socorro Vanesca Frota Madeira

**FORTALEZA-CE**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- R571c Rocha, Hidemburgo Gonçalves.  
Caracterização da ação vasodilatadora do extrato aquoso obtido das folhas de *Alpinia zerumbet* K. Schum em aorta de ratos / Hidemburgo Gonçalves Rocha. – 2012.  
92 f.: il., enc.; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.  
Coorientação: Profa. Dra. Socorro Vanesca Frota Madeira.
1. Alpinia. 2. Óxido Nítrico. 3. Endotélio. I. Título.

HIDEMBURGO GONÇALVES ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO VASODILATADORA DO EXTRATO AQUOSO  
OBTIDO DAS FOLHAS DE *Alpinia zerumbet* K. SCHUM EM AORTA DE RATOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.  
Área de concentração: Farmacologia

Aprovada em: 27/12/2012

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Socorro Vanesca Frota Madeira (Co-Orientadora)  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Elisabete Amaral de Moraes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Silveira Macêdo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Hemerson Iury F. Magalhães  
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)

Dedico esta tese aos meus pais:

Raimundo Gonçalves Freitas “*in memoriam*” e

Maria do Socorro Rocha Freitas com todo  
amor e carinho

## AGRADECIMENTOS

Dedico essa tese aos meus pais, pelo carinho, dedicação, e lição de vida. E também aos meus irmãos: Lindeberg, Geneceuda, Gilvanda, Raimundo Filho por estarmos sempre juntos na batalha do dia a dia e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup>. Dr. Manoel Odorico de Moraes, não somente por ter me aceitado como orientando, mas, principalmente, por me receber com os braços abertos e por não ter medido esforços para que tudo acontecesse. Obrigado por seu incentivo e entusiasmo e por ter acreditado em mim.

A minha co-orientadora Dra. Socorro Vanesca Frota Madeira pelo seu conhecimento, dedicação e por todo apoio e aprendizado que me proporcionou.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, minha primeira orientadora no mestrado, quem me colocou a “engatinhar” pelos caminhos da pesquisa e do conhecimento. Parece que foi ontem que realizei meus primeiros experimentos de mestrado, que entreguei meu primeiro relatório científico, que falei em um auditório no Congresso de Iniciação Científica da SBBq - Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Muito obrigado por ter me mostrado esse lado magnífico da ciência.

A minha tia, por me acompanhar nas viagens de Juazeiro do Norte a Fortaleza, pela infinita BR116, que saudades dessas aventuras. Obrigado por estar ao meu lado.

A minha vovó Alice, que hoje lá do céu torce por mim. A meu filho, David, sempre preocupado comigo, obrigado. A Fernanda, minha esposa, por ter me dado esse filho maravilhoso e pelos momentos inesquecíveis que vivemos durante todo esse tempo.

A Bruno Coelho Cavalcanti, Hemerson Yury Magalhães e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia do Ó Pessoa, por terem participado da banca no exame de qualificação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Veras Costa Lotufo pelo apoio na apresentação da minha defesa de qualificação.

Aos ICs: Wendell Saraiva Costa e a Clarissa Nunes de Assis pela ajuda incansável para realização deste trabalho.

A Cecília Carvalho de Oliveira por fornecer parte do pulverizado das sementes de *A. zerumbet*.

À Prof<sup>a</sup>. Conceição Aparecida Dornelas sempre prestativa quando solicitada para tirar dúvidas.

A Dr<sup>a</sup>. Maria Elisabete Amaral de Moraes pelo incentivo e motivação.

Agradeço aos colegas e companheiros do Laboratório de Oncologia Experimental – LOE: Danilo Damasceno Rocha, José Delano Barreto Marinho Filho, Felipe Augusto Rocha Rodrigues, Gabriela Cunha Vieira, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, Adriana Andrade Carvalho, Patrícia Marçal da Costa, Arenice de Menezes Costa, Ana Jérsia Araújo, Igor Cabral e aos colegas e amigos da UNIFAC: Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Valden Luís Matos C. Junior, Demétrius Fernandes do Nascimento, Gilmar Holanda da Cunha, pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao estagiário do LOE Joelmir Leite Cruz pela ajuda no manuseio dos ratos.

Um agradecimento mais que especial ao amigo, Francisco Evanir Gonçalves de Lima, pela amizade, pelas conversas construtivas, pelos conselhos, pela paciência e pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À técnica Silvana França dos Santos, cujo trabalho não apenas é essencial como imprescindível para todos no laboratório. À Maria Erivanda França Rios, Paulo Sérgio Castro de Oliveira, Raimundo da Chagas Marques e a Maria Rogéria Bandeira Montenegro, Maria Vilani Rodrigues Bastos (Laboratório de Neurofarmacologia) pelo apoio técnico.

Às secretárias Aura Rhanes, Márcia Hermínia Pinheiro Borges, Fábiana Bezerra Lima, Maria Teresa Rocha, Adelânia Roque Marinho Guedes e Sheyla Prado dos Santos por conseguirem ter sempre uma solução para qualquer problema. Obrigado, Adelânia Roque M. Guedes pela força, e pelos conselhos sempre dados de coração em todos os momentos que precisei.

À Prof<sup>a</sup>. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal – Departamento de Farmácia – UFC, Claudio Roberto Napravnik - Empresa Agroindustrial de Desidratação de Frutas LTDA – Clodonir Porciano Lima - DESIDRATEC/PADETEC pela colaboração através da liberação do equipamento para obtenção do extrato das folhas de *A. zerumbet*. E a Ângelo Roncalli Alves e Silva pela ajuda na utilização do Spray dryer.

Ao Prof<sup>o</sup>. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru e ao químico Cláudio Costa dos Santos pelo incentivo.

Ao Prof<sup>o</sup>. Alberto Melo Soares pelas excelentes aulas de estatística.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e da UNIFAC: Francisco Cilineide do Nascimento, Paulo Dantas Azarias, Fernando Rodrigues Teixeira, Ana Paula Silva, Alana Carvalho Bezerra, Bento Francisco de Oliveira cujo trabalho é essencial para todo o Departamento.

A todos os colegas da pós-graduação, em especial Edith Teles Venâncio, pelas trocas de informações.

Aos meus pequenos animais de laboratório por me fazer enxergar o quanto temos que respeitá-los.

A CNPq pelo financiamento da pesquisa, sem essa ajuda não seria possível a construção desse trabalho.

Ao terminar esta tese, realizei um sonho, uma grande conquista. E esta vitória foi realizada graças à contribuição direta ou indireta de várias pessoas. E são a essas pessoas que agradeço com todo o meu carinho. Vocês foram essenciais para que eu pudesse alcançar mais uma etapa importante da minha vida.



## RESUMO

A *Alpinia zerumbet* é uma planta comumente encontrada na região do nordeste do Brasil. Essa planta é conhecida popularmente por colônia e é muito utilizada na medicina popular por suas propriedades diuréticas e anti-hipertensivas. O objetivo do presente estudo foi investigar se o extrato aquoso das folhas de *A. zerumbet* (EAAz) apresentava atividade vasodilatadora em aorta de rato pré-contraída com fenilefrina e, elucidar o seu mecanismo de ação. Ratos machos Wistar (250 a 300 g), provenientes do biotério da UFC, foram sacrificados por deslocamento cervical e a aorta torácica removida e dissecada. Os anéis da aorta (4 a 5 mm) foram montados em câmeras orgânicas, contendo solução de Krebs e aerados com carbogênio a 37°C, para as medidas de variações na tensão isométrica. O endotélio dos anéis da aorta foi removido mecanicamente para estudar o seu envolvimento no efeito vasodilatador do EAAz. Para estudar o envolvimento do óxido nítrico (NO), GMPc, prostanóides, canais de potássio ativados por  $Ca^{2+}$ , espécies reativas do oxigênio e a ativação das enzimas quinases Src e PI3 quinase, as preparações foram tratadas, respectivamente, com L-NAME (100  $\mu$ M), ODQ (10  $\mu$ M), indometacina (10  $\mu$ M), caribdotoxina (100 nM) mais apamina (100 nM), MnTMPyP (100  $\mu$ M), catalase (500 U/ml), PEG-catalase (500 U/ml), SOD (500 U/ml) e PP2 (20  $\mu$ M), Wortmannin (300 nM). O efeito vasodilatador do EAAz (0,05; 0,15; 0,5; 1,5; 15 e 50  $\mu$ g/mL), acetilcolina ( $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M) e nitroprussiato de sódio ( $10^{-8}$  M) foram avaliados em aorta de ratos pré-contraída com fenilefrina ( $10^{-8}$  -  $3 \times 10^{-8}$  M), antes e após tratamento com os inibidores específicos. A vasodilatação induzida pelo EAAz mostrou-se dependente do endotélio e mediada pelo NO via GMPc já que o relaxamento vascular foi abolido na presença do éster metílico de  $N^G$ -nitro-l-arginina e do ODQ. A vasodilatação também foi reduzida pelo MnTMPyP (permeante celular mimético da SOD), polietilenoglicol catalase, PP2 (inibidor da quinase Src) e Wortmannin (inibidor da fosfoinositideo 3-quinases). A via de produção de EROs induzida pelo EAAz foi inibida significativamente pela ação do MnTMPyP e PEG-catalase. Ocorreu também a inibição da via EROs/PI3 quinase/Src quinase que estão envolvidas na ativação da eNOS. O EAAz causou um relaxamento dependente do endotélio via NO/GMPc com o possível envolvimento de EROs e das Src quinase e fosfoinositideo 3-quinase dependente de Akt. Dessa forma, pode-se concluir que o relaxamento vascular induzido pelo EAAz poderia explicar o tradicional uso do chá das folhas de *A. zerumbet* para o tratamento da hipertensão arterial.

**Palavras-chave:** *Alpinia*. Óxido nítrico. Endotélio.

## ABSTRACT

Characterization of vasorelaxant effects of aqueous extract obtained from leaves of *Alpinia zerumbet* K. SCHUM in rat aorta.

The *Alpinia zerumbet* is a plant commonly found in the northeastern region of Brazil. This plant is popularly known as colony and is widely used in folk medicine for its diuretic and antihypertensive properties. The aim of this study was to investigate whether the aqueous extract of leaves of *A. zerumbet* (EAAz) had vasodilator activity in rat aorta pre-contracted with phenylephrine and to elucidate its mechanism of action. Male Wistar rats (250-300 g) from the vivarium of UFC, were killed by cervical dislocation and the thoracic aorta removed and dissected. The aortic rings (4-5 mm) were mounted in organ cameras, and containing Krebs solution aerated with carbogen at 37 ° C to measure changes in isometric tension. The endothelium of the aortic rings was removed mechanically to study their involvement in the vasodilator effect of EAAz. To study the involvement of nitric oxide (NO), cGMP, prostanoid, potassium channels activated by Ca<sup>2+</sup>, reactive oxygen species and activation of enzymes kinases Src and PI3 kinase, the preparations were treated respectively with L-NAME (100 µM), ODQ (10 µM), indomethacin (10 µM), carybdotoxin (100 nM) plus apamin (100 nM), MnTMPyP (100 µM), catalase (500 U / ml), PEG-catalase (500 U/ ml), SOD (500 U / ml) and PP2 (20 µM), wortmannin (300 nM). The vasodilatory effect of EAAz (0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 15 and 50 µg / mL), acetylcholine (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-5</sup> M) and sodium nitroprusside (10<sup>-8</sup> M) were evaluated in the aorta of rats pre-contracted with phenylephrine (10<sup>-8</sup> - 3x10<sup>-8</sup> M) before and after treatment with the specific inhibitors. EAAz induced vasodilation was dependent and endothelium mediated by NO via cGMP as the vascular relaxation was abolished in the presence of the methyl ester of NG-nitro-L-arginine and ODQ. Vasodilation was also reduced by MnTMPyP (mimetic cellular permeant SOD), catalase polyethylene glycol, PP2 (Src kinase inhibitor) and wortmannin (inhibitor of phosphoinositide 3-kinase). The route of production of ROS induced EAAz was significantly prevented by the action of MnTMPyP and PEG-catalase. There was also the inhibition of the kinase ROS/PI3 / Src kinase that are involved in the activation of the eNOS. The EAAz caused an endothelium-dependent relaxation via NO / cGMP with the possible involvement of ROS and Src kinase and phosphoinositide 3-kinase-dependent Akt. Taking us to the conclusion that the vascular relaxation induced by EAAz could explain the traditional use of the tea leaves of *A. zerumbet* for the treatment of hypertension.

**Keywords:** *Alpinia*. Nitric oxide. Endothelium.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -	Aspecto geral da planta <i>A. zerumbet</i> com detalhes da florescência.....	35
Figura 02 -	Foto: Anéis armados no interior da cuba do banho de órgãos (A); Foto: Armação dos anéis aórticos na haste suporte (B); Foto: Banho de órgãos (C <sub>1</sub> ); Foto: Sistema de aquisição de dados (C <sub>2</sub> ).....	49
Figura 03 -	Representação esquemática do registro da resposta do músculo liso vascular a ação de agonistas e antagonistas.....	50
Figura 04 -	Relaxamento <i>in vitro</i> do músculo liso da aorta torácica de rato pela ação do extrato de <i>A. zerumbet</i> . (A) Registro dos sinais da tensão isométrica do efeito do extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> nos anéis aórticos na: (A <sub>1</sub> ) ausência de endotélio e (A <sub>2</sub> ) presença de endotélio. (B) Traçado original mostrando o relaxamento dependente do endotélio para o extrato aquoso <i>A. zerumbet</i> em anéis aórticos de rato pré-contraídos com fenilefrina (Phe).....	53
Figura 05 -	Efeito relaxante do EAAz e ACh em anéis aórticos com endotélio intacto pré-contraídos por Phe .....	54
Figura 06 -	Registro de um experimento onde um anel desnudado de endotélio é submetido a ação da ACh e após 5 min. seguiu-se adição de SNP.....	55
Figura 07 -	Registro das tensões isométricas dos anéis aórticos incubados com L-NAME por 15 min. antes da adição da Phe. Cinco minutos após a adição da Phe, adicionou-se ao banho doses crescentes e cumulativas do extrato. Cinco minutos após a adição da ultima dose do extrato adicionou-se o SNP.....	56
Figura 08 -	Efeito do N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME; 100 µM), caribdotoxina (100 nM) mais apamina (100 nM) e indometacina	

	(10 $\mu\text{M}$ ) no relaxamento induzido pelo extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> em anéis aórticos intactos de rato. Os resultados são mostrados como a média $\pm$ erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. * indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).....	56
Figura 09 -	Efeito do 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 10 $\mu\text{M}$ ), no relaxamento induzido pelo extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> em anéis aórticos intactos de rato. Os resultados são mostrados como a media $\pm$ erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. * indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).....	57
Figura 10 -	Papel das espécies reativas do oxigênio no relaxamento mediado pelo NO dependente do endotélio para o extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> em anéis aórticos intactos de rato. Os anéis arteriais foram incubados com catalase ou PEG-catalase. (A) e ou superóxido dismutase (SOD) ou MnTMPyP (B) por 30 min. antes da adição da Phe. Todos os experimentos foram executados na presença de caribdotoxina (100 nM), apamina (100 nM) e indometacina (10 $\mu\text{M}$ ). Os resultados são mostrados como a média $\pm$ erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. * indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).....	58
Figura 11 -	Papel das proteínas quinases no relaxamento mediado pelo NO dependente do endotélio pelo extrato aquoso <i>A. zerumbet</i> em anéis aórticos intactos de rato. Efeito do (A) PP2 (30 $\mu\text{M}$ ) ou (B) wortimannin (30 $\mu\text{M}$ ) no relaxamento induzido pelo extrato aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i> em anéis aórticos intactos. Todos os experimentos foram executados na presença de caribdotoxina (100 nM), apamina (100 nM) e indometacina (10 $\mu\text{M}$ ). Os resultados são mostrados como a media $\pm$ erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. * indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).....	59

Figura 12 - Esquematização da via de sinalização ativada pelas EROs.....

64

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E FÓMULAS QUÍMICAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Alcoxil</b>	RO
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de Adenosina
<b>Ânion superóxido</b>	$O_2^{\cdot-}$
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance (Análise de Variância)
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>BH<sub>4</sub></b>	5, 6, 7, 8 Tetraidrobiopterina
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>Cav-1</b>	Caveolina 1
<b>CEPA</b>	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
<b>COBEA</b>	Conselho Brasileiro de Experimentação Animal
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>CTX</b>	Caribdotoxina
<b>DAG</b>	1,2 Diacilglicerol
<b>DDK</b>	Dihidro-5,6-Dehidrokavaina
<b>DK</b>	5,6-Dehidrocavaina
<b>DOCA-sal</b>	Sal de Acetato de Desoxicorticosterona
<b>e.p.m.</b>	Erro padrão da média
<b>EAAz</b>	Extrato Aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i>
<b>EAz</b>	Extrato hidroalcoólico de folhas de <i>A. zemberet</i>
<b>EC<sub>50</sub></b>	Resposta igual a 50 % do seu efeito máximo
<b>EDHF</b>	Fator de Hiperpolarização Derivado do Endotélio
<b>DPPH</b>	1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl
<b>EETs</b>	Ácidos Epoxieicosatrienoicos
<b>eNOS</b>	Sintase do Óxido Nítrico endotelial
<b>ET- (1, 2 ou 3)</b>	Endotelina - (1, 2 ou 3)
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavina Adenina Dinucleotídeo
<b>FMN</b>	Flavina mononucleotídeo
<b>GC</b>	Guanilato Ciclase
<b>GCs</b>	Guanilato Ciclase solúvel
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de Guanosina

<b>GTP</b>	Trifosfato de Guanosina
<b>Hidroperoxil</b>	HO <sub>2</sub>
<b>Hsp90</b>	Proteína de choque térmico
<b>i.v.</b>	intravenoso
<b>IbTX</b>	Iberiotoxina
<b>IC</b>	Iniciação Científica
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória média
<b>IP3</b>	Inositol 1, 4, 5 trifosfato
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canais de potássio dependente de ATP
<b>L-NA</b>	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginina
<b>L-NAA</b>	NG-Amino-L-Arginina
<b>L-NAME</b>	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginina Metil Éster
<b>L-NIO</b>	N-Imino-Etil-L-Ornitina
<b>L-NMMA</b>	N <sup>G</sup> -Monometil-L-Arginina
<b>MAP</b>	Pressão Arterial Média
<b>MLCK</b>	Quinase da Cadeia Leve da Miosina
<b>MnTMPyP</b>	Mn(III)Tetrakis(1-Methyl-4-Pyridyl) Porphyrin Pentachloride
<b>MVB</b>	Leito Vascular Mesentérico
<b>NADPH</b>	Adenina Nicotinamida Dinucleotídeo Fosfato
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>nNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase neuronal
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>NOS</b>	Sintase do Óxido Nítrico
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>ODQ</b>	1H-[1, 2, 4] Oxadiazolo [4,3-a] Quinoxalina-1-one
<b>OEAz</b>	Óleo Essencial de <i>A. zerumbet</i>
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PAF</b>	Fator de Ativação de Plaquetas
<b>PEG-catalase</b>	Polyethylene-glycol-catalase
<b>PEG-SOD</b>	Polyethylene-glycol-SOD
<b>Peróxido de hidrogênio</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Peroxil</b>	RO <sub>2</sub>

<b>PGG2</b>	Prostaglandina G2
<b>PGH2</b>	Prostaglandina H2
<b>PGI2</b>	Prostaciclina-2
<b>PI3-K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase)
<b>PKA</b>	Proteína Quinase dependente de cAMP (Proteína Quinase A)
<b>PKB</b>	Proteína Quinase B (AKT)
<b>PKG</b>	Proteína Quinase dependente de cGMP (Proteína Quinase G)
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PP2</b>	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-( <i>t</i> -butyl) pyrazolo[3,4- <i>d</i> ]pyrimidine
<b>Ppm</b>	Partes por milhão
<b>Radicais hidroxila</b>	OH <sup>·</sup>
<b>EROs</b>	Espécies Reativas do Oxigênio
<b>SNP:</b>	Nitroprussiato de Sódio
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TXA2</b>	Tromboxana A2
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>VSMC</b>	Células Musculares Lisas Vasculares



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	ENDOTÉLIO.....	18
<b>1.1.1</b>	<b>Fatores de relaxamento derivados do endotélio.....</b>	<b>19</b>
1.1.1.1	Óxido nítrico.....	19
1.1.1.2	Prostaciclina.....	20
1.1.1.3	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio.....	21
<b>1.1.2</b>	<b>Fatores vasoconstritores derivados do endotélio.....</b>	<b>24</b>
1.1.2.1	Prostaglandinas (PGH <sub>2</sub> e Tromboxanas).....	24
1.1.2.2	Endotelina (ET).....	25
1.1.2.3	Espécies reativas do oxigênio (Ânion superóxido).....	26
<b>1.1.3</b>	<b>Regulação da atividade da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS; NOS III) e sua localização subcelular.....</b>	<b>28</b>
1.1.3.1	Mecanismo clássico da ativação da eNOS através da estimulação de receptores cognatos.....	28
1.1.3.2	Interação Caveolina/eNOS modula a atividade da eNOS.....	29
1.1.3.3	Inibição da eNOS por agonistas específicos.....	30
<b>1.1.4</b>	<b>Fisiologia da contração muscular lisa vascular.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Fisiologia do relaxamento da musculatura lisa vascular.....</b>	<b>32</b>
1.2	<i>Alpinia zerumbet</i> .....	33
<b>1.2.1</b>	<b>Descrição botânica e distribuição geográfica .....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Sinonímia da <i>Alpinia zerumbet</i> (nome popular).....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Uso popular da planta <i>A. zerumbet</i> na medicina popular.....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Atividades farmacológicas apresentadas pelos extratos e óleos essenciais:</b>	<b>36</b>
1.2.4.1	Antioxidante.....	36
1.2.4.2	Diurética.....	37
1.2.4.3	Espasmolítica e miorelaxante.....	37
1.2.4.4	Inibição da agregação plaquetária e efeito antitrombótico.....	38
1.2.4.5	Efeito no sistema cardiovascular.....	38
<b>1.2.5</b>	<b>Outras atividades farmacológicas apresentadas pelos extratos e óleos essenciais:.....</b>	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA/JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>

<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>45</b>
4.1	MATERIAIS.....	45
<b>4.2.1</b>	<b>Reagentes.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Aparelhos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Software.....</b>	<b>46</b>
4.2	MÉTODOS.....	47
<b>3.2.1</b>	<b>Comitê de Ética.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Animais .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Material vegetal.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Obtenção do extrato a partir das folhas pulverizadas de <i>A. zerumbet</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Preparações dos anéis da aorta de ratos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Montagem dos anéis aórticos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Avaliação do vasorrelaxamento dos anéis aórticos induzidos pelo extrato de <i>Alpinia zerumbet</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.8</b>	<b>Preparação dos anéis aórticos sem endotélio.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.9</b>	<b>Investigação da participação das vias relacionadas ao relaxamento da aorta de rato com endotélio intacto ou desprovido de endotélio pela ação de antagonistas do extrato de <i>A. zerumbet in vitro</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.10</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO RELAXAMENTO DA AORTA TORÁCICA DE RATO <i>in vitro</i> INDUZIDO PELO EXTRATO DE <i>A. zerumbet</i> .....	53
<b>5.1.1</b>	<b>Efeitos do EAAz na tensão isométrica do músculo liso vascular com endotélio intacto.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Efeitos do EAAz na tensão isométrica do músculo liso vascular com ausência de endotélio.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Investigação dos possíveis mecanismos de ação vasorrelaxante do EAAz através do uso de inibidores específicos das vias de transdução de sinal envolvendo o endotélio e músculo liso subjacente.....</b>	<b>55</b>

5.1.3.1	Papel da eNOS no relaxamento mediado pelo NO e induzido pelo EAAz.....	55
5.1.3.2	Papel da guanilato ciclase no relaxamento mediado pelo NO e induzido pelo EAAz.....	57
5.1.3.3.	O papel das EROs no relaxamento mediado pelo NO e induzido pelo EAAz..	57
5.1.3.4	O EAAz induz uma fosforilação redox sensível de PI3 quinase, Src quinase e da eNOS nas células endoteliais.....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ENDOTÉLIO

O endotélio é uma monocamada de células derivadas do mesoderma embrionário que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos do sistema cardiovascular incluindo as artérias, veias e câmaras do coração (endocárdio) (ARNAL et al., 1999; VAN HINSBERGH, 1997; LAROIA et al., 2003).

O endotélio normal contribui para a regulação local do tônus vasomotor (WENNMALM, 1994) e manutenção de uma superfície não trombogênica que impede a aderência de plaquetas (LÜSCHER; VANHOUTTE, 1989). Age como uma barreira seletiva controlando a permeabilidade, transporte de solutos e macromoléculas (MANN et al., 2003). Está envolvido com os fenômenos da angiogênese (CROSS et al., 2003), ateroma (ROSS, 1999), metástases de células cancerígenas (PAULI et al., 1990; SHESKI et al., 1999), coagulação, fibrinolises (MICHELS, 2003; CHIEN et al., 1984) e resposta inflamatória (MUTUNGA et al., 2001). Ajuda a metabolizar vários fatores circulantes no sangue ou localmente gerados, inibe a proliferação das células do músculo liso vascular subjacente (GEWALTING; KOJDA, 2002; SCOTT-BURDEN; VANHOUTTE, 1993), regula a adesão (SPRINGER, 1994) e tráfego de linfócitos (KAPLANSKI et al., 1994; BAHRA et al., 1998). O endotélio é capaz de produzir e liberar substâncias benéficas, como o óxido nítrico (NO), fatores antioxidantes (enzima superóxido dismutase) e substâncias anti-inflamatórias, tais como heparanas, prostaciclina e peptídeos natriuréticos. As muitas propriedades exibidas pelo endotélio devem-se a sua habilidade de atuar como um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo humano, respondendo a vários estímulos hemodinâmicos e humorais (VANHOUTTE, 1997), produzindo e secretando um grande número de compostos metabolicamente ativos, além de modular ou inibir os efeitos de substâncias circulantes (VANE et al., 1990; VRINTS; HERMAN, 1991; MOLHO-SABATIER, 1987) essenciais para a manutenção da homeostasia vascular.

O tônus vascular é influenciado por fatores relaxantes e constrictivos liberados pelo endotélio (DAVIGNON; GANZ, 2004; VANHOUTTE; KATUSIC, 1989; VANE et al., 1990).

### 1.1.1 Fatores de relaxamento derivados do endotélio

Os fatores vasodilatadores derivados do endotélio são prostaciclina, NO e fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF) (VANE; BOTTING, 1991; FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; GAO; LEE, 2005; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1996).

#### 1.1.1.1 Óxido nítrico

O NO é um radical livre gasoso e incolor, seu tempo de meia vida varia de 3 a 60 segundos, podendo ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio onde está sendo liberado (KANNER; HAREL, 1991; NATHAN, 1992). É rapidamente oxidado pelo oxigênio a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (ARCHER, 1993; KIECHELE; MALINSKI, 1993). No endotélio vascular o NO é formado em uma reação onde L-arginina é convertida em L-citrulina por intermédio da ação da enzima constitutiva óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (PALMER et al., 1988; DORIT et al., 1991, ARNAL et al., 1999; COLEMAN, 2001). Esta reação utiliza adenina nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ), provavelmente, envolve o complexo heme da NOS, e a flavina adenina dinucleotídeo ( $\text{FADH}_2$ ) flavina mononucleotídeo (FMN) e a 5, 6, 7, 8 tetraidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) são utilizados como cofatores na reação (MARLETTA, 1994; Marletta et al., 1988; Álderton et al., 2001; HARRIS et al., 2001).

O NO sintetizado pela eNOS é uma pequena molécula que é solúvel em ambas as fases aquosa ou lipídica, permitindo sua difusão rápida do local de sua origem até o tecido alvo (GOSS, 1999; MONCADA et al., 1991; WELCH; LOSCALZO, 1994).

O NO liberado por células endoteliais difunde-se para as fibras musculares lisas vascular subjacentes, onde vai interagir com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) acarretando uma alteração na conformação desta enzima, tornando-a ativa (LUCAS et al., 2000; IGNARRO, 1992; WALDMAN; MURAD, 1988) e aumentando assim as taxas de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que é formado a partir de trifosfato de guanosina (GTP) (IGNARRO, 1989; DUSSE et al., 2003). O GMPc, por sua vez, estimula a quinase dependente de GMP cíclico (PKG) promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular por diversos mecanismos (RAPAPORT et al., 1983; FORSTERMANN et al., 1986). Portanto o NO é um poderoso vasodilatador (FURCHGOTT; ZAWADZKI 1980; MONCADA et al., 1991).

O NO além de inibir a proliferação de células musculares lisas, inibi a adesão e agregação plaquetárias (VANE, 1991; MONCADA et al., 1991). Desta forma as plaquetas não agregam entre si, e não aderem ao endotélio vascular (KATSUKI et al., 1977). Inibi a divisão celular, mecanismos de ativação leucocitária e produção de matriz extracelular estimuladas por endotelina-1 (ET-1) e Ang II. Também é capaz de estimular apoptose (POLLMAN et al., 1996) efeito este dependente de GMPc (RIZVI; MYERS, 1997; POLLMAN et al., 1996).

O NO pode ser liberado espontaneamente ou mediante reação enzimática através de nitrovasodilatadores, como nitroprussiato de sódio (SNP) e nitrato de isossorbida (MONCADA; HIGGS, 1993; RADOMSKI et al., 1991).

#### 1.1.1.2 Prostaciclina

A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) é uma prostaglandina bicíclica primária produzida pelas células endoteliais exercendo um papel importante na homeostase vascular como resultado de seu potente efeito vasodilatador e antitrombótico (VANE; BOTTING, 1995). Assim, a prostaciclina funcionalmente opõe-se aos efeitos da TXA<sub>2</sub> sendo capaz de inibir especificamente a ativação plaquetária e proliferação vascular induzida por TXA<sub>2</sub> após lesão vascular (CHENG et al., 2002; LEVAL et al., 2004).

Em condições fisiológicas a PGI<sub>2</sub> é um eicosanoide derivado do ácido araquidônico, o qual é liberado dos fosfolípidios da membrana endotelial pela fosfolipases ativadas, A<sub>2</sub> e C. Este é convertido nos endoperóxidos cíclicos prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) e prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) por ação da enzima ciclooxigenase (COX). A PGH<sub>2</sub> sob ação da prostaciclina sintase, origina nas células endoteliais as prostaciclina (NEEDLEMAN et al., 1986; VANHOUTTE, 1999; KATSUYAMA et al., 1994; NAMBA et al., 1994; LIM et al., 1997; SMITH et al., 2000). A enzima prostaciclina sintase está localizada no retículo endoplasmático das células endoteliais e membrana plasmática e nuclear de células musculares lisas VSMC (SPISNI et al., 2001). A geração de PGI<sub>2</sub> na parede vascular está principalmente associada ao endotélio, embora possa ocorrer também no músculo liso adjacente. Estímulos mecânicos ou químicos da membrana celular, como pressão pulsátil, bradicinina, trombina e ACh, estimulam a geração de PGI<sub>2</sub> na célula endotelial (VANE; BOTTING, 1991).

A PGI<sub>2</sub> age na superfície celular em receptores específicos (IP) acoplados a proteína G<sub>s</sub> que ativa adenilato ciclase, resultando na geração de AMPc (Monofosfato cíclico de Adenosina) intracelular em células de músculo liso vascular subjacente e plaquetas, estimulando a PKA na musculatura lisa vascular promovendo intensa vasodilatação e anti-agregação plaquetária (BOIE et al., 1994; KATSUYAMA et al., 1994; NAKAGAWA et al., 1994; KUKOVETZ et al., 1979; MONCADA et al., 1978; WISE; JONES, 1996; LAWLER et al., 2001). A PKA exerce efeito similar à PKG, causando a saída de Ca<sup>2+</sup> do citosol e inibindo a maquinaria contrátil.

Na maioria dos vasos sanguíneos a contribuição da PGI<sub>2</sub> para o relaxamento dependente do endotélio é negligenciável, e seu efeito é essencialmente aditivo ao do NO (MONCADA; VANE, 1979). Apesar de PGI<sub>2</sub> e NO, também, compartilham os mesmos efeitos vasculares em termos de vasodilatação e inibição da função das plaquetas e leucócitos, o mecanismo de ação é bastante diferente, com PGI<sub>2</sub> agindo nos receptores acoplados à proteína G na superfície celular que ativam a adenilato ciclase, resultando na geração de AMPc (KUKOVETZ et al., 1979).

#### 1.1.1.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

O relaxamento dependente do endotélio de VSMC evocado por uma série de agonistas, incluindo colinomiméticos e substância P, é muitas vezes acompanhada por um aumento (repolarização e/ou hiperpolarização) no potencial de membrana. Esta mudança parece predominantemente refletir a ação de um EDHF difusível que é distinto do NO (fator relaxante derivado do endotélio) e da prostaciclina (LUKSHA et al., 2009; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1988; VANHOUTTE, 1996).

As células endoteliais liberam esse fator (EDHF) que regula a abertura de canais de potássio e diminui a concentração de Ca<sup>2+</sup> no interior da musculatura lisa vascular resultando em vaso dilatação (GARLAND; MCPHERSON, 1992; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1996). O tipo de canal de potássio ativado ainda não está completamente elucidado, mas canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> parecem estar envolvidos (VANHOUTTE; FÉLÉTOU, 1999). O relaxamento induzido por esse fator ocorre sem elevação dos níveis intracelulares de GMPc e de AMPc nas células musculares lisas e não é bloqueado pelos inibidores da ação do NO (MOMBOULI; VANHOUTTE, 1997; TAYLOR et al., 1988; MOMBOULI et al., 1992; GARCIA-PASCUAL et al., 1995).

Alguns estudos apontam que o aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  endotelial desencadeia a síntese dos ácidos epoxieicosatrienóicos, metabólitos do ácido araquidônico derivados da citocromo P450 monooxigenase que é resistente a inibidores da COX e da NOS, como sendo o EDHF (CAMPBELL et al., 1996; POPP et al., 1999; BOLOTINA et al., 1994; NAGAO; VANHOUTTE, 1992; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1996; GARLAND; MCPHERSON, 1992; FLEMING; BUSSE, 2006; FLEMING, 2000). O íon  $K^+$  também pode ser considerado como EDHF, o mesmo é liberado a partir de células endoteliais via canais  $K_{Ca}$ , induz hiperpolarização da musculatura lisa pela ativação de canais de  $K^+$  e/ou  $Na^+-K^+-ATPase$  em células musculares lisas vasculares (MCGUIRE et al., 2001). Outros estudos sugeriram que nas artérias mesentérica e coronária de rato, o EDHF seria a anandamida (RANDALL et al., 1996; RANDALL; KENDALL, 1997; RANDALL et al., 1997) um derivado do ácido araquidônico suspeito de ser o ligante endógeno dos receptores canabinóides CB1 (DI MARZO et al., 1994; NIEDERHOFFER; SZABO, 1999). Finalmente, várias outras moléculas como monóxido de carbono, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MATOBA; SHIMOKAWA, 2003; STONE; YANG, 2006) também foram descritas como tendo efeitos hiperpolarizantes dependentes do endotélio vascular. Atualmente, evidências experimentais favorecem a explicação de que a hiperpolarização da célula endotelial pode ser transmitida ao longo da monocamada de células endoteliais ou para as células musculares lisas adjacentes através das junções gap (GRIFFITH, 2004). E é mais provável que íons  $K^+$  e junções gap podem estar envolvidos no relaxamento mediado pelo EDHF simultaneamente ou atuando sinergicamente (NILIUS; DROOGMANS, 2001; GRIFFITH, 2004; FELETOU; VANHOUTTE, 2006).

Após a estimulação das células endoteliais com um agonista que ativa os receptores acoplados à proteína G como a Ach ou bradicinina, há um aumento transitório na  $[Ca^{2+}]_i$ , o que leva à ativação dos canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$  (“SKCa” canais KCa de baixa condutância sensíveis à apamina, e “IKCa” canais de condutância intermediária, BKCa canais de alta condutância e alguns canais de  $K^+$  de voltagem-dependentes que são sensíveis a CTX) que resulta na efluxo e acúmulo de  $K^+$  no espaço mio-endotelial provocando a hiperpolarização da membrana dos miócitos (LÜCKHOFF et al., 1988; JOHNS et al., 1988) pela ativação dos canais  $K_{IR}$  e/ou  $Na^+-K^+-ATPase$  (NELSON; QUAYLE, 1995; PRIOR et al., 1998), e também pode ativar várias enzimas, incluindo a fosfolipase (PLipase), que libera o ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolipídios de membrana (PLs). A ativação subsequente do citocromo P450 epoxygenase (CYP2C) resulta na geração de EETs (ácidos



epoxieicosatrienoicos) (FLEMING et al., 2001), que por sua vez, afetam a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  dos canais ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e a geração de AMPc pela adenilil ciclase (AC), bem como o acoplamento juncional gap nas células endoteliais (POPP et al., 2002). EETs e/ou seus metabólitos difundem-se para células musculares lisas e ativam canais de grande condutância  $\text{KCa}$  (canais  $\text{BKCa}$ ), que são sensíveis a iberitoxina (IbTX). O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  endotelial pode ser gerado de uma forma independente de receptor (por exemplo, ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , o ácido ciclopiazônico e a apsigargina inibidores  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (ILLIANO et al., 1992; FUKAO et al., 1995; CHEN; SUZUKI, 1990).

Para prevenir a hiperpolarização das células endoteliais atribuída ao EDHF, utiliza-se a combinação de CTX e apamina que bloqueiam as alterações posteriores no potencial de membrana do músculo liso (EDWARDS et al., 1998; EDWARDS et al., 2000; DOUGHTY et al., 1999),  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e tonus (na presença de inibidores da COX e da NOS).

A participação relativa de cada mecanismo certamente depende de vários parâmetros, incluindo o estado de ativação do músculo liso vascular, a densidade das junções gap mio-endotelial (BUSSE et al., 1988), o nível da expressão do citocromo P450 (HAYABUCHI et al., 1998) e das isoformas apropriadas de canais  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  e/ou  $\text{K}_{\text{IR}}$  (NELSON; QUAYLE, 1995; PRIOR et al., 1998).

A contribuição da hiperpolarização no relaxamento vascular dependente do endotélio varia de acordo com o tamanho das artérias e é proeminente em pequenas artérias de resistência (CAMPBELL et al., 1996; NAKASHIMA et al., 1993) do que nas largas artérias (URAKAMI-HARASAWA et al., 1997). Enquanto que em artérias de condução largas semelhantes à aorta, tanto o NO e o EDHF parecem contribuir para o relaxamento, com o NO sendo de influencia predominante sob circunstâncias normais (SHIMOKAWA et al., 1996). Nestas artérias, se a síntese de NO é inibida, EDHF pode mediar o relaxamento dependente do endotélio próximo ao normal (VANHOUTTE, 1996; KILPATICK; COCKS, 1994).

A respectiva importância do NO, EDHF e prostaciclina varia entre as espécies, leitos vasculares e o estímulo farmacológico ou fisiológico usado (COHEN; VANHOUTTE, 1995).

### 1.1.2 Fatores vasoconstrictores derivados do endotélio

Dentre os fatores vasoconstrictores derivados do endotélio nós podemos citar: angiotensina II, endotelina (ET), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), PGH2 e TXA2 (MONCADA; VANE, 1979; VANE; BOTTING, 1991; NOLLY et al., 1994; FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; GAO; LEE, 2005; LÜSCHER et al., 1993).

#### 1.1.2.1 Prostaglandinas (PGH2 e Tromboxanas)

As prostaglandinas juntamente com os tromboxanos e prostaciclina formam a classe dos prostanóides (subclasse dos eicosanóides) derivados do ácido graxo insaturado (ácido araquidônico; 20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$ ). Esses prostanóides são sintetizados em resposta a estímulos através de agonistas que se ligam a receptores da membrana endotelial acoplados a proteína G. A partir desta etapa a fosfolipase A é ativada hidrolisando os fosfolipídios da membrana (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), liberando assim, o ácido araquidônico, que é então utilizado como substrato para as vias enzimáticas das cicloxigenases (COX-1 e possivelmente a COX-2) juntamente com endoperoxidases, que sintetizam as PGH2 em resposta a um aumento da  $Ca^{2+}$  intracelular (SMITH et al., 2000; NARUMIYA et al., 1999; FUNK, 2001).

A ciclooxygenase endotelial(s) (COX-1 e, possivelmente, COX-2) catalisam as mesmas reações em 2 sítios diferentes, ou seja, uma atividade ciclooxygenase na qual duas moléculas de oxigênio são adicionadas ao ácido araquidônico para formar um endoperóxido bicíclico com um grupo adicional hidroperóxido na posição 15 formando a PGG2. O hidroperóxido é então reduzido por uma peroxidase acoplada funcionalmente para formar a PGH2 (SMITH et al., 2000; BROOKS et al., 1999).

A tromboxano A sintase catalisa a produção de TXA2 a partir de PGH2 (FLOWER, 2003). A PGH2 é um intermediário instável a partir do qual todos outros prostanóides são derivados (PGE2, PGF2a, PGD2, PGI2, e TXA2) por uma variedade de diferentes reações enzimáticas (SAMUELSSON et al., 1978). A TXA2 tem sido mais extensivamente caracterizada por seu papel na modulação da função hemodinâmica e cardiovascular (HIRATA et al., 1994; MITSUI et al., 1997). Estas enzimas estão relacionadas ao grupo do citocromo P450 de proteínas e estão localizados na face citosólica do retículo endoplasmático

O mais proeminente expoente da vasoconstrição mediada por prostanóides são PGH<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> (POHL et al., 1986; CHESEBRO et al., 1989). Esses dois prostanóides (TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>) são especialmente importantes e têm funções essenciais, mas opostas na manutenção da homeostase vascular. TXA<sub>2</sub> é sintetizada principalmente em plaquetas (que expressam apenas COX-1), a produção é reforçada durante a ativação plaquetária, e promove a agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação de músculo liso, mesmo que tenha uma meia-vida de apenas 20-30 segundos. Em contraste, a prostaciclina é o principal produto das macro-células endoteliais vasculares atuando como um potente vasodilatador que inibe a agregação plaquetária e proliferação de células musculares lisas.

Em algumas circunstâncias fisiopatológicas (hipoxia, anoxia, pressão arterial elevada), fatores vasoconstritores derivado do endotélio podem ser liberados e contribuir para o efeito paradoxal vasoconstritor. Por outro lado, em condições fisiológicas normais pequenas quantidades de prostanóides vasoconstritores (endoperoxidos cíclicos) como PGH<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> são também formadas, porém, em condições fisiológicas, seus efeitos são inibidos pelo efeito vasodilatador da prostaciclina, NO e do EDHF (MONCADA;VANE, 1979; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999; LEVAL et al., 2004).

Os efeitos fisiológicos das prostaglandinas são mediados em parte por receptores endoperoxidos-tromboxana A<sub>2</sub> (TP) acoplados a proteína G tipo G<sub>q</sub> (BREYER et al., 2001; HIRATA et al., 1994b; MITSUI et al., 1997; HIRAI et al., 2001; SHENKER et al., 1991), levando à ativação da PLC e conseqüente geração de IP<sub>3</sub>/DAG (1,2-diacilglicerol), resultando na ativação em cascata de proteínas quinases, e elevação de cálcio intracelular. (HIRATA et al., 1994b; MITSUI et al., 1997).

#### 1.1.2.2 Endotelina (ET)

A endotelina-1 (ET<sub>1</sub>) é um dos mais potentes peptídeos vasoconstritores conhecidos, produzidas e liberadas principalmente pelas células endoteliais (GRAY; WEBB, 1996). Existem três tipos de ET, mas células endoteliais vasculares produzem apenas a ET-1 e endotelina-2 (ET-2) (PLUMPTON et al., 1993; INOUE et al., 1989). O peptídeo vasoconstritor ET apresenta efeito acentuado sobre tônus vascular. ET-1 ativa os receptores ET acoplados a proteína G, que elevam o cálcio intracelular através da via PLC (RIDKER et al., 2002; VAN RENTERGHEM et al., 1988). As células musculares lisas expressam ambos os subtipos dos receptores (ETA e ETB) (SHIMOKAWA; TAKESHITA, 2005).

ET-1 exerce ações vasoconstritora através da estimulação de receptores ETA no músculo liso vascular e ações vasodilatadora através da estimulação de receptores ETB em células endoteliais. No entanto, os receptores ETB também contribuem para a vasoconstrição em alguns vasos sanguíneos (GARDINER et al., 1994; TEERLINK et al., 1994). O subtipo ETA apresenta maior afinidade para ET-1, é expresso principalmente em células dos músculos liso vascular e cardíaco, enquanto o subtipo ETB, com afinidade para as três isoformas de ET, é expresso em células endoteliais, renais e também no músculo liso vascular (ARAI et al., 1990; SAKURAI et al., 1990).

Há considerável cross-talk entre a ET, NO e prostaciclina no controle do tônus vascular (LAVALLEE et al., 2001).

Normalmente, os níveis circulantes de ET, bem como a produção do peptídeo em vasos sanguíneos isolados, são relativamente baixos, sugerindo que em condições fisiológicas pouca ET seja produzida, devido à ausência de estímulos e/ou à presença de mecanismos inibitórios potentes. Sabe-se, também, que a maior parte da ET é liberada abluminalmente, ou seja, diretamente nas células musculares lisas, e não na luz dos vasos, atuando mais como agente autócrino e parácrino que como hormônio endócrino (LÜSCHER et al., 1993; LEVIN, 1995; GARY, 1995).

Na membrana do músculo liso vascular a ET se liga ao receptor acoplado a proteína Gq ativando a PLC, que hidrolisa fosfatidil-inositol da membrana celular, liberando IP3 e acúmulo de DAG. As moléculas de IP3 e DAG promovem elevação dos níveis intracelulares de cálcio armazenado e ativam a proteína cinase C (PKC) (SIMONSON et al., 1990; VANE et al., 1990) ocorrendo subsequentemente um aumento sustentado de  $[Ca^{2+}]_i$ , resultando em vasoconstrição (SIMONSON et al., 1990).

### 1.1.2.3 Espécies reativas do oxigênio (anión superóxido)

Em condições fisiológicas, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em uma maneira controlada em baixas concentrações e funcionam como moléculas sinalizadoras regulando contração-relaxamento e crescimento das VSMC (ZAFARI et al., 1998; TOUYZ; SCHIFFRIN, 1999; NOHL et al., 2003).

As EROs consistem principalmente de radicais livres oxigenados: anión superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $OH^\cdot$ ), peroxil ( $RO_2$ ), alcoxil ( $RO$ ) e hidroperoxil ( $HO_2$ ) (GULÇIN et al., 2003). Esses radicais livres oxigenados podem ser convertidos a outras

espécies reativas não radicais, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Assim as EROs incluem espécies radicais e não radicais (FANG et al., 2002; USHIO-FUKAI; NAKAMURA, 2008) que são essenciais em várias vias de sinalização envolvidas em processos celulares.

O ânion superóxido pode inibir as três principais vias vasodilatadoras dependente do endotélio, ou seja, NO, prostaciclina e EDHF. Anion superóxido não só reduz a bioviabilidade de NO, mas também inibi diretamente seu alvo principal, GCs (MUNZEL et al., 2005; PRICE et al., 2000; RUBANYI; VANHOUTTE, 1986). Altas concentrações de NO, particularmente quando misturado com superóxido derivado o NAD(P)H oxidase pode gerar  $\text{ONOO}^-$  altamente tóxicos (LIZASOAIN et al., 1996; RIOBO et al., 2001). Neste caso o  $\text{O}_2^-$  atua como agente redutor, doando o seu elétron extra ao NO para formar  $\text{ONOO}^-$  (BECKMAN *et. al.*, 1994) um potente oxidante também capaz de oxidar grupos sulfidrila, bem como nitração e hidroxilação de grupos aromáticos, incluindo tirosina, triptofano, e guanina (ZOU et al., 2004). É muito difusível dentro e entre as células *in vivo*. Além disso  $\text{ONOO}^-$ , inibe a GC, inativa a prostaciclina sintetase por nitração da tirosina (MUNZEL et al., 2004; ZOU et al., 2004). O radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) pode ser gerada continuamente por diferentes processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, através enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase, ciclo-oxigenases, sintases do NO, citocromo P450 monooxigenases) (CHANCE et al., 1979; HILENSKI et al., 2004; LYLE; GRIENDLING, 2006; WOLIN et al., 2005; KUKREJA et al., 1986; MUELLER et al., 2005) em praticamente todos os tipos de células, incluindo músculo liso vascular e células endoteliais. O radical livre superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) espontaneamente ou enzimaticamente é reduzido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela superóxido dismutase (SOD) através de dismutação (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença da enzima catalase ou glutathiona peroxidase é então convertida em água e oxigênio (CHANCE, 1950).

A atividade dos canais de potássio ativados por cálcio envolvidos na resposta mediada por EDHF é diminuída pela ação crônica de ânion superóxido (KUSAMA et al., 2005). Além disso, as EROs promovem a contração das VSMC, facilitando a mobilização de cálcio e aumentando a sensibilidade das proteínas contráteis aos íons cálcio (JIN et al., 1991; SUZUKI; FORD, 1992).

### 1.1.3 Regulação da atividade da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS, NOS III) e sua localização subcelular

A enzima e-NOS é um homodímero, onde cada monômero contém um domínio redutase e um heme oxigenase (GARCIN et al., 2004; STUEHR et al., 2004). A eNOS é uma enzima dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM ativada por um aumento dos níveis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta ao agonista dependente ou independente de receptor (VENEMA et al., 1996; SMART et al., 1999; SANDERS et al., 2000). A atividade enzimática da eNOS é regulada por seis mecanismos pós-tradução: inclusão de lipídios, ativação das isoformas constitutivas cálcio/calmodulina dependente (mecanismo clássico), tensão de cisalhamento (shear stress), interações diretas proteína-proteína, diferentes fosforilações sítio dirigidas, glicosilação, disponibilidade de substratos e cofatores (SESSA, 2004; GOVERS; RABELINK, 2001; MICHEL; FERON, 1997; BOO et al., 2006; FULTON et al., 1999).

#### 1.1.3.1 Mecanismo clássico da ativação da eNOS através da estimulação de receptores cognatos

A ativação da eNOS pode ocorrer através da estimulação de receptores específicos de membrana plasmática endotelial por vários agonistas (bradicinina, serotonina, ADP/ATP, histaminas, ACh e trombina) (De MEY; VANHOUTTE, 1980; De MEY; VANHOUTTE, 1981; VAN DE VOORDE; LEUSEN, 1983; KU, 1982). O agonista ativa os receptores das células endoteliais ligados a proteína G (LÜSCHER; VANHOUTT, 1990) a qual ativa a fosfolipase C (PLC) induzindo a liberação de um segundo mensageiro, inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) que contribui para o aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo retículo endoplasmático. O  $\text{Ca}^{2+}$  interage com a calmodulina (CaM) ativando assim a eNOS e iniciando-se a síntese do NO (FLAVAHAN; VANHOUTTE, 1990, VANHOUTTE et al., 1995, ARNAL et al., 1999; STONE; MARLETTA, 1995). Estímulos adicionais, tais como, o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), o estrogénio, esfingosina 1-fosfato (S-1-P) e bradicinina, podem se ligarem aos seus receptores cognatos e também estimular PI3K/Akt. No entanto, eles também activam a fosfolipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) para aumentar os níveis cálcio e diacilglicerol (DAG) citoplasmática. O aumento dos níveis de cálcio citoplasmáticos activa CaM, que se liga ao domínio de ligação canónica da CaM na eNOS para promover o alinhamento dos domínios oxigenase e redutase de eNOS, levando à síntese eficiente de NO.

Além disso, CaM pode activar CaM quinase II, que pode fosforilar a eNOS em S1179. Aumentos nos níveis de DAG pode ativar a PKC para fosforilar a T497, que pode regular negativamente a eNOS ou influenciar seu acoplamento (HARRIS et al., 2001; HAYNES et al., 2000; IGARASHI; MICHEL, 2001).

### 1.1.3.2 Interação Caveolina/eNOS modula a atividade da eNOS

Estudos bioquímicos fornecem evidências de que a atividade da eNOS pode ser regulada pela sua localização em cavéolas (GRATTON et al., 2004). As cavéolas são pequenas invaginações na membrana plasmática endotelial caracterizadas pela presença da proteína transmembrana caveolina-1 (cav-1) (OKOMOTO et al., 1998; ANDERSON, 1998). A localização da eNOS no espaço caveolar permite a interação apropriada da mesma com proteínas específicas envolvida na atividade e tráfego da eNOS (GARCIA-CARDENA et al., 1998; GOSH et al., 1998; JU et al., 1997).

Em muitos tecidos, a cavéola pode servir como sitio para recrutamento de moléculas de sinalização, tais como, os receptores (incluindo receptores bradicinina B2 e muscarínicos M2) proteínas G, tão bem quanto, eNOS. A presença desses receptores dentro da cavéola pode facilitar a ativação da eNOS pelo estabelecimento local de um domínio caveolar no qual as moléculas de sinalização acopladas a NOS estão na vizinhança. A segmentação da eNOS para a cavéola plasmalemal pode também influenciar a concentração local de substratos e cofatores da enzima (MCDONALD et al., 1997; VOLDSTEDLUND et al., 2001).

A formação do complexo heteromérico cav-1/eNOS na cavéola inibe tonicamente a atividade enzimática da eNOS (BUCCI et al., 2000; MICHEL et al., 1997; JU et al., 1997; OKAMOTO et al., 1997). A caveolina é um modulador chave negativo da atividade da eNOS. A eNOS na presença ou ausência de estimulação por agonista é ativa somente em sua configuração dimerica em conjunto com níveis adequados de ambos os L-arginina e tetrahydrobiopterina (GOSH et al., 1998; FRANK et al., 2003; JU et al., 1997; CRANE et al., 1998).

O efeito inibitório da cav-1 na atividade da eNOS pode ser completamente revertido por níveis elevados de  $Ca^{2+}$ /CaM, um complexo produzido após a estimulação das células endoteliais por diferentes agonistas levando a maior atividade enzimática da eNOS (MICHEL et al., 1997; GRATTON et al., 2000).

O complexo eNOS/CaM sintetiza o NO até que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular diminuir a um ponto onde a CaM dissocia da eNOS restaurando o complexo inibitório eNOS/cav-1 (FERON et al., 1998; MICHEL et al., 1997).

#### 1.1.3.3 Inibição da eNOS por agonistas específicos

Modificações químicas do grupo guanidino da L-arginina resulta em compostos análogos N-substituídos que inibem estereoespecificamente e reversivelmente todas as isoformas da NOS. Os antagonistas:  $\text{N}^{\text{G}}$ -monometil-L-arginina (L-NMMA),  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginina (L-NA),  $\text{N}^{\text{G}}$ -amino-L-arginina (L-NAA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO) e o metil éster correspondente, o (L-NAME) inibem a liberação de NO a partir de células endoteliais de anéis de aorta (MONCADA et al., 1991; CHINELLATO et al., 1998; PALMER et al., 1988). Neste caso, a inibição ocorre em graus variáveis e mecanismos distintos, porém todos envolvem a ocupação do sítio ligante para o substrato (MAYER; ANDREW, 1998; BOUCHER et al., 1999). Outra forma de impedir a ação do NO é utilizar inibidores da GC, como o ODQ (SCHRAMMEL et al., 1996; GARTHWAITE et al., 1995) ou sequestradores de NO, como a hemoglobina (MARTIN; SMITH, 1985; MARTIN et al., 1985; GRUETTER et al., 1981).

#### 1.1.4 Fisiologia da contração muscular lisa

O acoplamento excitação-contração do músculo liso pode ser de dois tipos eletromecânico e farmacomecânico. No primeiro caso (eletromecânico) a contração se origina em decorrência da despolarização da membrana, e no segundo (farmacomecânico) ocorre através da estimulação de receptores de membrana por fármacos, neurotransmissores, hormônios, autacóides, sem que haja alterações no potencial de membrana ou com apenas uma limitada despolarização. O desencadeamento da contração pode ocorrer pela combinação dos dois mecanismos (SOMLYO; SOMLYO, 1968, 1994; CASTEELS, 1980).

A contração do músculo liso é iniciada pelo aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , como resultado da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  do espaço extracelular ou liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do armazenamento intracelular (MEININGER et al., 1991; KOENIGSBERGER et al., 2005).

Seja no acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico, o mediador final é geralmente um aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma, o qual é necessário para



fosforilação das cadeias leves de miosina que desencadeará o processo contrátil. A elevação da concentração intracelular de cálcio  $[Ca^{2+}]_i$  pode ser produzida pelos seguintes eventos (CUTHBERT et al., 1994; TANSEY et al., 1994):

- Influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (canais lentos ou tipo L e canais rápidos ou tipo T) que são ativados por despolarização de membranas (NELSON; QUAYLE, 1995; SOBEY, 2001);
- O meio intracelular é mais eletronegativo que o meio extracelular favorecendo o influxo de  $Ca^{2+}$  (MISSIAEN et al., 1991);
- Troca  $Na^+/Ca^{2+}$  operando de maneira reversa (NELSON; QUAYLE, 1995);
- Inibição da bomba de  $Ca^{2+}$  ATPase;
- Canais operados por receptores específicos de membrana ou intracelulares que são ativados por fatores farmacomecânicos independente do potencial de ação (SPERELAKIS, 1993; PACAUD; LOIRAND, 1995).
- Canal para  $Ca^{2+}$  operado por estoque relacionado a entrada capacitiva  $Ca^{2+}$  (CASTEELS; DROOGMANS, 1981);
- Liberação do  $Ca^{2+}$  existente em estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático), induzida pelo cálcio ou pelo IP3 ou ambos (PUTNEY, 1986; ROSADO, 2006). Esse é o principal mecanismo de influxo de  $Ca^{2+}$  em células excitáveis e não excitáveis onde o agonista se liga a receptores de superfície celular, que ativam a PLC e induz a liberação do segundo mensageiro, IP3. O IP3, em seguida, libera cálcio do armazenamento intracelular (MINNEMAN, 1988). A CaM combina com  $Ca^{2+}$  para ativar a quinase de cadeia leve da miosina, que fosforila a cadeia leve da miosina e capacita a ocorrência da contração (TAKASHI, 2007 a, b; ARAI et al., 1990). O aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina e a capacidade da célula em produzir tensão em níveis sub-ótimos de  $Ca^{2+}$  é um mecanismo conhecido como sensibilização ao  $Ca^{2+}$ , sendo a inibição da fosfatase da miosina o principal fator que contribui para este fenômeno (SOMLYO; SOMLYO, 1994; 2000). Acredita-se que a ativação da fosfatase da miosina ocorra pela via do NO/GMPc, reduzindo a fosforilação da cadeia leve da miosina, levando à dessensibilização ao  $Ca^{2+}$  (WU et al., 1996; LEE et al., 1997). Entretanto, a base molecular para a ativação da fosfatase da miosina não é completamente entendida.

Segundo Putney (2005) após o estímulo com o IP<sub>3</sub>, a concentração de Ca<sup>2+</sup> do retículo se esgota, passando a liberar um transmissor (STIM-1) capaz de abrir os canais para Ca<sup>2+</sup> operados por estoque ocorrendo o influxo de Ca<sup>2+</sup> permitindo que o retículo estoque novamente o íon.

A contração do músculo liso vascular é um processo ativo envolvendo a interação molecular da miosina com actina desencadeado pela fosforilação da miosina.

A ligação do Ca<sup>2+</sup> com a CaM aumenta a habilidade da actina em ativar a ação Mg<sup>2+</sup> - ATPase da miosina, promovendo a quebra do ATP ligado a cabeça da miosina. Com a hidrólise do ATP, o filamento de miosina, que teve sua conformação alterada, se associa a actina, assim, é capaz de gerar a contração através da efetivação de ciclos desse fenômeno (Horowitz et al., 1996).

Na contração induzida por agonistas farmacológicos parece existir pouco envolvimento do Ca<sup>2+</sup> extracelular para iniciar a contração. Ações de tais agonistas dependem mais do Ca<sup>2+</sup> liberado de estoques intracelulares, pelo mecanismo de liberação de cálcio induzida por cálcio e também pela produção de IP<sub>3</sub> (SOMLYO, 1985; HAROOTUNIAN et al., 1991; VALDIVIA et al., 1992; STORK; COCKS, 1994).

### **1.1.5 Fisiologia do relaxamento da musculatura lisa vascular**

No músculo liso, a contração é cessada como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. O processo de relaxamento requer a diminuição da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>. O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de Ca<sup>2+</sup> para a célula, inibição da liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarco-endoplasmático e o aumento do sequestro de Ca<sup>2+</sup> para o retículo sarcoplasmático (IGNARRO et al., 1986; COHEN et al., 1999; MURAD, 2006; GEWALTIG; KOJDA, 2002) e inibição da geração de IP<sub>3</sub> (HIRATA et al., 1990), desfosforilação da cadeia leve da miosina (WEBB, 2003). Alguns mecanismos são implicados na remoção do Ca<sup>2+</sup> citoplasmáticos e envolve a recaptação do Ca<sup>2+</sup> através da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático, por vias dependentes da hidrólise de ATP. A Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase reticular, quando fosforilada, liga-se a dois átomos de Ca<sup>2+</sup>, os quais são transportados e liberados para o compartimento luminal do retículo sarcoplasmático.

O retorno das concentrações de Ca<sup>2+</sup> características do estado de repouso está essencialmente relacionada com a operacionalidade de dois sistemas de extrusão existentes no

nível da membrana plasmática: uma  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase que extrui  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando energia da hidrólise de ATP e um sistema de troca de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$  que utiliza a energia do gradiente de  $\text{Na}^+$  continuamente mantido, através da membrana, por atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase (WEBB, 2003; CARAFOLI, 1987; PHILIPSON, 1985).

Também pode ocorrer relaxamento muscular liso por hiperpolarização celular devido a abertura de canais  $\text{K}_{\text{Ca}}$  e  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Canais de potássio dependente de ATP) mediada por aumento da concentração de AMPc (ANWER et al., 1992; QUAYLE et al., 1994). Entretanto, assim como o GMPc, o AMPc também pode ser considerado capaz de diminuir a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , apresentando efeitos diretos sobre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L (REMBOLD, 1996). O mecanismo primário para a diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provocada pela elevação do AMPc é a ativação da PKG (LINCOLN et al., 1990; PAREKH; PUTNEY, 2005). A PKG pode também ativar canais de  $\text{K}^+$  induzindo hiperpolarização o que leva à vasodilatação.

O relaxamento vascular também pode ocorrer quando há um aumento do atrito exercido pelo sangue e suas células circulantes sobre a camada endotelial (shear-stress) (PYKE; TSCHAKOVSKY, 2005), levando à ativação da e-NOS e à consequente produção de NO (BUSCONI; MICHEL, 1993). Neste caso a eNOS é ativada por fosforilação que é independente do aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (AYAJIKI et al., 1996; FLEMING; BUSSE, 1999). A tensão de cisalhamento (*shear-stress*) também influencia a produção de outros agentes vasomotores endoteliais, tais como, prostaciclina (que são aumentadas) e endotelinas (que são diminuídas) (POHL et al., 1986).

Ao conjunto de respostas vasodilatadoras e vasoconstritoras a estímulos físicos como o *shear stress* e farmacológicos como a ACh, bradicinina, serotonina, substância P, SNP, noradrenalina, adrenalina, fenilefrina, entre outros, chamamos de reatividade vascular e é uma importante ferramenta para o estudo da função vascular dependente ou não do endotélio (LUZ et al., 2003).

## 1.2 *Alpinia zerumbet*

### 1.2.1 Descrição botânica e distribuição geográfica

*Alpinia zerumbet* é uma planta da família Zingiberaceae, conhecida popularmente no Brasil por colônia (CRONQUIST, 1981; MENDONÇA et al., 1991; KRESS et al., 2002;

ALBUQUERQUE; NEVES, 2004). É também citada na literatura científica com sinonímia: *Alpinia speciosa* (C. Wendl.) K. Schum, *Globba nutans* Redout, *Costus zerumbet* Pers., *Languas speciosa* (J. C. Wendl.) Small, *Renealmia nutans* Andr., *Catimbium speciosum* Holtt, *Zerumbet speciosum* J. C. Wendl, *Alpinia nutans* Rosc (LORENZI; SOUZA, 1995; MENDONÇA et al., 1991 BAILY, 1977). É uma herbácea, rizomatosa, que chega a 2 ou 3 metros de altura. Suas folhas são lanceoladas oblongas, largas, pontudas, invaginantes e brilhantes. Apresentam cápsulas subglosas de 2 cm de diâmetro, polispérmica (ALMEIDA, 1993) (Figura 01). O gênero *Alpinia* inclui um grande número de espécies aromáticas que são largamente exploradas pela medicina popular, especialmente na Ásia (MATOS, 2001; MENDONÇA et al., 1991).

Trata-se de uma espécie originária da Ásia (CRONQUIST, 1981; ALMEIDA, 1993; KRESS et al., 2002; LAHLOU et al., 2003), cultivada no Brasil principalmente como planta ornamental pela beleza de suas inflorescências (BRAGA, 1960; JOLY, 1993; CORRÊA, 1974; 1978; WINTERS, 1995.) e empregada na medicina popular e em rituais religiosos afro-brasileiros (ALBUQUERQUE; CHIAPPETA, 1994; BOTSARIS, s/d.). Expandindo-se através da África tropical até a América do Sul e Central, as suas espécies, principalmente da floresta primária, crescem em habitats sombreados ou semi-sombreados, ricos em húmus (DAHLGREN et al., 1985; TOMLINSON, 1969).

### **1.2.2 Sinonímia da *Alpinia zerumbet* (nome popular)**

A espécie, *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith, é conhecida no Brasil pelos nomes vernaculares de paco-seroca, cuité-açu, pacova (ALMEIDA, 1993) gengibre-concha (LORENZI; SOUZA, 1995), cardamomo-do-mato, cardamomo-falso, cana-do-brejo, cana-do-mato e paco-seroso (MACHADO, 1996), vindicá (FURTADO et al., 1978). Em outros países a planta é conhecida como: gettou (Japão), gengibre amarelo (Reino unido), atoumau de Martinique, Dégonflé, Grand-déglonfé (França) (PRUDENT et al., 1993).

**Figura 01** - Aspecto geral da planta *A. zerumbet* com detalhes da florescência.



Fonte: Foto cedida pelo Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Professor Titular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC-Fortaleza-CE).

### 1.2.3 Uso da planta *A. zerumbet* na medicina popular

Na medicina popular o chá das folhas de *A. zerumbet* é utilizado predominantemente como agente: diurético (LARANJA et al., 1992; ALMEIDA, 1993; CRUZ, 1965), vermífuga, depurativo, anti-histérica, estomáquica (ALMEIDA, 1993; XU et al., 1996, ITOKAWA et al., 1980) anti-hipertensivo (MENDONÇA et al., 1991), anti-espasmódica (BEZERRA et al., 2000), antipiréticos, descongestionante (TÔRRES et al., 2005), anti-inflamatória, bacteriostático, fungistático (ZOGHBI et al., 1999), laxativo, abortivo, colético, antiulcerogênico, hepatoprotetora, estomáquico (MORITA et al., 1996; ALMEIDA, 1993; CORRÊA, 1978; MATOS, 2001), carminativo (CRUZ, 1965; DI STASI et al., 1989; ALMEIDA, 1993) e no tratamento de distúrbios intestinais, hipertensão, (MATOS, 1987; PRUDENT et al., 1993; LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999), e como expectorante (TÔRRES *et. al.*, 2005).

Vale ressaltar, ainda que, comparado a 19 plantas utilizadas na medicina popular e por médicos indianos, a *A. zerumbet* apresenta um elevado conteúdo de potássio e manganês (MORAIS et al., 1995; VASCONCELOS et al., 2000).

A forma mais popular de uso da planta são as obtidas por processos de decocção e infusão das folhas (MATOS, 1987; 1988).

### 1.2.4 Atividades farmacológicas apresentadas pelos extratos e óleos essenciais:

#### 1.2.4.1 Antioxidante

O extrato de acetato de etila das folhas e sementes de *A. zerumbet* apresenta uma alta atividade antirradical livre inibindo fortemente a oxidação do  $\beta$ -caroteno e a atividade de varrimento de radical livre DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Acredita-se que essa atividade seja atribuída ao conteúdo fenólico (ácidos ferulico e p-hidroxibenzoico) (ELZAAWELY *et al.*, 2007; CHEUNG, et al., 2003). A quercetina e a rutina presentes no extrato são potentes antioxidantes (LI-YUN, 2008). A quercetina também é um potente sequestrador de radicais livres atuando como um antilipoperoxidativo e como quelante do íon ferro apenas em altas dosagens. Especulativamente, o extrato de *A. zerumbet* contém alguns compostos desconhecidos mais responsivos para quelação de ferro, possivelmente, ácidos orgânicos polihidroxílicos e policarboxílicos solúveis em água (LEE et al., 1982).

#### 1.2.4.2 Diurética

Os estudos realizados por Fonteles & Oliveira (1984 *apud* ALMEIDA 1993) revelaram resultados significativos quanto ao efeito diurético de *A. zerumbet*. Laranja et al., (1991; 1992) também observaram ligeiro aumento significativo na diurese em pacientes voluntários saudáveis sem afetar os parâmetros da função renal ou hidroeletrólítica após administrarem doses cinco vezes maiores de extratos de *A. zerumbet* do que a utilizada popularmente. O aumento significativo do volume urinário causou um decréscimo na pressão diastólica e sistólica. Segundo Mendonça (1988, 1991) o efeito diurético do chá da colônia obtido por decocção ou do extrato etanólico não foi observado em ratos.

#### 1.2.4.3 Espasmolítica e Miorelaxante

O óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAz) mostrou eficácia como um agente antiespasmódico que relaxa reversivelmente o tônus basal do músculo liso de íleo de rato. Isto pode indicar uma base fisiológica para o uso popular do gênero *Alpinia* para o tratamento de distúrbios gastrointestinais (BEZERRA et al., 2000; CRUZ, 1965; ALMEIDA, 1993, MORITA et al., 1996; MORITA et al., 1998). Em 1986 Vanderline e colaboradores utilizaram preparações de musculatura lisa do jejuno e canal deferente, musculatura esquelética do reto abdominal de sapo, diafragma de rato e verificaram que o extrato aquoso desta planta produziu inibição das contrações musculares indiretas ou induzidas por agonistas adrenérgicos e colinérgicos. Esse fenômeno ocorre através de mecanismos competitivos e não competitivo que influenciam a disponibilidade de cálcio durante o processo contrátil. Portanto, o OEAz apresenta uma forte atividade nos tecidos excitáveis tais como músculo liso (LEAL-CARDOSO et al., 2004). Estes resultados foram confirmados por Bezerra e col. (2000) ao testarem o efeito do OEAz no íleo do rato. Conforme Vanderlinde (1986) foi identificada uma ação anticolinérgica competitiva que inibe a contração muscular que ocorre pela ação do extrato aquoso de rizomas em preparações isoladas de íleo de cobaio (VIEIRA et al., 1968) e duodeno de coelho (CARLINI, 1972).

#### 1.2.4.4 Inibição da agregação plaquetária e efeito antitrombótico

A presença de 5,6-dehidrocavaina (DK) e dihidro-5,6-dehidrokavaina (DDK) no extrato de rizoma da planta *A. zerumbet* inibi a agregação e liberação de adenosina trifosfato (ATP) das plaquetas de coelho induzida por ácido araquidônico e colágeno, sem afetar a liberação induzida pela adenosina difosfato (ADP), fator de ativação plaquetária (PAF) e trombina. A inibição foi reversível e dependente da dose (TENG et al., 1990; MPALANTINOS et al., 1998; ELZAAWELY et al., 2007). O DK inibiu o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular causado pelo ácido araquidônico, mas não o aumento causado por colágeno e trombina. O DK inibiu a agregação secundária, mas não a primária induzida pelo ADP e epinefrina no plasma humano rico em plaquetas. Isso leva a concluir que a atividade antiplaqueta de ambos DK e DDK ocorre devido à inibição da formação de Tromboxana A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (TENG et al., 1990).

#### 1.2.4.5 Efeito no sistema cardiovascular

O óleo essencial e o extrato de *A. zerumbet* apresentam uma forte atividade no sistema cardiovascular (LEAL-CARDOSO et al., 2004) que induz uma redução da frequência cardíaca e da resposta inotrópica e cronotrópica do átrio isolado de rato (MENDONÇA et al. 1991; FONTELES et al., 1989; VANDERLINDE, 1990; LARANJA et al., 1992). O extrato hidroalcoólico ou aquoso de *A. zerumbet* induziu a diminuição da pressão sanguínea em ratos e cachorros (MENDONÇA et al., 1991). Segundo Lahlou et al, (2002) o tratamento intravenoso (i.v.) pela injeção em bolus do OEAz em ratos normotensos conscientes ou anestesiados resultou em hipotensão significativa e imediata com efeito dose dependente que seria atribuído a um dos constituintes do óleo essencial, o terpinen-4-ol. Em ratos conscientes ou anestesiados, a injeção intravenosa (i.v.) de doses em bolus de terpinene-4-ol dissolvido em Tween (2%) também provocou imediata diminuição da pressão arterial média com efeito dependente da dose. Portanto, a resposta hipotensiva para o terpinene-4-ol foi significativamente maior do que aquelas evocadas pelas mesmas doses do OEAz. O tempo de curso da diminuição da MAP (Pressão Arterial Média) pela ação do terpinene-4-ol foi similar a do OEAz. Esse efeito hipotensivo parece independente da presença do sistema nervoso autônomo simpático funcional, já que ele não é afetado pela injeção intravenosa de hexametônio. Sugerindo que o óleo essencial pode ser um agente vaso relaxante direto. Em



ratos anestesiados o OEAz diminuiu a taxa cardíaca apenas em doses maiores ou iguais a 10 mg/kg, enquanto mudanças desse parâmetro não foram uniformes em ratos conscientes. A resposta hipotensiva para o OEAz foi de mesma ordem de magnitude ou duração, independente se o animal estava consciente ou sob anestesia geral. O pré-tratamento de ratos anestesiados e vagotomizados bilateralmente não modificou significativamente a resposta bradicárdica e hipotensiva para o OEAz. Pré-tratamento i.v. de ratos não anestesiado com metilatropina ou hexametônio não apresenta efeito significativo na hipotensão induzida pelo OEAz. Assim, receptores muscarínicos vasculares que normalmente mediam a hipotensão provavelmente não estão envolvidos. Neste estudo o curso de tempo das mudanças induzidas pelo OEAz na pressão arterial média foi significativamente diferente daquela obtida com acetilcolina (ACh). De fato, apenas a hipotensão induzida pelo OEAz ainda permaneceu significativa durante um período de 5 min. pós-injeção. Em vista da observação que o tempo para o efeito hipotensivo máximo foi similar para ambos ACh e óleo essencial, é possível que o efeito hipotensivo do óleo seja mediado, no mínimo em parte, pela via óxido nítrico/L-arginina endotelial (MENDONÇA et al., 1991). Lahlou et al, (2003) investigaram a resposta hipotensiva ao tratamento i.v. com o OEAz e seu principal constituinte, terpinene-4-ol, no modelo experimental de ratos conscientes uninefrectomizados e hipertensos a base de sal acetato de desoxicorticosterona (DOCA-sal). A injeção i. v. em bolus do OEAz e terpinene-4-ol em ratos normotensos, uninefrectomizados e hipertensos diminuíram a pressão aórtica média numa relação dependente da dose. A resposta hipotensiva para o terpinene-4-ol foi significativamente maior do que aquela evocada pela mesma dose de OEAz. Indicando que o efeito hipotensivo é atribuído parcialmente ao terpinene-4-ol presente no OEAz. O tratamento com o sal DOCA reforçou significativamente a diminuição percentual máxima da pressão arterial média evocada pelo OEAz ou terpinene-4-ol. Da mesma forma, em ambos percentagem máxima e diminuição absoluta na pressão arterial média em resposta induzida pela injeção intravenosa do bloqueador ganglionar, brometo de hexametônio, foi significativamente maior em ratos hipertensos com DOCA-sal do que em ratos controle. Em ratos hipertensos com o sal DOCA, o pré-tratamento com metilatropina ou com hexametônio não afetou a hipotensão induzida pelo OEAz. O tratamento i. v. com o OEAz ou terpinene-4-ol diminuiu a pressão sanguínea dependentemente da dose em ratos conscientes hipertensos com o sal DOCA e esta ação é maior quando comparado com controles uninefrectomizados. Além disso, a diminuição da percentagem máxima da MAP induzida por OEAZ em ratos controle uninefrectomizados foram de magnitude semelhante como os relatados por Lahlou et

al, (2002) em ratos intactos normotensos. Esta intensificação em ratos hipertensos com sal DOCA estaria relacionada principalmente a um aumento no relaxamento do músculo liso vascular induzido pelo OEAz em vez da elevação da atividade do sistema nervoso simpático neste modelo hipertensivo (SANTANA, 1966; MATOS et al., 1984; LARANJA et al., 1992; MPALANTINOS et al., 1998).

O efeito vasorrelaxante do OEAz e seu principal constituinte, 1,8 cineole foi estudado por Pinto et al, (2009). Em preparações aórticas isoladas de ratos, o OEAz induziu uma redução parcial significativa da contração reversível evocada por fenilefrina, um efeito que foi abolido pela remoção do endotélio vascular. Utilizando-se o 1,8 cineole na mesma concentração do extrato induziu-se um efeito vasorrelaxante reversível completo que foi significativamente reduzido em anéis desnudados de endotélio. Nem o OEAz nem o 1,8 cineole afetaram o tônus basal da aorta isolada. O efeito relaxante de ambos OEAz e 1,8 cineole não foi afetado pela adição de cloreto tetraetilamônio (inibidor não seletivo dos canais de potássio) ou indometacina (inibidor da cicloxigenase) no banho de órgão, mas foi significativamente reduzido por N-nitro-L- arginina metil éster [inibidor da sintase do óxido nítrico (NOS)]. Os autores concluem que o OEAz induz um potente efeito vasorrelaxante que parece totalmente dependente da integridade do endotélio vascular funcional, sugerindo que esse efeito é dependente da liberação fatores relaxantes derivados do endotélio, tais como, óxido nítrico (NO), PGI<sub>2</sub> ou fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). O efeito vasorelaxante induzido pelo EAOZ pode não ser totalmente atribuído às ações do seu principal constituinte 1,8 cineole, e parece totalmente dependente da integridade de um endotélio vascular funcional. No entanto, ao lado do envolvimento da via L-arginina/NO endotelial, a inibição de outras vias de transdução pode estar envolvida na intermediação de efeitos vasodilatadores induzidos pelo 1,8 cineole no músculo liso vascular.

De Moura et al, (2005) administraram uma injeção em bolus do extrato hidroalcoólico de folhas de *A. zerumbet* (EAz) em vasos do leito vascular mesentérico (MVB) isolados de ratos pré-contraído com norepinefrina (NE), induzindo uma vasodilatação sustentável, dependente da dose e de longa duração endotélio-dependente. A dependência do endotélio foi comprovada pela remoção das células endoteliais através do ácido deoxicólico. O efeito vasodilatador do EAz não é reduzido pela indometacina. Enquanto que a inibição da NOS por éster metil NG-nitro-L-arginina (L-NAME) e guanilato ciclase (GC) por 1H-[1, 2, 3] oxadiazolo [4, 4-a] quinoxalina-1-one (ODQ) reduz o efeito vasodilatador da AZE. Nos vasos do leito mesentérico pré-contraído com norepinefrina, o efeito vasodilatador da AZE não foi

alterado por 4-aminopiridina, glibenclamida, ou por caribdotoxina (CTX) mais apamina. A adição de atropina, pirlamina e ioimbina que reduziu significativamente o efeito vasodilatador da ACh, histamina, e clonidina respectivamente, porém não alterou o efeito vasodilatador do AZE sobre os vasos pré-contraídos com NE. Indicando que este efeito independe da estimulação de receptores ativados por ACh, histamina, e clonidina.

O HOE 140 reduziu significativamente o efeito vasodilatador da bradicinina, e induziu uma ligeira, mas significativa redução no efeito vasodilatador do AZE (de MOURA et al., 2005). A ação do HOE 140 indica que a bradicinina pode provavelmente participar do mecanismo de vasodilatação induzido pelo AZE. O efeito vasodilatador da AZE no MVB de rato pode resultar da liberação de autacóides vasodilatadores, tais como prostaciclina pelas células endoteliais porque seu análogo sintético estável iloprost que provoca vasodilatação do MVB de rato (YAMAWAKI et al., 2000) e noraepinefrina tem sido relatada a liberação de prostaciclina nesta preparação (PEREDO; ADLER-GRASCHINSKY, 2000). Portanto, no presente estudo, descobriu-se que o bloqueador da cicloxigenase, indometacina, não alterou o efeito vasodilatador da AZE, e assim, os dados atuais parecem excluir o envolvimento de prostaglandinas em seu mecanismo de ação. Uma ação antiadrenérgica do AZE parece não ocorre porque o efeito vasodilatador foi significativamente reduzido em vasos sem endotélio e contraídos com norepinefrina. Neste estudo os autores demonstraram que o AZE induziu um efeito vasodilatador dependente do endotélio que não envolve a liberação de prostanoides, receptores ativados por ACh, histamina, ou epinefrina, ou a abertura de canais KATP, Kv, ou KCa. Parte do efeito vasodilatador do AZE pode ser modulado por receptores de bradicinina B2. Provavelmente o efeito vasodilatador do AZE é dependente da ativação da via do NO-cGMP. Noutro protocolo realizado no mesmo estudo os autores avaliaram o efeito do AZE *in vivo* em ratos hipertensos unifrectomizados e tratados com sal DOCA-sal. Esses ratos foram divididos em dois grupos: ratos hipertensos unifrectomizados com sal DOCA-sal apenas e ratos hipertensos unifrectomizados com sal DOCA-sal mais AZE. Foi verificado que apenas o grupo de ratos tratado com AZE teve sua pressão arterial diminuída significativamente em relação ao outro grupo. O efeito anti-hipertensivo do AZE provavelmente não envolve a modulação do sistema renina-angiotensina porque o efeito anti-hipertensivo foi observado em ratos hipertensos com DOCA-sal, num modelo de renina-baixo de hipertensão experimental (PINTO et al., 1998). Uma ação antiadrenérgica do AZE também parece ser improvável porque o efeito vasodilatador da AZE foi significativamente reduzida nos vasos sem endotélio e contraído com norepinefrina. O efeito anti-hipertensivo do AZE poderia estar relacionada

com a presença de terpenos porque terpinen-4-ol, o principal constituinte do OEAz, diminuiu a pressão arterial de ratos hipertensos/DOCA-sal (LAHLOU et al., 2003) os flavonóides podem também ser responsáveis para o efeito anti-hipertensivo do AZE porque os produtos do vinho tinto e uva, que são ricos em flavonoides (WATERHOUSE, 2002), induzem um efeito anti-hipertensivo significativo em ratos (DE MOURA et al., 2002; DE MOURA et al., 2004).

Enquanto em humanos voluntários saudáveis a administração do extrato causou um ligeiro decréscimo na pressão diastólica e sistólica sanguínea sem afetar significativamente os parâmetros da função renal ou a taxa cardíaca após administração de doses cinco vezes maiores de extratos de *A. zerumbet* do que a utilizada usualmente (LARANJA et al., 1991). Essas informações corroboram para o uso popular de *A. zerumbet* para o tratamento da hipertensão. Segundo Matos (1999) a atividade hipotensora está validada, portanto torna-se arriscado fazer uso de *A. zerumbet* para pacientes com problemas de pressão baixa.

### 1.2.5 Outras atividades farmacológicas apresentadas pelos extratos e óleos essenciais:

**Bloqueador do potencial de ação composto do nervo ciático de rato** (LEAL-CARDOSO et al., 2004); **Inibição de tirosinases e enzimas MMP-13** (MASUDA et al., 2007); **Hipolipidêmica e Hepatoprotetor** (LIN et al., 2008); **Antiulcerogênico** (LI-YUN, 2008; MPALANTINOS et al., 1998); **Inseticida** (TAWATA et al., 1996; MIWA, 2008; CAVALCANTI et al., 2004); **Bactericida e bacteriostático** (SÁ et al., 1994; CRAVEIRO et al., 1981; DE POOTER et al., 1995; TAWATA et al., 1996; PRUDENT et al., 1993; ELZAAWELY et al., 2007, WANG; HUANG, 2005; LOBATO et al., 1989; ZOGHBI et al., 1999); **Antifúngica e fungistático** (PRUDENT et al., 1993; CRAVEIRO et al., 1981; DE POOTER et al., 1995; TAWATA et al., 1996; ZOGHBI et al., 1999); **Analgesica e anti-inflamatória** (de ARAÚJO et al., 2005; SANTOS; RAO, 2000; SANTANA et al., 1966; ZOGHBI et al., 1999; GADELHA E MENEZES, 1988); **Vermífuga** (VANDERLINDE, 1986); **Anticonvulsivante** (BEZERRA et al., 2000); **Antipirético** (MATOS, 1994); **Aromaterápica apud 2005** (MURAKAMI et al., 2005); **Herbicida** (FUJITA et al., 1994); **Hipnótica** (MENDONÇA et al., 1991; FONTELES et al., 1989; VANDERLINDE, 1990; LARANJA et al., 1992; 1991; MATOS, 1999).

## 2 RELEVÂNCIA/JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial sistêmica é um importante fator de risco para doenças cardiovascular e atua de forma linear, contínua e independente. No Brasil, apesar de não haver estudo de prevalência com representatividade nacional e com padronização adequada, os estudos localizados mostram sempre valores elevados (KANNEL et al., 1969; FUCHS, 2004; PASSOS et al., 2006). A hipertensão permanece inadequadamente gerenciada em toda parte (MANCIA et al., 2002; PASSOS et al., 2006) apesar do grande número de drogas anti-hipertensivas. Muitas pessoas em países em desenvolvimento tem pouco acesso a moderna assistência médica. Para contornar esse fato é necessária a validação das atividades farmacológica do extrato de folhas plantas *A. zerumbet* que poderia beneficiar as populações com escassez de recursos econômicos. Por exemplo, a *A. zerumbet* é uma planta utilizada popularmente no tratamento de hipertensão. Esta espécie já faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Em modelos de farmacologia pré-clínica e clínica, já foram constatadas as atividades diurética e hipotensora do chá preparado a partir de suas folhas. Nos testes pré-clínicos foi observada atividade anti-hipertensiva e nos estudos clínicos foi confirmada ação diurética. Portanto, a ação vasorrelaxante do extrato de folhas de *A. zerumbet* já é comprovada pela literatura especializada, porém os mecanismos envolvidos nesta atividade não estão bem elucidados. Assim, o estudo dos mecanismos relacionados à ação dos extratos de *A. zerumbet* envolvidos nas adaptações vasculares que ocorrem durante os processos vasoativos são de grande valia para possibilitar o uso do mesmo pela população no tratamento da hipertensão com segurança e eficácia. É importante descobrir novos produtos que produzam vasodilatação já que o relaxamento do músculo liso vascular é a base principal para o tratamento da hipertensão.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar *in vitro* se o extrato aquoso das folhas da planta *Alpinia zerumbet* (EAAz) apresenta atividade vasodilatadora em aorta torácica isolada de rato.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o papel do endotélio na possível ação vasodilatadora induzida pelo extrato de *A. zerumbet in vitro* e elucidar os possíveis mecanismos de ação;
- Avaliar a contribuição do óxido nítrico (NO), da prostaciclina e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio, guanilato ciclase e prostanóides na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso de folhas de *A. zerumbet*;
- Investigar a participação das vias guanilil ciclase-GMPc, bem como dos canais de potássio, nas respostas relaxantes de anéis da aorta de rato contraídos com fenilefrina;
- Investigar a participação das proteínas PI3 quinase, Src quinase e das espécies reativas de oxigênio na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso da *A. zerumbet* em aorta de rato.

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Reagentes

- Bicarbonato de Sódio – DINÂMICA;
- Carbogênio 5 (concentração 10 ppm) – AGA;
- Catalase, Polietileno glicol-Catalase, Wortmannin, Caribdotoxina, Apamina, ODQ (1-H-[1, 2, 4] Oxadiazolo [4,3 – a] Quinoxalina-1-one), Polietileno glicol dismutase, Superóxido dismutase, Cloreto de Acetilcolina, L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina Metil Éster) – SIGMA;
- Cloreto de cálcio, Sulfato de Magnésio hepta-hidratado – REAGEN;
- Cloreto de magnésio hexahidratado - GRUPO QUÍMICA;
- Cloreto de Sódio – VETEC;
- Fosfato de sódio dibásico anidro – SYNTH;
- Glicose anidra – QEEL;
- Indometacina, NaHPO<sub>4</sub>, Cloreto de potássio, MnTMPyP, Cloridrato de L-fenilefrina – SIGMA;
- Nitroprussiato de sódio (Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO].2H<sub>2</sub>O), PP2 [4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine] – MERCK.

#### 4.1.2 Aparelhos

- Agitador magnético - Quims
- Agitador tipo vortex - Biomixer QL-901
- Balança - Mettler Toledo AB 204-S
- Banho de órgãos automático - PANLAB
- Banho-maria - FANEM modelo 100
- Destilador - GFL
- Freezer - Frost Free 270 Brastemp
- Liofilizador - Micromodulyo Freezer Dryer – Thermo Electron Corporation

- Lupa Magnifying Lamp – CT BRAND
- Micro-ondas - Panasonic
- Micropipetas – Gilson
- pHmetro - Micronal B-477
- Pipeta - Pipteman Gilson
- Polígrafo - Modelo Quad bridge Amp ADinstruments
- Sistema de purificação de água Millipore- Milli-Q-A 10- Synthesis
- Termostato para banho de órgãos LE 13206 – PANLAB
- Transdutores de força (Modelo Powerlab4/30 ADinstruments)

#### **4.1.3 Software**

- GraphPad prism 5.0



## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Comitê de Ética

Todos os procedimentos experimentais envolvendo a utilização de animais realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (Certidão n° 84/09) e estão de acordo às recomendações do COBEA (Conselho Brasileiro de Experimentação Animal), respeitando a legislação vigente.

### 4.2.2 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 250 a 300 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará - UFC. Os animais foram mantidos sob um ciclo de 12 h em claro e 12 h em escuro a 25°C e alimentados com dieta comercial padrão. A água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

### 4.2.3 Material vegetal

As folhas frescas de *A. zerumbet* foram coletadas no sítio Vila Nova, localizado no distrito de Ladeira Grande, no Município de Maranguape (“ latitude sul 3°59`26.49”; latitude oeste 38°42`59.10”). A identificação botânica da planta encontra-se no herbário Prisco Bezerra-EAC da Universidade Federal do Ceará sob número 41.041.

As folhas de *A. zerumbet* foram lavadas em água destilada e deixadas para secar em temperatura ambiente. Após o processo de secagem as folhas foram pulverizadas.

### 4.2.4 Obtenção do extrato a partir das folhas pulverizadas de *A. zerumbet*

O extrato aquoso de *A. zerumbet* foi obtido a partir de 1,5 g de folhas frescas, previamente pulverizada, pesadas e empacotadas em sachês apropriados para a produção do chá. Cada sachê foi imerso em 200 ml de água destilada em ebulição e mantido abafado sob infusão por 30 min. sendo submetido a agitação a cada 5 min. O chá produzido foi liofilizado e estocado a temperatura de -10°C.

#### **4.2.5 Preparações dos anéis da aorta de ratos**

Os ratos (250 a 300 g) foram sacrificados por deslocamento cervical. O tórax foi aberto e a aorta torácica foi cuidadosamente removida e dissecada e, em seguida, transferida para uma solução de Krebs que apresentava a seguinte composição em 1 litro: NaCl 6,95 g; KCl 0,35 g; MgSO<sub>4</sub> 0,29; CaCl<sub>2</sub> 0,185 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,16; NaHCO<sub>3</sub> 2,10; glicose 2,00 g, (pH 7,4). Após a retirada cuidadosa do tecido conectivo aderente à aorta, as extremidades foram descartadas (aproximadamente 3 mm), e o vaso foi cortado transversalmente em anéis de 4-5 mm de comprimento.

#### **4.2.6 Montagem dos anéis aórticos**

Os anéis aórticos do rato foram montados entre 2 presilhas inoxidáveis inseridas no lúmen da artéria para gerar a tensão (Figura 02. A), uma presilha foi conectada verticalmente ao transdutor de força isométrica (Modelo Powerlab 4/30 ADInstruments) através de um fio de algodão e a outra ajustada a haste suporte no interior das cubas orgânicas do banho de tecidos (Panlab) (Figura 02. B e C<sub>2</sub>) contendo 10 ml de solução de Krebs a 37°C, areada continuamente com carbogênio (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>; 10 ppm). Os anéis aórticos foram lavados com solução de Krebs por subsequentes trocas da referida solução a cada 15 min. e ajustados periodicamente até a estabilização da tensão isométrica em 0,02 Newtons, por um período de repouso de 1 h. As variações das tensões isométricas foram medidas usando-se transdutores isométricos e registradas através do sistema de aquisição de dados (PowerLab 4/30/Quad Bridge Amp - software versão 4.0, AD Instruments, MA, EUA) (Figura 02. C<sub>1</sub>).

**Figura 02** - Foto: Anéis armados no interior da cuba do banho de Órgãos (A); Foto: Armação dos anéis aórticos na haste suporte (B); Foto: Banho de órgãos (C<sub>1</sub>); Foto: Sistema de aquisição de dados (C<sub>2</sub>).



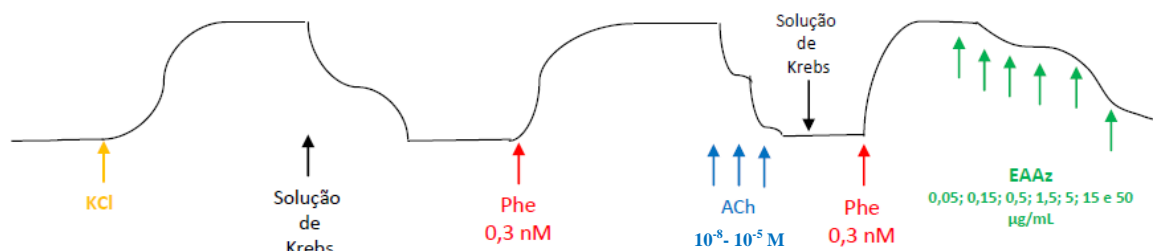
Fonte: Elaborada pelos autores

#### 4.2.7 Avaliação do vasorrelaxamento dos anéis aórticos induzidos pelo extrato de *Alpinia zerumbet*

Após a estabilização da tensão isométrica, os anéis foram pré-contraídos com KCl (80 mM) até atingir-se um platô. Em seguida, a solução de KCl (80 mM) foi substituída por solução de Krebs e adicionou-se ao banho fenilefrina (Phe) 0,3 nM. Após a resposta contrátil dos anéis a Phe, esperou-se alcançar um platô que correspondia a uma indução da contração submaximal da preparação aórtica maior do que 90% de 0,02 Newtons. Logo após, adicionou-se ACh ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  M) até ocorrer no mínimo 90% de relaxamento do tecido. Descartou-se a solução anterior e lavou-se o tecido com solução de Krebs regulando-se finamente a tensão até atingir-se o equilíbrio na linha de base. Após o ensaio descrito acima os anéis foram

novamente contraídos com Phe 0,3 nM esperou-se alcançar um platô. Em seguida, adicionaram-se concentrações cumulativas do extrato de *A. zerumbet* (0,05; 0,15; 0,5; 1,5; 5; 15 e 50 µg/mL ao banho (Figura 03). A tensão isométrica dos anéis da aorta foram medidas e suas respostas ao extrato de *A. zerumbet* foram avaliadas.

**Figura 03** - Representação esquemática do registro da resposta do músculo liso vascular a ação de agonistas e antagonistas.



Fonte: Elaborada pelos autores

#### 4.2.8 Preparação dos anéis aórticos sem endotélio

Nos estudos em que se avaliaram os efeitos vasodilatadores diretos do extrato de *Alpinia zerumbet*, foram construídas curvas concentração-efeito usando-se anéis com endotélio íntegro ou desprovidos de endotélio. As células endoteliais foram removidas cuidadosamente da luz do anel com uma pinça inoxidável. Os anéis com relaxamento igual ou superior a 90 % foram considerados com endotélio e os desprovidos de relaxamento foram considerados sem endotélio. A integridade do endotélio foi confirmada pelo relaxamento causado pela ACh (0,1 nM). No caso dos anéis desprovidos de endotélio a integridade do músculo liso vascular foi testada com SNP (10<sup>-8</sup> M).

#### 4.2.9 Investigação da participação das vias relacionadas ao relaxamento da aorta de rato com endotélio intacto ou desprovido de endotélio pela ação de antagonistas do extrato de *A. zerumbet in vitro*

Os anéis aórticos estabilizados com relação a tensão isométrica e testados quanto a integridade do endotélio com acetilcolina (10<sup>-8</sup> – 10<sup>-5</sup> M) e músculo liso vascular com nitroprussiato de sódio (10<sup>-8</sup> M) foram incubados por 20 min. com inibidores específicos da

eNOS, COX, EROs, PI3 quinase, Src quinase, canais de potássio ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  antes da contração induzida pela fenilefrina. Após estabilização do platô formado pela ação da Phe adicionou-se o extrato de *A. zerumbet* em concentração cumulativa (0,05; 0,15; 0,5; 1,5; 5; 15 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Vias analisadas:

- Via do óxido nítrico (NO)

Células endoteliais

-L-NAME (100 $\mu\text{M}$ )

Via da Guanilato ciclase (GMPc)

Células musculares

-ODQ (30  $\mu\text{M}$ )

- Inibidor de espécies reativas do oxigênio

Extracelular

-Superóxido dismutase (SOD)

-Catalase

Intracelular

- Polietileno Glicol Superóxido Dismutase (PEG-SOD)

- Polietileno Glicol Catalase (PEG-Catalase)

- Inibidor da formação de prostanóides

-Indometacina

- Inibição dos canais de  $\text{K}^+$  de alta condutância ativados por cálcio

-Caribdotoxina (CTX) (100 nM) e Apamina (100 nM)

- Via da tirosina quinase Src

-PP<sub>2</sub>

- Via da PI3K (Fosfatidil inositol 3 quinase)  
-Wortmanin

#### **4.2.10 Análise estatística**

O relaxamento induzido pelo EAAz está expresso como a porcentagem da tensão máxima observada na presença de fenilefrina. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste "t" de Student para dados pareados para protocolos envolvendo 2 grupos experimentais ou Análise de Variância (ANOVA) "one-way" seguido do teste de Bonferroni para protocolos envolvendo 3 ou mais grupos experimentais, onde a diferença entre as médias dos grupos foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Os valores de  $\log EC_{50}$  e  $\log IC_{50}$  foram calculados por regressão não linear. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.0.

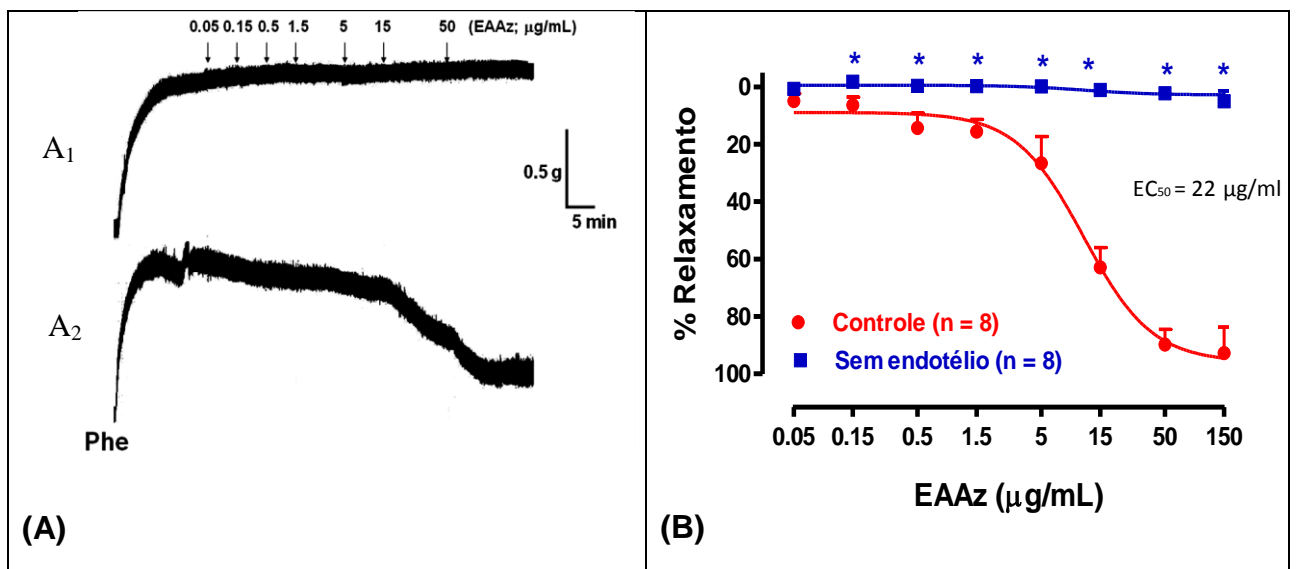
## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO RELAXAMENTO DA AORTA TORÁCICA DE RATO *IN VITRO* INDUZIDO PELO EXTRATO DE *A. zerumbet*.

#### 5.1.1 Efeitos do EAAz na tensão isométrica do músculo liso vascular com endotélio intacto

O EAAz apresentou efeito vasodilatador com  $EC_{50}$  de 22,005  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 6$ ) para anéis com endotélio intacto. Nosso estudo indica que a tensão isométrica dos anéis com endotélio intacto foi reduzida significativamente, enquanto na ausência de endotélio o relaxamento foi abolido significativamente (Figura 04. A e B).

**Figura 04** - Relaxamento *in vitro* do músculo liso da aorta torácica de rato pela ação do extrato de *A. zerumbet*. (A) Registro dos sinais da tensão isométrica do efeito do extrato aquoso de *A. zerumbet* nos anéis aórticos na: (A<sub>1</sub>) ausência de endotélio e (A<sub>2</sub>) presença de endotélio. (B) Traçado original mostrando o relaxamento dependente do endotélio para o extrato aquoso *A. zerumbet* em anéis aórticos de rato pré-contraídos com fenilefrina (Phe).



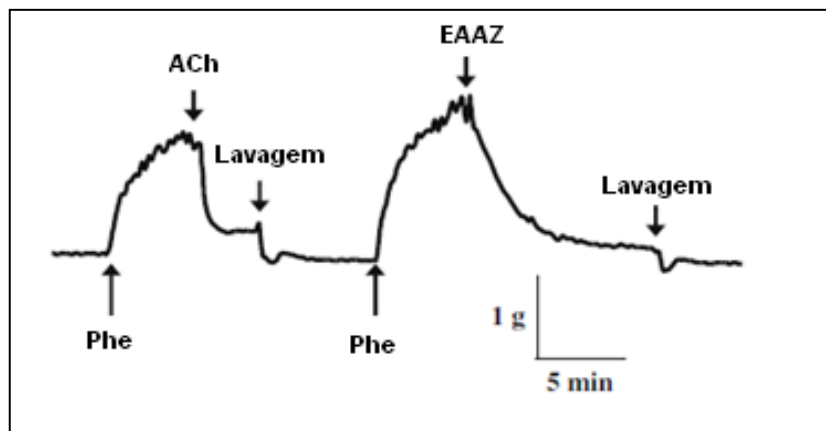
Fonte: Elaborada pelos autores

A Figura 04 (A e B) mostra uma gravação típica da contração máxima induzida pela fenilefrina 10 mmol/L na aorta com endotélio intacto, seguido de exposição a concentrações cumulativas de EAAz. Curvas concentração-resposta para ação do EAAz (5-50

mg / mL) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina e com endotélio foram construídas. O EAAz promoveu relaxamento do músculo liso vascular de forma dose dependente. A vasodilatação induzida pelo EAAz foi totalmente revertida após lavagem (Figura 05).

Como mostrado abaixo, ACh (1  $\mu$ M) foi adicionado ao banho contendo os anéis pré-contraídos com Phe induziu um forte relaxamento (Figura 05), confirmando a integridade do endotélio.

**Figura 05** - Efeito relaxante do EAAz e ACh em anéis aórticos com endotélio intacto pré-contraídos por Phe.



Fonte: Elaborada pelos autores

### 5.1.2 Efeitos do EAAz na tensão isométrica do músculo liso vascular com ausência de endotélio

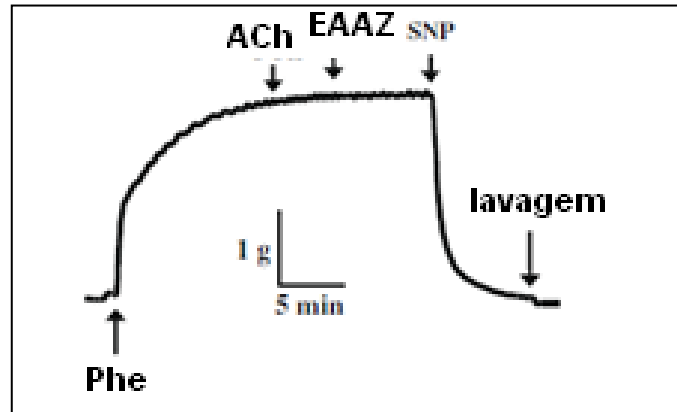
A fim de determinar o papel do endotélio na ação vasodilatadora do EAAz, experimentos adicionais foram realizados em anéis de aorta com o endotélio retirado mecanicamente antes de testar o extrato.

A Figura 06 mostra um experimento realizado em um anel aórtico desnudado onde a Phe induziu uma forte contração do mesmo, porém as respostas vasodilatadoras para o EAAz ou acetilcolina (controle) foram abolidas mesmo após a adição de doses crescentes e cumulativas do extrato ao banho. Como mostrado na Figura 06, nenhum relaxamento vascular foi observado em resposta a EAAz em anéis endotélio desnudado. Vasodilatação induzida pelo EAAz é dependente de endotélio funcional.

A integridade do músculo liso nas preparações desprovidas de endotélio foi confirmada com a utilização do reativo SNP (Figura 06).



**Figura 06** - Registro de um experimento onde um anel desnudado de endotélio é submetido à ação da ACh e após 5 min. seguiu-se adição de SNP.



Fonte: Elaborada pelos autores

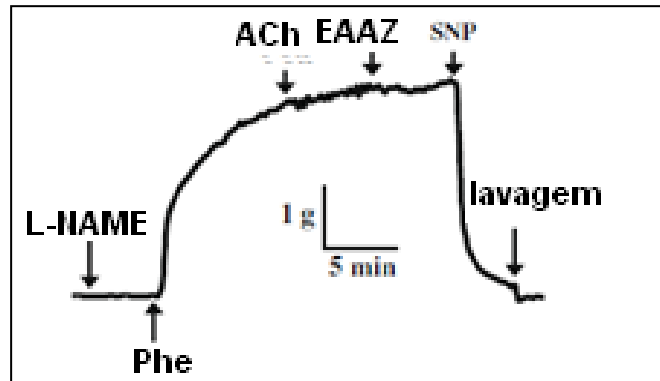
### 5.1.3 Investigação dos possíveis mecanismos de ação vasorrelaxante do EAAz através do uso de inibidores específicos das vias de transdução de sinal envolvendo o endotélio e músculo liso subjacente.

#### 5.1.3.1 Papel da eNOS no relaxamento mediado pelo NO e induzido pelo EAAz

Na figura 07 a ação vasorrelaxante da ACh e EAAz foi inibida pelo L-NAME indicando que ocorreu a inibição da enzima eNOS.

A atividade vasodilatadora produzida pelo EAAz foi abolida após o tratamento do anel aórtico com L-NAME (100  $\mu$ M) (Figura 08). Foi também constatado que o efeito vasodilatador do EAAz não foi alterado significativamente após pré-incubação dos anéis árticos de rato com indometacina (10  $\mu$ M, inibidor da ciclooxigenase) ou CTX mais apamina (inibidores dos canais de potássio ativados por cálcio) (Figura 08), indicando haver a participação da via do NO, enquanto os canais de potássio ativados por cálcio e as prostaciclina respectivamente não participam do processo de vasorrelaxamento.

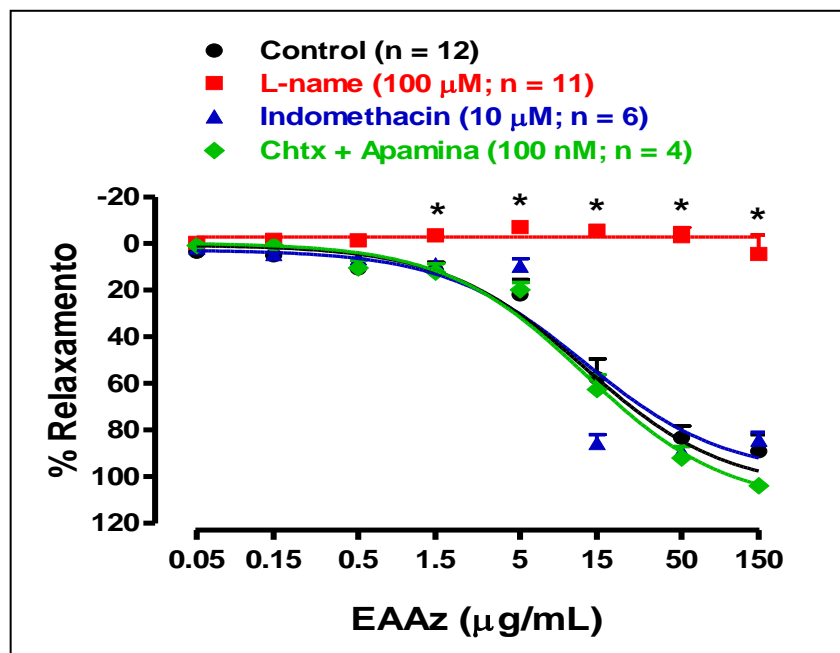
**Figura 07** - Registro das tensões isométricas dos anéis aórticos incubados com L-NAME por 15 min. antes da adição da Phe. Cinco minutos após a adição da Phe, adicionou-se ao banho doses crescentes e cumulativas do extrato. Cinco minutos após a adição da ultima dose do extrato adicionou-se o SNP.



Fonte: Elaborada pelos autores

Incubação com L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, resultou em uma inibição completa do efeito relaxante induzida pela EAAz em anéis de aorta pré-contráido com fenilefrina e com endotélio intacto (Figura 08).

**Figura 08** - Efeito do N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME; 100 μM), caribdotoxina (100 nM) mais apamina (100 nM) e indometacina (10 μM) no relaxamento induzido pelo extrato aquoso de *A. zerumbet* em anéis aórticos intactos de rato. Os resultados são mostrados como a média ± erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. \* indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).

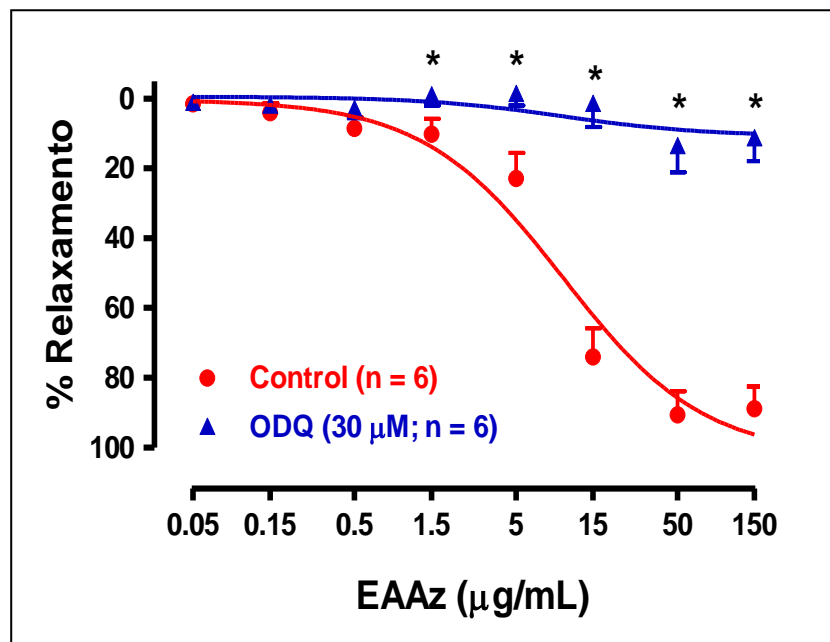


Fonte: Elaborada pelos autores

### 5.1.3.2 Papel da guanilato ciclase no relaxamento mediado pelo NO e induzido pelo EAAz

A atividade vasodilatadora produzida pelo EAAz foi reduzida após o tratamento da aorta com ODQ (30  $\mu$ M; n = 6; inibidor da enzima guanilato ciclase) (Figura 09) sugerindo assim um mecanismo com a participação do GMPc como segundo mensageiro.

**Figura 09** - Efeito do 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 10  $\mu$ M), no relaxamento induzido pelo extrato aquoso de *A. zerumbet* em anéis aórticos intactos de rato. Os resultados são mostrados como a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. \* indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).



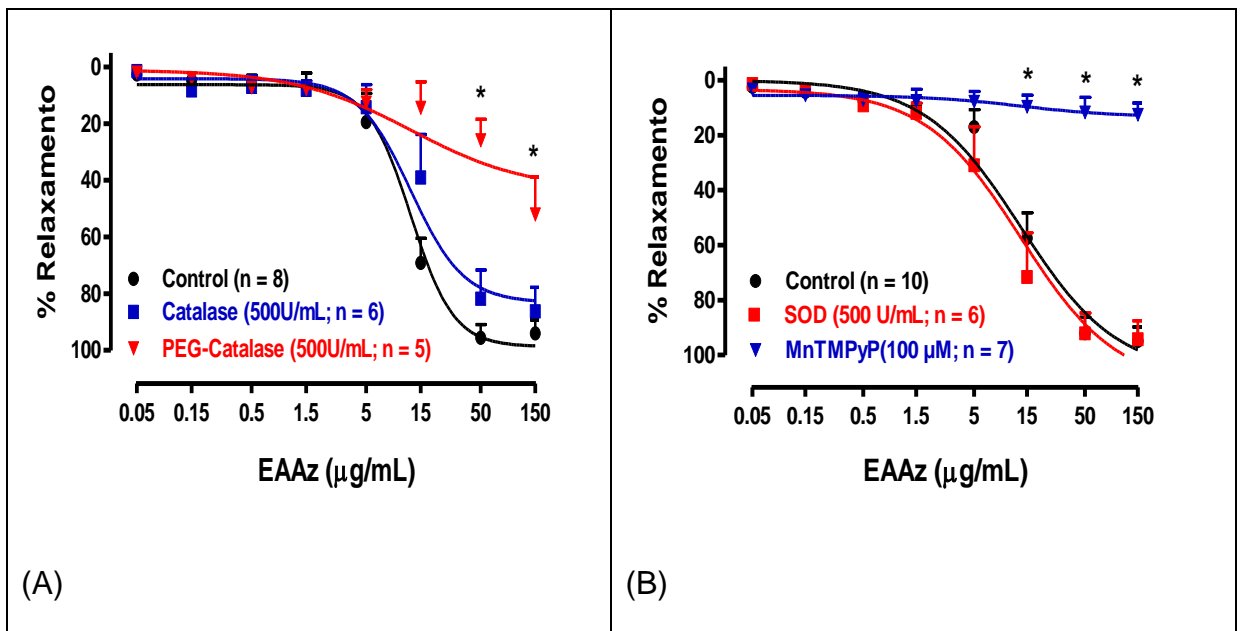
Fonte: Elaborada pelos autores

### 5.1.3.3 O papel das EROs no relaxamento mediado pelo NO e induzido pelo EAAz

A atividade vasodilatadora do EAAz foi reduzida significativamente após tratamento com a PEG-catalase, enquanto com relação a ação da catalase não ocorreu nenhuma alteração na atividade do extrato sobre os anéis aórticos de rato, indicando a participação da espécie reativa do oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), apenas a nível intracelular (Figura 10 A). A SOD também não alterou a atividade vasodilatadora do EAAz, porém o mimético da SOD, MnTMPyP, atuando ao nível intracelular influenciou a atividade vasodilatadora do EAAz pela dismutação do superóxido ( $O_2^-$ ) (Figura 10 B).

Este resultado indica que as EROs ( $H_2O_2$  e  $O^{2-}$ ) participam a nível intracelular da via de relaxamento dos anéis aórticos de artéria torácica de ratos. Enquanto que a nível extracelular não ocorreu alteração do relaxamento induzido pelo EAAz, já que a SOD e a catalase atuam extracelularmente.

**Figura 10** - Papel das espécies reativas do oxigênio no relaxamento mediado pelo NO dependente do endotélio para o extrato aquoso de *A. zerumbet* em anéis aórticos intactos de rato. Os anéis arteriais foram incubados com catalase ou PEG-catalase (A) e ou superóxido dismutase (SOD) ou MnTMPyP (B) por 30 min. antes da adição da Phe. Todos os experimentos foram executados na presença de caribdotoxina (100 nM), apamina (100 nM) e indometacina (10  $\mu$ M). Os resultados são mostrados como a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. \* indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).



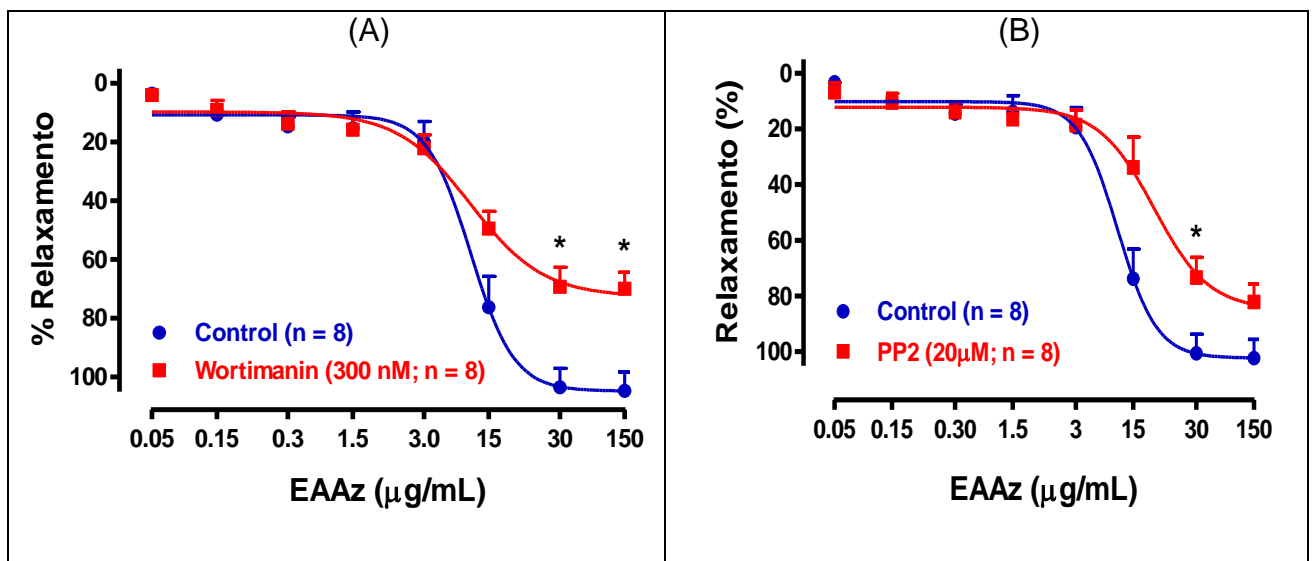
Fonte: Elaborada pelos autores

#### 5.1.3.4 O EAAz induz uma fosforilação redox sensível de PI3 quinase, Src quinase e da eNOS nas células endoteliais

O EAAz causou um pronunciado relaxamento dependente do endotélio, que foi significativamente reduzido pelo wortmannin (inibidores da PI3-quinase) (Figura 11 A) e PP2 (inibidor para a família de quinases Src) (Figura 11 B) respectivamente.

Numerosos estudos têm indicado que a via PI3-quinase media ativação da eNOS através da fosforilação dependente de Akt da eNOS em Ser1177 em resposta a vários estímulos fisiológicos, incluindo a tensão de cisalhamento, os estrógenos, fator de crescimento vascular endotelial, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lipoproteína de alta densidade (CORSON et al., 1996; GARCIA-CARDENA et al., 1996; MICHELL et al., 1999; HARRIS et al., 2001; BOO et al., 2002; MINEO et al., 2003).

**Figura 11.** Papel das proteínas quinases no relaxamento mediado pelo NO dependente do endotélio pelo extrato aquoso *A. zerumbet* em anéis aórticos intactos de rato. Efeito do (A) PP2 (30  $\mu$ M) ou (B) wortimannin (30  $\mu$ M) no relaxamento induzido pelo extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* em anéis aórticos intactos. Todos os experimentos foram executados na presença de caribdotoxina (100 nM), apamina (100 nM) e indometacina (10  $\mu$ M). Os resultados são mostrados como a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 experimentos diferentes. \* indica um efeito inibitório significativo ( $P < 0.05$ ).



Fonte: Elaborada pelos autores

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou os efeitos do extrato aquoso das folhas de *A. zerumbet* na aorta (vaso de condutância) isolada de ratos Wistar. Os resultados obtidos sugerem que o relaxamento dos anéis de aorta induzido pelo extrato aquoso de *A. zerumbet* é reversível, dependente da dose e da presença do endotélio, envolvendo a ação da via do NO/GMPc. A participação dessa via foi confirmada com adição do EAAz ao banho na presença de L-NAME (100  $\mu$ M, um inibidor da síntese do óxido nítrico) ou ODQ (inibidor da guanilil ciclase) resultando na abolição do vasorrelaxamento dos anéis aórticos. Enquanto, o efeito vasodilatador induzido pelo EAAz foi totalmente abolido após a remoção mecânica do endotélio dos anéis aórticos indicando a sua importância na ação. O endotélio vascular exerce um papel importante na regulação do tônus vascular através da produção e liberação de muitos fatores que contraem ou relaxam o músculo liso vascular (ORALLO, 1996). Por outro lado, pré-tratamento com indometacina (10 mmol/L, um inibidor da ciclo-oxigenase), caribdotoxina mais apamina (inibidores dos canais de potássio ativados por cálcio) não alteraram a curva de concentração-resposta da aorta com endotélio intacto. Indicando a não participação da via da ciclooxigenase e dos canais de potássio ativados por cálcio. Essas descobertas indicam que a síntese/liberação de NO está envolvido na resposta de relaxamento e que a participação de metabólitos da ciclo-oxigenase e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio provavelmente não é essencial para a resposta vasorrelaxante do EAAz. O NO é um dos principais fatores vasodilatadores liberado pelo endotélio. O óxido nítrico é uma importante molécula sinalizadora que atua em vários tecidos numa faixa diversa de processos fisiológicos (autor, ano). A sintase do NO endotelial pode ser estimulada para produzir NO através da ativação de receptores endoteliais. O óxido nítrico difunde-se do endotélio para o músculo liso vascular, onde estimula a GCs para gerar guanosina monofosfato cíclica (BRYAN et al., 2005).

A participação de uma segunda via de formação de NO na qual se sugere o envolvimento das EROs e consequente ativação de proteínas da família das quinases Src/PI3 quinase nas células endoteliais dos anéis aórticos. O envolvimento das EROs na atividade vasodilatadora de EAAz em aorta isolada de rato foi confirmado pela ação inibitória dos antagonistas: PEG-catalase (permeante de membrana e inibidor da catalase), MnTMPyP (permeante de membrana e mimético da SOD), Wortmannin (inibidor da PI3 quinase) e PP2 (inibidor para a família de quinases Src). Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente

que a geração celular de espécies reativas de oxigênio, incluindo  $H_2O_2$ , desempenha um papel importante na transdução e modulação de sinal celular e das vias de sinalização transmembrana (RHEE, 1999; FINKEL, 2000, 2003; ALLEN ; TRESINI, 2000).

O EAAz induziu um relaxamento dos anéis aórticos que foi marcadamente reduzido por análogos permeantes de membrana PEG-superóxido dismutase e PEG-catalase, mas não por superóxido dismutase e catalase nativos. Isto indica uma ação da EROs ao nível intracelular, porém a fonte nas células endoteliais está para ser determinada. A formação de EROs é um evento inicial crítico na via de transdução de sinal levando a ativação da eNOS e ao relaxamento subsequente do músculo liso vascular. Esses achados indicam que o evento inicial levando a síntese de NO em resposta ao EAAz pode estar sendo mediada pela formação intracelular de EROs. O sinal pró-oxidante moderado, envolvendo ânions superóxidos, desencadeia a fosforilação da Src quinase/PI3 quinase levando a ativação da eNOS por fosforilação. Vários trabalhos demonstram que a ativação da Src nas células endoteliais está diretamente relacionada à formação intracelular de EROs (espécies reativas de oxigênio), especialmente do  $O_2^{\cdot -}$  (NDIAYE *et al.*, 2003; NDIAYE *et al.*, 2004; NDIAYE *et al.*, 2005). Portanto, as EROs estimulam a Src, a qual ativa a via PI3K/Akt, com consequente ativação da eNOS.

As EROs são amplamente reconhecidas como importantes moléculas sinalizadoras envolvidas no controle fisiológico da função da célula, em parte pela ativação das proteínas quinases redox-sensíveis (ULLRICH; BACHSCHMID, 2000). Consistente com tal sequência de eventos, as concentrações moderadas de peróxido de hidrogênio aumentam a atividade da eNOS através da fosforilação PI3-kinase/Akt-dependente de eNOS em Ser1177 (THOMAS *et al.*, 2002; CAI *et al.*, 2003). Os achados também indicam que quinase Src é um mediador a jusante da via de PI3-kinase/Akt levando a fosforilação da eNOS induzida pelo EAAz. Em discordância com a ideia convencional de que as EROs agem principalmente nos processos patológicos induzindo danos a estruturas biológicas, em baixas concentrações, as EROs têm sido relacionadas à regulação fisiológica de vários mecanismos moleculares, inclusive nas células endoteliais (NDIAYE *et al.*, 2004; ANSELM *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que polifenóis de origem vegetal induzem a formação de EROs que estão envolvidas na ativação da via Src – PI3K/Akt (ANSELM *et al.*, 2007). Os polifenóis do vinho vermelho são hábeis a induzir o relaxamento e hiperpolarização mediado pelo EDFH e NO em artérias coronárias de porco que são estritamente dependentes

sobre a formação intracelular dos ânions superóxido em células endoteliais (NDIAYE et al., 2003; NDIAYE et al., 2004; NDIAYE et al., 2005).

Alguns estudos têm indicado que os polifenóis também são capazes de ativar a eNOS por meio da fosforilação mediada pela via da Src-PI3K/Akt (STOCLET et al., 2004). Esse fato reforça a existência de uma classe comum de compostos amplamente distribuídos no reino vegetal aos quais provavelmente são atribuídos diversos efeitos cardiovasculares benéficos, frequentemente mediados pelo NO (AJAY et al., 2003; LIU, 2004; STOCLET et al., 2004).

Vários autores (MPALANTINOS et al., 1998; LIN et al., 2008) investigaram a presença de flavonóides em extratos de *A. zerumbet*. Na literatura especializada está bem estabelecido que vários grupos de flavonóides presentes no extrato de várias plantas apresentam a ação indutora no vasorrelaxamento mediada por NO e dependente do endotélio em vasos (AJAY et al., 2003; MADEIRA et al., 2009; RODRÍGUEZ-CRUZ et al., 2003). Os flavonóides são conhecidos por apresentar diversos efeitos biológicos, tais como a inibição da agregação plaquetária, antioxidante, diurético, antiespasmódico e anti-inflamatórios. Além disso, muitos estudos demonstraram que os flavonóides atuam como moduladores do tônus vascular e diminuem a contração-induzida por agonista nas artérias isolados de ratos através da estimulação da produção endógena de NO endotelial (AJAY et al., 2003; HARBONE; WILLIAMS, 2000). Os polifenóis também são descritos por ativar diretamente diferentes vias de sinalizações responsáveis pela produção e liberação do NO das células endoteliais. Dentre estas, encontra-se a via mediada pela ativação da PI3K/Akt (NDIAYE et al., 2005). A quercetina, kaempferol, miricetina, catequina, (2)-epicatequina, rutina ou outros flavonóides são constituintes do extrato aquoso ou do óleo essencial de *A. zerumbet* (MPALANTINOS et al., 1998; DE MOURA et al., 2005; LIN et al., 2008). É possível que esses flavonóides participem do mecanismo de vasorrelaxamento dos anéis aórticos de rato Wistar induzido pelo extrato aquoso de *A. zerumbet*. Mais estudos são necessários para identificar os mediadores bioquímicos envolvidos no efeito vasorrelaxante do extrato aquoso de *A. zerumbet*. O estudo da estrutura-atividade do efeito vasodilatatório dos flavonoides em músculo liso aórtico de rato mostrou que a quercitina e o kaempferol são, entre outros flavonoides, os mais potentes substâncias relaxantes para contrações induzidas por noradrenalina, KCl, forbol-12-miristato, 13-acetato (DUARTE et al., 1993).

Várias plantas medicinais são conhecidas por possuírem propriedades anti-hipertensivas sendo constatada a participação das mesmas na ativação da via do NO. Entre

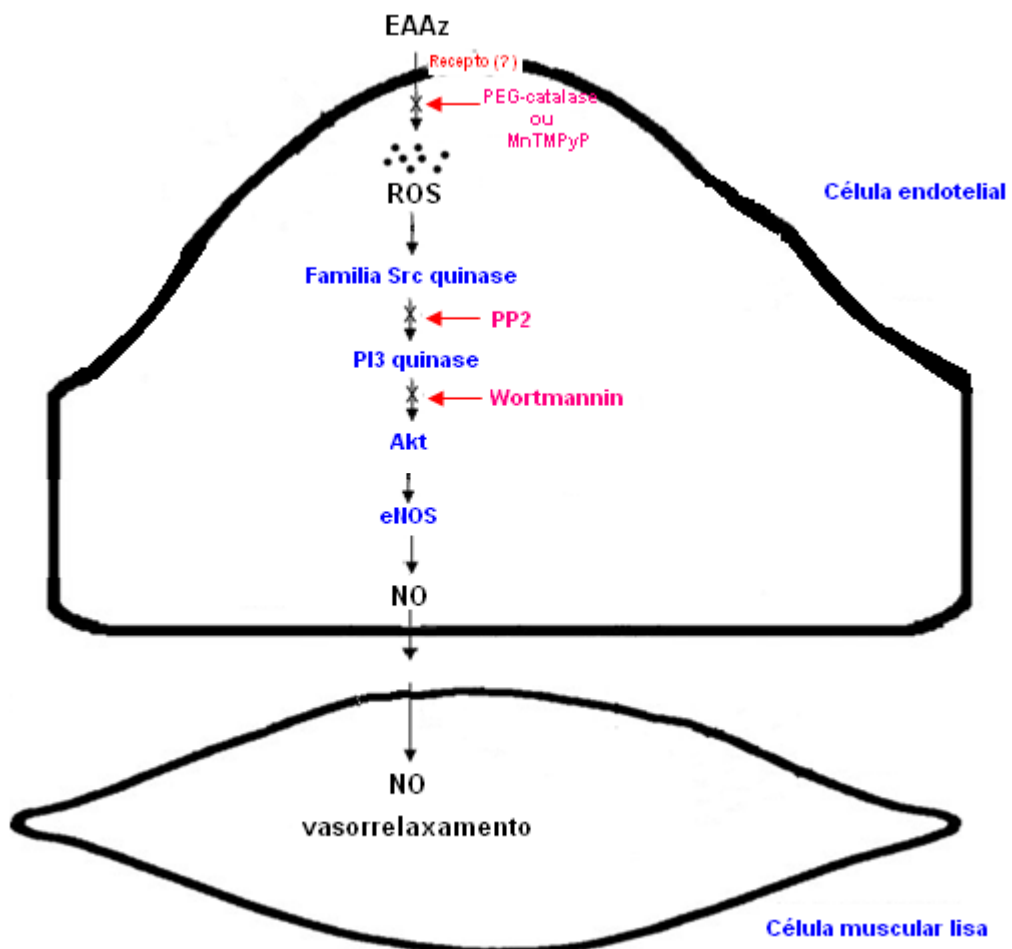


estas estão incluídas: *Allium sativm* (PEDRAZA-CHAVETI et al., 1998) e *Arbutus unedo* (AFKIR et al., 2008). A *Arbutus unedo* comporta-se de forma muito semelhante a *C. ladaniferus*, produzindo um efeito anti-hipertensivo em ratos hipertensos tratados com L-NAME (AFKIR et al., 2008) e um efeito vasorrelaxante endotélio-dependente envolvendo ativação de NO-sintase endotelial (LEGSSYER et al., 2004; ZIYYAT et al., 2002). Outras plantas de diversas famílias também demonstraram ser capazes de relaxar artérias através do estímulo da liberação do NO endotelial, como por exemplo, a *Maytenus ilicifolia* (RATTMANN et al., 2006), a *Dioclea grandiflora* (LEMOS et al., 1999), a *Harconia speciosa* (FERREIRA et al., 2007) e a *Euterpe oleraceae* (ROCHA et al., 2007).

## 7 CONCLUSÃO

O EAAz tem ação vasodilatadora dependente do endotélio via NO/GMPc com o envolvimento ao nível intracelular de espécies reativas do oxigênio e ativação da Src quinase e da fosfatidil inositol 3 fosfato quinase (Figura 12). Esse mecanismo pode explicar, em parte, o fenômeno de vasodilatação induzida pelo EAAz e o tradicional uso do chá das folhas de *A. zerumbet* como um agente anti-hipertensivo e vasorrelaxante. Estudos adicionais são requeridos para elucidar o mecanismo de sinalização a montante da EROs que media a ação vasodilatadora do EAAz. Em conjunto, os resultados demonstram que o extrato das folhas de *A. zerumbet* possui substâncias capazes de induzir relaxamento do músculo liso vascular que é a base para o tratamento da hipertensão.

**Figura 12.** Esquematização da via de sinalização ativada pelas EROs



Fonte: As ilustrações das células endotelial e muscular foram obtidas de Vanhoutte, 1996. Enquanto, o esquema da via de sinalização é sugestão dos autores.

## REFERÊNCIAS

- AFKIR, S.; NGUELEFACK, T. B.; AZIZ, M.; ZOHEIR, J.; CUISINAUD, G.; BNOUHAM, B.; MEKHFI, H.; LEGSSYER, A.; LAHLOU, S.; ZIYYAT, A. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME induced hypertensive rats, **Journal Ethnopharmacology**. v.116, p.288–295, 2008.
- AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**. v.74, n.5, p.603–612, 2003.
- ALBUQUERQUE, E. S. B.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botânica Brasileira**. v.18, n.1, 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P.; CHIAPPETA, A. A. Formas de uso de espécies vegetais dos cultos afro-brasileiros em Recife. **Biológica Brasília**. v.6, n.1/2, p.111-120, 1994/1995.
- ÁLDERTON, W. K.; COOPERM, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases, structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**. v.357, p.593-615, 2001.
- ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology & Medicine**. v.28, p.463–499, 2000.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: Conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 1993.
- ANSELM, E.; CHATAIGNEAU, M.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH, V. B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src and Akt-dependent activation of eNOS. **Cardiovascular Research**, v.73, n.2, p.404-413. 2007.
- ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, v.348, p.730-732, 1990.
- ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB Journal**, v.7, n.2, p.349-60, 1993.
- ARNAL, J. F.; DINH-XUAN, A. T.; PUEYO, M.; DARBLADEA B.; RAMI J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.55, p.1078–1087, 1999.
- 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. **Circulation Research**, v.78, n.5, p.750-758, 1996.
- BAHRA, P.; RAINGER, G. E.; WAUTIER, J. L.; LUU, N. T.; NASH, G. B. Each step during transendothelial migration of flowing neutrophils is regulated by the stimulatory

concentration of tumour necrosis factor-alpha. **Cell Adhesion and Communication**. v.6, n.6, 491–501, 1998.

BAILY, L. H. APUD; HAGGAG, M. Y.; ELSHAMY, A. M. Phytochemical study of *Alpinia nutans* (Roscoe) and of *Hedychium coronarium* (Koenig). **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.18, p.465-76, 1977.

BECKMAN, J. S.; CHEN, J.; ISCHIROPOULOS, H.; CROW, J. P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. In: PACKER, L. San Diego: (ed.) **Methods of enzymology**. Academic Press Inc, v.233, p.229-40, 1994.

BEZERRA, M. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; FONTELES, M. C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on the rat ileum. **Phytotherapy Research**, v.14, n.7, p.549-551, 2000.

BOIE, Y.; RUSHMORE, T. H.; DARMON-GOODWIN, A.; GRYGORCZYK, R.; SLIPETZ, D. M.; METTERS, K. M.; ABRAMOVITZ, M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.16, p.12173–12178, 1994.

BOLOTINA, B. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. G.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v.368, n.6474, p.850-853, 1994.

BOO, Y. C.; SORESCU, G.; BOYD, N.; SHIOJIMA, I.; WALSH, K.; DU, J.; JO, H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.3388–3396, 2002.

BOO, Y. C.; KIM, H. J.; SONG, H.; FULTON, D.; SESSA, W. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. **Free Radical Biology & Medicine**, v.41, n.1, p.144-153, 2006.

BOTSARIS, A. S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995.

BOUCHER, J. L.; MOALI, C.; TENU, J. P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.55, p.1015-1028, 1999.

BRAGA, R. A. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. 2.ed., Fortaleza: Imprensa Universitária, 1960.

BREYER, R. M.; BAGDASSARIAN, C. K.; MYERS, S. A.; BREYER, M. D. Prostanoid receptors: Subtypes and signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.41, n.1, p.661– 690, 2001.

BROOKS, P.; EMERY, E.; EVANS, F. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase I and cyclooxygenase II. **Rheumatology**, v.38, p. 779-788, 1999.

- BRYAN, R. M.; YOU, J.; GOLDING, E. M.; MARRELLI, S. P. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Anesthesiology**, v.102, p.1261–77, 2005.
- BUCCI M.; GRATTON J. P.; RUDIC R. D.; ACEVEDO L.; ROVIEZZO F.; CIRINO G.; SESSA W. C. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. **Nature Medicine**, v.6, p.1362-7, 2000.
- BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. **The Journal Biological. Chemistry**, v.268, n.12, p.8410-8413, 1993.
- BUSSE, R.; FICHTNER, H.; LUCKHOFF, A.; KOHLHARDT, M. Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. **American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology**, v.255, n. 4, Pt 2, p.H965-H969, 1988.
- CAI, H.; LI, Z.; DAVIS, M. E.; KANNER, W.; HARRISON, D. G.; DUDLEY, S. C. JR. Akt dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. **Molecular Pharmacology**, v.63, p.325–331, 2003.
- CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRATT, P. F.; HARDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium–derived hyperpolarizing factor. **Circulation Research**, v.78. p.415-23, 1996.
- CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annual Review of Biochemistry**. v.56, p.395-433, 1987.
- CARLINI, E. A. Screening Farmacológico de plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Biologia**, v.32, n.2, 1972.
- CASTEELS, R.; DROOGMANS G. Exchange Characteristics of The Noradrenaline-Sensitive Calcium Store In Vascular Smooth Muscle Cells or Rabbit Ear Artery. **The Journal of Physiology**, v.317, p.263-279, 1981.
- CASTEELS, R. Electro-and Pharmacomechanical Coupling in Vascular Smooth Muscle. **CHEST**, v.78, n.1, 1980, Supplement.
- CAVALCANTI, E. S.; MORAES, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA E. W. Larvicidal Activity of Essencial Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.5, p.541-544, 2004.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v.59, p.527–605, 1979.
- CHANCE, B. On the reaction of catalase peroxides with acceptors. **The Journal of Biological Chemistry**. v.182, p.649–658, 1950.

CHEN, G. F.; SUZUKI, H. Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarisation in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. **The Journal of Physiology**, v. 421, p.521–534, 1990.

CHENG, Y.; AUSTIN, S. C.; ROCCA, B.; KOLLER, B. H.; COFFMAN, T. M.; GROSSER, T.; LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. **Science**, v.296, p.539–541, 2002.

CHESEBRO, J. H.; FUSTER, V.; WEBSTER, M. W. I. Endothelial injury and coronary vasomotion. **Journal of the American College Cardiology**, v.14, p.1191-2, 1989.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v.81, p.249–255, 2003.

CHIEN, S.; FAN, F.; LEE, M. M.; HANDLEY, D. A. Effects of arterial pressure on endothelial transport of macromolecules. **Biorheology**, v.21, p.631-41, 1984.

CHINELLATO, A.; FROLDI, G.; CAPARROTTA, L.; RAGAZZI, E. Pharmacological characterization of endothelial cell nitric oxide synthase inhibitors in isolated rabbit aorta. **Life Sciences**, v.62, n.6, p.479-490, 1998.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v.92, p.3337-3349, 1995.

COHEN, R. A.; WEISBROD, R. M.; GERICKE, M.; YAGHOUBI, M.; BIERL, C.; BOLOTINA, V. M. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. **Circulation Research**, v.84, p.210–219, 1999.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v.1, p.1397-1406, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, 1974. p.325, v.5.

\_\_\_\_\_. **Dicionario das Plantas úteis do Brasil**, Rio de Janeiro: Ministerio da Agricultura, IBDF, 1978. v.4.

CORSON, M. A.; JAMES, N. L.; LATTA, S. E.; NEREM, R. M.; BERK, B. C.; HARRISON D. G: Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Circulation Research**, v.79, p.984–991, 1996.

CRANE, B. R.; ARVAI, A. S.; GHOSH, D. K.; WU, C.; GETZOFF, E. D.; STUEHR, D. J.; TAINER, J. A. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. **Science**, v.279, p.2121–2126, 1998.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**: 209. Fortaleza, CE, Brasil: Edições UFC, 1981.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**, New York: Columbia University Press, 1981.1262 p.

CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Belo Horizonte: Veloso, 2vs. 1965.

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of  $Ca^{2+}$  influx and intracellular  $Ca^{2+}$  release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **American Journal Physiology**, v.266, n.6, p.620-627, 1994.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the Monocotyledons - Structure, evolution, and taxonomy**. Berlim: Springer-Verlag, 1985.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v.109, n.23, p.III-27–III-32, 2004.

DE ARAÚJO, P. F.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; FERREIRA, S., C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v.12, p.482-486, 2005.

DE MEY J. G., VANHOUTTE P. M. Endothelium and relaxation of isolated canine arteries (abstr). **Pharmacologist**, v.22, p. 282, 1980.

\_\_\_\_\_. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. **The Journal Physiology**, (Lond) v.316, p.437-355, 1981.

DE MOURA, R. S.; EMILIANO, A. F.; DE CARVALHO, L. C. R. MARINS.; SOUZA, M. A. V.; GUEDES, D. C.; TANO, T.; RESENDE, A. C. Antihypertensive and Endothelium-Dependent Vasodilator Effects of *Alpinia zerumbet*, a Medicinal Plant. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.46, n.3, 2005.

DE MOURA, R, S.; VIANA F. S. C.; SOUZA, M. A. V.; KOVARY, K.; GUEDES, D. C.; OLIVEIRA, E. P.; RUBENICH, L. M.; CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA, R. M.; TANO, T.; CORREIA M. G. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v.54, p.1515–1520, 2002.

DE MOURA, R. S.; MIRANDA, D. Z.; PINTO, A. C. A., et al. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine, **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.44, p.302–309, 2004.

DE POOTER, H. L.; ABOUTABL, E. A.; EL-SHABRAWY, A. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa* (J. C. Wendl.) K. Schum, grown in Egypt. **Flavour Fragrance Journal**, v.10, n.2, p.63-67, 1995.

- DI MARZO, V.; FONTANA, A.; CADAS, H.; SCHINELLI, S.; CIMINO, G.; SCHWARTZ, J. C.; PIOMELLI, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**, v.372, p.686-91, 1994.
- DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M.; HIRUMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1989.
- DORIT R. L.; WALKER W. F.; BARNES R. D. **Digestion and Nutrition**. In: eds. **Zoology**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1991. p.235-258.
- DOUGHTY, J. M.; PLANE F.; LANGTON P. D. 1. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. **American Journal of Physiology**. v.276, p.H1107–H1112, 1999.
- DUARTE, J.; VIZCAINO, F. P.; UTRILLA, P.; JIMENEZ, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. **General Pharmacology**. v.24, n.4, p.857-862, 1993.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L M.; CARVALHO, M das G.; Revisão sobre óxido nítrico **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003.
- EDWARDS, G.; THOLLON, C.; GARDENER, M. J.; FÉLÉTOU, M.; VILAINÉ, J. P.; VANHOUTTE, P. M.; WESTON, A. H. Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v.129, n.6, p.1145–1154, 2000.
- EDWARDS, G.; DORA, K. A.; GARDENER, M. J.; GARLAND C. J.; WESTON A. H.  $K^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v.396, p.269–272, 1998.
- ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D.; KOYAMA, H; TAWATA, S. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm **Food Chemistry**, v.104, p.1648–1653, 2007.
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, n.10, p.872-879, 2002.
- FELETOU, M.; VANHOUTTE P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.26, p.1215–1225, 2006.
- \_\_\_\_\_. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.23, p.1082-1090, 1996.
- FERON, O.; SALDANA, F.; MICHEL, J. B.; MICHEL, T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.3125–3128, 1998.
- FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress, **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.2, p.247–254, 2003.



FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction, **FEBS Lett**, v.476, p.52–54, 2000.

FLAVAHAN, N. A.; VANHOUTTE P. M. G-protein and endothelial responses, **Blood vessels**, v.27, n.2-5, p.218-229, 1990.

FLEMING, I. Myoendothelial gap junctions: the gap is there, but does EDHF go through it? **Circulation Research**, v.86, p.249–250, 2000.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. **Hypertension**, v.47, p.629–633, 2006.

\_\_\_\_\_. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovascular Research**, v.43, n.3, p.532-541, 1999.

FLEMING, I.; FISSLTHALER B.; MICHAELIS R. U.; KISS L.; POPP R. ; BUSSE R. The coronary EDHF stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.442, n.4, p.511-518, 2001.

FLOWER, R. J. The development of cox-2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, p.179-192. 2003.

FONTELES, M. C.; OLIVEIRA, J. V. Uma avaliação clínica do chá de colônia. **VIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 4 a 6 de setembro, Manaus – AM, 1984.

FONTELES, M. C.; MENDONÇA, V. L.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, C. L. A. “A chemical and pharmacological study of *A. nutans*”. **Brazilian-Sino Symposium on chemistry and pharmacology of natural products**. Rio de Janeiro, 10-14, Brazil, p.222-289, 1989. (abstracts).

FORSTERMANN, V.; MULSCH, A.; BOHME, E.; BUSSE R. Stimulation of soluble granulate cyclase by acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. **Circulation Research**, v.58, p.531-538, 1986.

FRANK, P. G.; WOODMAN, S. E.; PARK, D. S.; LISANTI, M. P. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, p.1161–1168, 2003.

FUCHS, F. D. **Hipertensão arterial sistêmica**. In: DUCAN B. B. et al. Medicina ambulatorial: condutas primária baseadas em evidências. ARTMED, 2004. p.641-56.

FUJITA, T.; NISHIMURA, H.; KABURAGI, K.; MUZUTANI, J. Plant growth inhibiting  $\alpha$ -pyrones from *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, v.36, n.1, p.23-27, 1994.

FUKAO, M.; HATTORI, Y.; KANNO, M.; SAKUMA, I.; KITABATAKE, A. Thapsigargin and cyclopiazonic acid-induced endotheliumdependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v.115, p.987–992, 1995.

FULTON, D.; GRATTON, J. P.; MCCABE T. J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T. F. PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W. C. Regulation of

endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**. v.399, p.597-601, 1999.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v.294, p.1871-5, 2001.

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

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v.3, p.2007-2018, 1989.

FURTADO, L. G.; SOUZA, R. C.; BERG, M. E. Notas sobre uso terapêutico de plantas pela população cabocla de Marapanim, Pará In: **Boletim do Museu Emílio Goeldi. Nova série, Antropologia**, n.70, 1978.

GADELHA, M. G. T.; MENEZES, A. M. S. In: X SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, São Paulo, 1988. **Anais...**, 7/9: 12.

GAO, Y.; LEE, R. M. K. W. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery, **British journal of pharmacology**.v.146, n.8, p.1061–1068, 2005.

GARCIA-CARDENA, G.; FAN, R.; SHAH, V.; SORRENTINO, R.; CIRINO, G.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W. C. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. **Nature**, v.392, p.821-824, 1998.

GARCIA-CARDENA, G.; FAN, R.; STERN, D. F.; LIU, J.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.27237–27240, 1996.

GARCIA-PASCUAL, A.; LABADIA, A.; JIMENEZ, E.; COSTA, G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K<sup>+</sup> conductance. **British Journal of Pharmacology**, v.115, p.1221-30, 1995.

GARCIN, E. D.; BRUNS, C. M.; LLOYD, S. J.; HOSFIELD, D. J.; TISO, M.; GACHHUI, R.; STUEHR, D. J.; TAINER, J. A.; GETZOFF, E. D. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase, **The Journal Of Biological Chemistry**, v.279, n.36, p.37918–37927, 2004.

GARDINER, S. M.; KEMP, P. A.; MARCH, J. E.; BENNETT, T.; DAVENPORT, A. P.; EDVINSSON, L. Effects of an ET1-receptor antagonist, FR139317, on regional haemodynamic responses to endothelin-1 and [Ala<sup>11,15</sup>] Ac-endothelin-1 (6-21) in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**, v.112, p.477-86, 1994.

GARLAND, J. G.; MCPHERSON, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesentery artery. **British Journal of Pharmacology**, v.105, p.429-35, 1992.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one. **Molecular Pharmacology**, v.48, n.2, p.184-188, 1995.

GARY, G. A. Generation of endothelin. In: GRAY G. A., WEBB D. J. (eds). **Molecular Biology of Pharmacology of the endothelins**. R.G. Landes, Austin, T. X.; 13-32, 1995.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, v.55, p.250-60, 2002.

GOSH, S; GACHHUI, R.; CROOKS, C.; WU, C.; LISANTI, M. P.; STUEHR, D. J. Interactions between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric oxide synthase. Consequences for catalysis. **The Journal Of Biological Chemistry**, v.273, p.22267–22271, 1998.

GOSS, S.; P, SINGH, R. J.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Reactions of \*NO, \*NO<sub>2</sub> and peroxynitrite in membranes: physiological implications. **Free Radialc Research**, v.31, p.597–606, 1999.

GOVERS, R.; RABELINK, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **American Journal Physiology Renal Physiology**. v.280, p.F193-206, 2001.

GRATTON, J. P.; BERNATCHEZ, P.; SESSA, W. C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v.94, p.1408-1417, 2004.

GRATTON, J. P.; FONTANA, J.; O'CONNOR, D. S.; GARCIA-CARDENA, G.; MCCABE, T. J.; SESSA, W. C. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90 and caveolin-1 complex *in vitro*. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.22268–22272, 2000.

GRAY, G. A.; WEBB, D. J. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. **Pharmacology Therapeutics**, v.72, p.109–148, 1996.

GRIFFITH, T. M. "Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?". **British Journal of Pharmacology**, v.141, n.6, p.881–903, 2004.

GRUETTER, C. A.; GRUETTER, D. Y.; LYON, J. E.; KADOWITZ, P. J; IGNARRO L. J. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. **The Journal of farmacology and experimental therapeutics**, v.219, n. 1, p.181-186, 1981.

GULÇIN, I.; OTAY, M.; KIREÇCI, E.; KUFREVIOGLU, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v.83, p.371-382, 2003.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481–504 2000.

HAROOTUNIAN, A. T.; KAO, P.; PARANJAPE, S.; ADAMS, S. R.; POTTER, B. V. L.; TSIEN, R. Y. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in REF52 fibroblasts:  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated IP3 production or voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels as key positive feedback elements. **Cell Calcium**, v.12, n.2/3, p.153-164, 1991.

HARRIS, M. B.; JU, H.; VENEMA, V. J.; LIANG, H.; ZOU, R.; MICHELL, B. J.; CHEN, Z. P.; KEMP, B. E.; Venema, R. C. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.16587-16591, 2001.

HAYABUCHI, Y.; NAKAYA, Y.; MATSUOKA, S.; KURODA, Y. Endothelium-derived hyperpolarizing factor activates  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.32, n.4, p.642-9, 1998.

HAYNES, M. P.; SINHA, D.; RUSSELL, K. S.; COLLINGE, M.; FULTON, D.; MORALES-RUIZ, M.; SESSA, W. C.; BENDER, J. R. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. **Circulation Research**. v.87, p.677-682, 2000.

HILENSKI L. L.; CLEMPUS, R. E.; QUINN, M. T.; LAMBETH, J. D.; GRIENDLING, K. K. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, p.677–683, 2004.

HIRAI, H.; TANAKA, K.; YOSHIE, O.; OGAWA, K.; KENMOTSU, K.; TAKAMORI, Y.; ICHIMASA, M.; SUGAMURA, K.; NAKAMURA, M.; TAKANO, S.; NAGATA, K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **The Journal Experimental Medicine**, v.193, p.255– 261, 2001.

HIRATA, M.; KOHSE, K. P.; CHANG, C-H.; IKEBE, T.; MURAD, F. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.3, p.1268–1273, 1990.

HIRATA, T.; KAKIZUKA, A.; USHIKUBI, F.; FUSE, I.; OKUMA, M.; NARUMIYA, S. Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. **The Journal of Clinical Investigation**, v.94, p.1662–1667, 1994.

HOROWITZ, A.; MENICE, C. B.; LAPORTE, R.; MORGAN, K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews**, v.76, n.4, p.967-1003,1996.

IGARASHI, J.; MICHEL, T. Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways. **The Journal Of Biological Chemistry**, v.276, p.36281-36288, 2001.

IGNARRO, I. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circulation Research**, v.65, p.1-21, 1989.

\_\_\_\_\_. Haem-Dependent Activation of cytosolic Guanylate Cyclase by Nitric Oxide: a widespread Signal Transduction Mechanism, **Biochemical Society Transactions**, v.20, p.465-9, 1992.

IGNARRO, L. J.; HARBISON, R. G.; WOOD, K. S.; KADOWITZ, P. J.. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.237, p.893-900, 1986.

ILLIANO, S.; NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-Larginine in the canine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v.107, n.2, p.387-392, 1992.

INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.8, p.2863-7, 1989.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; MIHASHI, S. Labdane and bisnorlabdane type diterpenes from *Alpinia speciosa* K. Schum. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.11, 3452, 1980.

JIN, N.; PACKER, C. S.; RHOADES, R. A. Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle: cellular mechanisms. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.69, p.383-388, 1991.

JOHNS, A.; FREAY, A. D.; ADAMS, D. J.; LATEGAN, T. W.; RYAN, U. S.; VAN BREEMEN, C. Role of calcium in the activation of endothelial cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.12, p.S119-S123, 1988.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal, São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

JU, H.; ZOU, R.; VENEMA, V. J.; VENEMA R. C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.18522-18525, 1997.

KANNEL, W. B.; SCHWARTZ, M. J.; MCNAMARA, P. M. Blood pressure and risk of coronary hearth disease: the Framingham study. **Chest**, v.56, p.43-52, 1969.

KANNER, J.; HAREL, S.; RINA G. Nitric oxide as an antioxidant **Archives of biochemistry and biophysics – Elsevier**, v.289, n.1, p.130-136, 1991.

KAPLANSKI, G.; FARNARIER, C.; BENOLIEL, A.-M.; FOA, C.; KAPLANSKI, S.; BONGRAND, P. A novel role for E- and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. **Journal of Cell Science**, v.107, p.2449-2457, 1994.

- KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v.3, n.1, p.23-5, 1977.
- KATSUYAMA, M.; SUGIMOTO, Y.; NAMBA, T.; IRIE, A.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor, **Febs Letter**, v.344, n.1, p.74-78, 1994.
- KIECHELE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, v.100, p.567-75, 1993.
- KILPATICK, E. V.; COCKS, T. M. Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium-dependent relaxation of pig isolated coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v.112, p.557-65, 1994.
- KOENIGSBERGER, M.; SAUSER, R.; BÉNY.; J. L.; MEISTER, J.-J. Role of the Endothelium on Arterial Vasomotion **Biophysical Journal** v.88, p.3845–3854, 2005.
- KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; WILLIAMS, K. J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **American Journal of Botany**, v.89, n.10, p.1682-1696, 2002.
- KU, D. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. **Science**, v.218, p.576-578, 1982.
- KUKOVETZ, W. R.; HOLZMANN, S.; WURM, A.; POCH, G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. **Journal of cyclic Nucleotide Research**, v.5, p.469-476, 1979.
- KUKREJA, R. C.; KONTOS, H. A.; HESS, M. L.; ELLIS, E. F. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. **Circulation Research**, v.59, p.612–619, 1986.
- KUSAMA, N.; KAJIGURI, J.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y.; SUZUKI, Y.; KATSUYA H.; ITOH, T. Reduced hyperpolarization in endothelial cells of rabbit aortic valve following chronic nitroglycerine administration. **British Journal of Pharmacology**, v.146, p. 487–497, 2005.
- LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.17, p.323–330, n.3, 2003.
- LAHLOU, S.; GALINDO, C. A. B.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES M. C.; PINTO D. G. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**, v.68, n.12, p.1097-1102, 2002.

LARANJA, S. M.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Evaluation of acute administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.237-240, 1991.

\_\_\_\_\_. Evaluation of three plants with potential diuretic effect. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.38, n.1, p.13-16, 1992.

LAROIA, S. T.; GANTI, A. K.; LAROIA, A. T.; TENDULKAR, K. K. Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. **International Journal of Cardiology**. v.88, p.1-9, 2003.

LAVALLEE, M.; TAKAMURA, M.; PARENT, R.; THORIN, E. Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. **Heart Failure Reviews**, v.6, p. 265-76, 2001.

LAWLER, O. A.; MIGGIN, S. M.; KINSELLA, B. T. Protein kinase A mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to Gs, to Gi, and to Gq-coupled effector signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.33596-607, 2001.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p.207-213, 1999.

LEAL-CARDOSO, J. H.; MOREIRA, M. R.; DA CRUZ, G. M.; DE MORAIS, S. M.; LAHLOU, M. S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v.11, n.6, p.549-553, 2004.

LEE, M. R.; LI, L.; KITAZAWA, T. Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.72, p.5063-5068, 1997.

LEGSSYER, A.; ZIYYAT, A.; MEKHFI, H.; BNOUHAM, M.; HERRENKNECHT, C.; ROUMY, V.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; HOERTER, J. A.; FISCHMEISTER, R. Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta, **Phytotherapy Research**, v.18, p.889-894, 2004.

LEVAL, X. D.; HANSON, J.; DAVID, J. L.; MASEREEL, B.; PIROTE, B.; DOGNE, J. M. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators Part II: Prostacyclin Modulators. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n.10, p.1243-1252, 2004.

LEVIN, E. R. Endothelins. **The New England Journal of Medicine**, v.333, p.356-363, n.6, 1995.

LI, L.; FINK, G. D.; WATTS, S. W.; NORTHCOTT, C. A.; GALLIGAN, J. J.; PAGANO, P. J.; CHEN, A. F. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin (A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. **Circulation**, v.107, p.1053-1058, 2003.

- LI, L.; WATTS, S. W.; BANES, A. K.; GALLIGAN, J. J.; FINK, G. D.; CHEN, A. F. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. **Hypertension**, v.42, p.316–21, 2003.
- LI, Z.; AJDIC, J.; EIGENTHALER, M.; DU, X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. **Blood**, v.101, p.4423–4429, 2003.
- LIM, H.; PARIJA, B. C.; DAS, S. K.; DINCHUK, J. E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J. M.; DEY, S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v.91, n.2, p.197-208, 1997.
- LIN, L. Y.; PENG, C. C.; LIANG, Y. J.; YEH, W. T.; WANG, H. E.; YU, T. H.; PENG, R. Y. *Alpinia zerumbet* potentially elevates high-density lipoprotein cholesterol level in Hamsters, **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n.12, p.4435-4443, 2008.
- LIZASOAIN, I.; MORO, M. A.; KNOWLES, R. G.; DARLEY-USMAR, V.; MONCADA, S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. **Biochemical Journal**, v.314, p.877–880, 1996.
- LOBATO, A. M.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. F. S.; MAIA, J. G. S. Antimicrobial activity of essential oils from Amazonia. **Acta Amazonica**. v.19, p.355-364, 1989.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil - arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. São Paulo: Editora Plantarum, 1995.
- LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; RUIZ-STEWART, I.; KAZEROUNIAN, S.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52 n. 3, p.375-414, 2000.
- LÜCKHOFF, A.; POHL, U.; MÜLSCH, A.; BUSSE, R. Differential role of extra and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v.95, p.189–196, 1988.
- LUKSHA, L.; AGEWALL, S.; KUBLICKIENE, K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.202, n.2, p.330–44, 2009.
- LÜSCHER, R.; BOULANGER, C. M.; YANG, Z.; NOLL, G.; DOHI, Y. Interactions between endothelium-derived relaxing and contracting factors in health and cardiovascular disease. **Circulation**, v.87, n.5, p.V36–V44, 1993.
- LÜSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. **The endothelium modulator of cardiovascular function**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1990. p.1-228
- LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M. E.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio: doenças cardiovasculares**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003.



- LYLE, A. N.; GRIENGLING, K. K. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. **Physiology**, v.21, p.269–280, 2006.
- MACHADO, L. D. Alpinia. **Revista Natureza**, v.101, n.5, p.39-42, 1996.
- MADEIRA, S. V.; AUGER, C.; ANSELM, E.; CHATAIGNEAU, M.; CHATAIGNEAU, T.; SOARES DE MOURA, R.; SCHINI-KERTH, V. B. eNOS activation induced by a polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries. **Journal of Vascular Research**, v.46, n.5, p.406-16, 2009.
- MANN, G. E.; YUDILEVICH, D. L.; SOBREVIA, L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. **Physiological Reviews**, v.83: 183-252, 2003.
- MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v.27, n.24, p.8706-11, 1988.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v.78, p.927-30, 1994.
- MARTIN, W.; VILLANI, G. M.; JOTHIANANDAN, D.; FURCHGOTT, R. F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.232, n.3, p.708-16, 1985.
- MARTIN, W.; SMITH, J. A. Binding of nitrovasodilators and bovine retractor penis inhibitory factor by haemoglobin and methaemoglobin immobilized on agarose. **British Journal of Pharmacology Proc. Suppl.**, v.86, 567P, 1985.
- MASUDA, T.; FUJITA, N.; ODAKA, Y.; TAKEDA, Y.; YONEMORI, S.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H. Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.71, n.9, p.2316-20, 2007.
- MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.92, n.1, p.1–6, 2003.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza, Ceará, Brazil: Ed. Colônia: Imprensa Universitária, 2001. p.206–207
- \_\_\_\_\_. **Farmácias vivas**: sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 2.ed., Fortaleza: EUFC, 1994
- \_\_\_\_\_. **Plantas da medicina popular do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1999. 80p.

MATOS, F. J. A. **O formulário fitoterápico do Prof. Dias da Rocha**, 1 ed., 1987. p11-8, 205, (coleção ESAM, ano 20, v.18),

\_\_\_\_\_. **Plantas Medicinais: Boldo, Colônia e Menstrato**. Fortaleza: O Povo, 27 de jan., Universidade aberta, 1988.

MATOS, F. J. A.; CAVALCANTI, F. S.; QUEIROZ, M. F. F. B. Plantas da medicina popular do Ceará selecionadas pela maior frequência de seu uso. In: VIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 8, 1984, Manaus, AM. **Anais...** INPA, Universidade do Amazonas, 1984.

MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.358, p.127-133, 1998.

MCCORD, J. M; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244: 6049–6055, 1969.

MCDONALD, K.; ZHARIKOV, S.; BLOCK, E.; KILBERG, M. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric oxide synthase may explain the `arginine paradox. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.31213-31216, 1997.

MCGUIRE, J. J.; DING, H.; TRIGGLE, C. R. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.79, n.6, p.443–470, 2001.

MEININGER, G. A.; ZAWIEJA, D. C.; FALCONE, J. C.; HILL, M. A.; DAVEY, J. P. Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation. **The American Journal of Physiology**, v.261, p.H950–H959, 1991.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S.; FONTELES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, n.2, p.93-7, 1991.

MENDONÇA, V. L. M.; SANTOS, T. J. T.; OLIVEIRA, J. V.; FONTELES, M, C, Screening farmacológico geral de *Alpinia nutans*, In: X SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 1988. **Anais...**, Comm. 5/9: 13pp

MICHEL, J. B.; FERON, O.; SACKS, D.; MICHEL, T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by  $Ca^{2+}$ -calmodulin and caveolin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.15583–15586, 1997.

MICHEL, J. B.; FERON, O.; SASE, K.; PRABHAKAR, P.; MICHEL, T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.25907-25912, 1997.

MICHEL T.; FERON O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **The Journal of Clinical Investigation**, v.100, p.2146-52, 1997.

- MICHEL, T.; LI, G, K.; BUSCONI, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.6252–6256, 1993.
- MICHELL, B. J.; GRIFFITHS J. E.; MITCHELHILL, K. I.; RODRIGUEZ-CRESPO, I.; TIGANIS, T.; BOZINOVSKI, S.; DE MONTELLANO, P. R.; KEMP, B. E.; PEARSON, R. B. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. **Current Biology**, v.9, p.845–848, 1999.
- MICHELS, C. Endothelial cell functions, **Journal of Cellular Physiology**, v.196, n.3, p.430-443, 2003.
- MINEO, C.; YUHANNA, I. S.; QUON, M. J.; SHAUL, P. W. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.9142–9149, 2003.
- MINNEMAN, K. P. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell  $Ca^{2+}$ . **Pharmacological Reviews**, v.40, p.87–119, 1988.
- MISSIAEN, L.; WUYTACK, F.; RAEYMAEKERS, L.; DE SMEDT, H.; DROOGMANS, G. DECLERCK I, CASTEELS R.  $Ca^{2+}$  extrusion across plasma membrane and  $Ca^{2+}$  uptake by intracellular stores. **Pharmacology & Therapeutics**, v.50, p.191-232, 1991.
- MITSUI, T.; YOKOYAMA, S.; SHIMIZU, Y.; KATSUURA, M.; AKIBA, K.; HAYASAKA, K. Defective signal transduction through the thromboxane A2 receptor in a patient with a mild bleeding disorder: deficiency of the inositol 1,4,5-triphosphate formation despite normal G-protein activation. **Thrombosis Haemostasis**, v.77, p.991–995, 1997.
- MIWA, N. The current status of *Alpinia zerumbet* industry in Okinawa. **Aromatopia**, v.88, p.32–35, 2008.
- MOLHO-SABATIER, P. Endothelium et thrombose. **La Revue de Médecine Interne**, v.8, p.389-94, 1987.
- MOMBOULI, J. M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.31, p.61-74, 1999.
- \_\_\_\_\_. Endothelium-dependent hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.18, p.252-256, 1997.
- MOMBOULI, J. V.; ILLIANO, S.; NAGAO, T.; VANHOUTTE P. M. The potentiation of bradykinin-induced relaxations by perindoprilat in canine coronary arteries involves both nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Circulation Research**, v.71, p.137-44, 1992.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v.329, p.2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; KORBUT, R.; BUNTING, S.; VANE, J. Prostacyclin is a circulating hormone. **Nature**, v.273, p.767-768, 1978.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**, v.30, p.293-331, 1979.

MORAIS, N. M. T.; NOGUEIRA, C. M. D.; LOPES, M. F. G.; VASCONCELOS, N. M. S.; SÁ, M. J. H. C. Estudo inorgânico analítico de plantas medicinais. **Anais Associação Brasileira de Química**, v.44, n.4, p.14-19, 1995.

MORITA, M.; NAKANISHI, H.; MORITA, H.; MIHASHI, S.; ITOKAWA, H. Quantitative structure-spasmolytic activity relationships of terpenoids and their derivatives from *Alpinia speciosa*, *Alpinia japonica* and *Atractylodes lancea*. Department of Pharmacognosy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Hachioji, Tokyo, Japan. **Natural Medicines** (Tokyo), v.52, n.1, p.22-31, 1998.

MORITA, M.; NAKANISHI, H.; MORITA, H.; MIHASHI, S.; ITOKAWA, H. Structures and spasmolytic activities of derivatives from sesquiterpenes of *Alpinia speciosa* and *Alpinia japonica*. Dep. Pharmacognosy, Tokyo Univ. Pharmacy Life Sci., Hachioji, Japan. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.44, n.8, p.1603-1606, 1996.

MPALANTINOS, M. A.; DE MOURA, R. SOARES; PARENTE, J. P.; KUSTER, R. M., Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. **Phytoterapy Research**, v.12, p.442-444, 1998, (short communication).

MUELLER, C. F. H.; LAUDE, K.; MCNALLY, J. S.; HARRISON, D. G. Redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.25, p.274-278, 2005.

MUNZEL, T.; DAIBER, A.; ULLRICH, V.; MÜLSCH, A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.25, p.1551-1557, 2005.

MURAD, F. Shattuck Lecture: nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. **The New England Journal of Medicine**, v.355, n.19, p.2003-2011, 2006.

MURAKAMI, S.; SHIROTA, T.; HAYASHI, S.; ISHIZUKA, B. Aromatherapy for Outpatients with Menopausal Symptoms in Obstetrics and Gynecology **The Journal of Alternative and Complementary Medicine** v.11, n.3, p. 491-494, 2005.

MUTUNGA, M.; FULTON, B.; BULLOCK, R.; BATCHELOR, A.; GASCOIGNE, A.; GILLESPIE, J. I.; BAUDOUIN, S. V. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.163, p.195-200, 2001.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p.1102-7, 1992.

- NAKAGAWA, O.; TANAKA, I.; USUI, T.; HARADA, M.; SASAKI, Y.; ITOH, H.; YOSHIMASA, T.; NAMBA, T.; NARUMIYA, S.; NAKAO, K. Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. **Circulation**, v.90, p.1643–1647, 1994.
- NAKASHIMA, M.; MOMBOULI, J. V.; TAYLOR, A. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. **The Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.2867-71, 1993.
- NAMBA, T.; OIDA, H.; SUGIMOTO, Y.; KAKIZUKA, A.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. **Journal Biological Chemistry**, v.269, p.9986–9992, 1994.
- NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structure, properties, and functions. **Physiological Reviews**, v.79, p.1193-226, 1999.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB Journal**, v.6, p.3051-3064, 1992.
- NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, M.; LOBYSHEVA, I.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols-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 **The FASEB Journal**, v.19, p.455-457, 2005.
- NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; STOCLET, J. C.; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols cause endothelium dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.310, p.371–377, 2003.
- NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.1131–1136, 2004.
- NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v.55, p.69-102, 1986.
- NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology**, 268: C799–C822, 1995.
- NIEDERHOFFER, N.; SZABO, B. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in the EDHF-dependent vasorelaxation in rabbits. **British Journal of Pharmacology**, v.126, p.1383–1386, 1999.
- NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiological Reviews**, v.81, p.1415–1459, 2001.

- NOHL, H.; KOZLOV, A. V.; GILLE, L.; STANIEK, K. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. **Biochemical Society Transactions**, v.31, p.1308–1311, 2003.
- NOLLY, H.; DAMIANI, M. T.; MIATELLO, R. Vascular-derived kinins and local control of vascular tone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1995-2011, 1994.
- OKOMOTO, T.; SCHLEGEL, A.; SCHERER, P.; LISANTI, M. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing `preassembled signaling complexes` at the plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.5419-5422, 1998.
- ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacology Therapeutics**, v.69, p.153–71, 1996.
- PACAUD, P.; LOIRAND, G. Release of  $Ca^{2+}$  by Noradrenaline and ATP from the *same*  $Ca^{2+}$  store sensitive to both InSP3 and  $Ca^{2+}$  in rat portal vein myocytes. **The Journal of Physiology**, v.484, n.3, p.549- 555, 1995.
- PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxid from L-arginine. **Nature**, v.333, p.664-666, 1988.
- PAREKH, A. B.; PUTNEY, J. W. J. R. Store-operated Calcium Channels. **Physiological reviews**, v.85, n.2, p.757-818, 2005.
- PASSOS, V. M. A.; ASSIS, T. D.; BARRETO, S. M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.15, n.1, p.35– 45, 2006.
- PAULI, B. U.; AUGUSTIN-VOSS, H. G.; EL-SABBAN, M. E.; JOHNSON, B. C.; HAMMER, D. A. Organ preference of metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.9, n.3, p.175-189, 1990.
- PEDRAZA-CHAVETI, J.; TAPIA, E.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; GRANADOS, M.; FRANCE, M. Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis, **Life Scienses**, v.62, p.71–77, 1998.
- PEREDO, H. A.; ADLER-GRASCHINSKY, E. Effects of eicosanoids and nitric oxide on the noradrenaline-induced contractions in the rat mesenteric bed. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v.20, p.162–170, 2000.
- PHILIPSON, K. D. Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicles. **Annual Review of Physiology**, v.47, p.561-571, 1985.
- PINTO, N. V.; ASSREUY, A. M. S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CECCATTO, V. M.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Short communication: Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats, **Phytomedicine**, v.16, p.1151–1155, 2009.

- PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research**, v.39, p.77–88, 1998.
- PLUMPTON, C.; CHAMPENEY, R.; ASHBY, M. J.; KUC, R. E.; DAVENPORT, A. P. Characterization of endothelin isoforms in human heart: Endothelin-2 demonstrated. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.22, n.8, p.S26–S28, 1993.
- POHL, U.; BRESSE, R.; BASSENNGE, G. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow *in vivo*. **Hypertension**, v.8, p.37-44, 1986.
- POLLMAN, M. J.; YAMADA, T.; HORIUCHI, M.; GIBBONS, G. H. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. **Circulation Research**, v.79, n.4, p.748-56, 1996.
- POPP, R.; BAUERSACHS, SAUER E.; HECKER M.; FLEMING I.; BUSSE R. **The cytochrome P450 monooxygenase pathway and nitric oxide-independent relaxations**. In: VANHOUTTE P. M. (ed.). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. The Netherlands, Harwood: Academic Publishers, p.65-71, 1999.
- POPP, R.; BRANDES, R. P.; OTT, G.; BUSSE, R.; FLEMING, I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. **Circulation Research**, v.90, p.800-806, 2002.
- PRABHAKAR P.; THATTE H. S.; GOETZ R. M.; CHO M. R, GOLAN D. E.; MICHEL T. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.27383-27388, 1998.
- PRICE, D. T.; VITA, J. A.; KEANEY, J. F. JR. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.2, p.919–935, 2000.
- PRIOR, H. M.; WEBSTER, N.; QUINN, K.; BEECH, D. J.; YATES, M. S. K<sup>+</sup>-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. **Cardiovascular Research**, v.37, p.780–790, 1998.
- PRUDENT D.; PERINEAU F.; BESSIERE J. M.; MICHEL G.; BRAVO R. Chemical Analysis, Bacteriostatic and Fungistatic Properties of the Essential Oil of the Atoumau from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum.). **Journal of Essential Oil Research**, v.5, n.3, p.255-264, 1993.
- PUTNEY, J. W. J. R. A model for receptor-regulated calcium entry. **Cell Calcium**, v.7, p.1-12, 1986.
- PYKE, K. E.; TSCHAKOVSKY, M. E. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. **The Journal of Physiology**, v.568, p.357–369, 2005.
- QUAYLE, J. M.; BONEV, A. D.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcitonin gene-related peptide activated ATPsensitive K<sup>+</sup> currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. **Journal of Physiology**, v.475, p.9-13, 1994.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.12, p.87–88, 1991.

RANDALL, M. D.; ALEXANDER, S. P. H.; BENNETT, T.; BOYD, E. A.; FRY, J. R.; GARDINER, S. M.; KEMP, P. A.; MCCULLOCH, A. I.; KENDALL D. A. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.229, p.114-20, 1996.

RANDALL, M. D.; KENDALL, D. A. Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. **European Journal of Pharmacology**, v.335, p.205-9, 1997.

RANDALL M. D, MCCULLOCH A. I, KENDALL D. A. Comparative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat isolated mesentery. **European Journal of Pharmacology**, v.333, p.191-197,1997.

RAPAPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v.306, p,174-6, 1983.

RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Agonist induced endotheliumdependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circulation Research**, v.52, n.3, p.352-7, 1983.

REMBOLD, C. M. **Electromechanical and pharmacomechanical coupling**. In: BARANY, M. (Ed.). *Biochemistry of smooth muscle contraction*. Chicago: Academic Press, 1996. p. 227-239.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger **Experimental & Molecular Medicine**, v.31, p.53–59, 1999.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; ROSE, L.; BURING, J. E.; COOK, N. R. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. **The New England Journal of Medicine**, v.347, p.1557–1565, 2002.

RIOBO, N. A.; CLEMENTI, E.; MELANI, M.; BOVERIS, A.; CADENAS, E.; MONCADA, S.; PODEROSO, J. J. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. **Biochemical Journal**, v.359, p.139–145, 2001.

RIZVI, M. A.; MYERS, P. R. Nitric oxide modulates basal and endothelin-1-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.29, n.7, p.1779-89, 1997.

RODRÍGUEZ-CRUZ, M. E.; PÉREZ-ORDAZ, L.; SERRATO-BARAJAS, B. E.; JUARÉZ-OROPEZA, M. A.; MASCHER, D.; PAREDES-CARBAJAL, M. C. Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus*



*calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. **Journal Ethnopharmacology**, v.86, p.213–18, 2003.

ROSADO, J. A. Discovering the mechanism of capacitative calcium entry. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.291, p.1104-1106, 2006.

ROSS, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v.340, n.2, p.115-26, 1999.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.250, p.H222–H227, 1986.

SÁ, L. D. DE; XAVIER, F., L.; PAULO, M. DE Q.; LIMA, E. DE O. Estudo sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias causadoras de conjutivite, **Centro de Ciências da Saúde**, v.13, n.1, p.13-17, 1994.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, Lond. v.348, n.6303, 732–735, 1990.

SAMUELSSON, B.; GOLDYNE, M.; GRANSTRÖM, E.; HAMBERGET, M.; HAMMARSTROM, S.; MALMSTEN, C. Prostaglandins and thromboxanes. **Annual Review of Biochemistry**, v.47, p.997-1029, 1978.

SANDERS, D. B.; KELLEY, T.; LARSON, D. The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. **Perfusion**, v.15, p.97–104, 2000.

SANTANA, C. F.; PINTO, K. V.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Estudos farmacológicos de antiinflamatórios de alguns vegetais. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v.6, n.1/2, p.75-89, 1966.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1.8-cineole. a terpenoid oxid present in many plant essential oil. **Phytotherapy research**, v.14, p.240-244, 2000.

SCHRAMMEL, A.; BEHRENDTS, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Molecular Pharmacology**, v.50, n.1, p.1-5, 1996.

SCOTT-BURDEN, T.; VANHOUTTE, P. M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. **Circulation**, v.87, n.5, p.V51-V55, 1993.

SESSA, W. C. eNOS at a glance. **Journal of Cell Science**, v.117, p.2427-2429, 2004.

SHESKI, F. D.; NATARAJAN, V.; POTTRATZ, S. T. Tumor necrosis factor-alpha stimulates attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.133, n.3, p.265-273, 1999.

SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.25, p.1767–1775, 2005.

SHIMOKAWA, H.; YASUTAKE, H.; FUJII, K.; OWADA, M. K.; NAKAIKE, R.; FUKUMOTO, Y.; TAKAYANAGI, T.; NAGAO, T.; EGASHIRA, K.; FUJISHIMA, M.; TAKESHITA, A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.28, p.703–711, 1996.

SIMONSON, M. S.; OSANAI, T.; DUNN, M. J. Endothelin isopeptides evoke  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and oscillations of cytosolic free  $[\text{Ca}^{2+}]$  in human mesangial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1055, n.1, p.63–8, 1990.

SMART, E. J.; GRAF, G. A.; MCNIVEN, M. A.; SESSA, W. C.; ENGELMAN, J. A.; SCHERER, P. E.; OKAMOTO, T.; LISANTI, M. P. Caveolins, Liquid-Ordered Domains, and Signal Transduction. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n.11, p.7289-7304, 1999.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, v.69, 145–182, 2000.

SOBEY, C. G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.21, n.1, p.28-38, 2001.

SOMLYO, A. P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of Smooth Muscle. **Circulation Research**, v.57, n.4, p.479-507, 1985.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.18, p.138-43, 1994.

\_\_\_\_\_. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics** v.159, p.129-145, 1968.

SPERELAKIS, N. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth muscle. In: SPERELAKIS, N.; BANKS, R. O. **Physiology**, (Ed.), Boston: Little Brown, 1993.

SPISNI, E.; GRIFFONI, C.; SANTI, S.; RICCIO, M.; MARULLI, R.; BARTOLINI, G. TONI, M.; ULLRICH, V.; TOMASI, V. Colocalization prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) synthase-caveolin-1 in endothelial cells and new roles for PGI<sub>2</sub> in angiogenesis. **Experimental Cell Research**, v.266, p.31-43, 2001.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for leukocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v.76, p.301, 1994.

STOCLET, J-C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M. H. E.; BEDOUI, J. CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, v.500, n.1-3, p.299–313, 2004.

STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, p.243–270, 2006.

STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. **Biochemistry**, v.34, n.45, p.14688-14674, 1995.

STORK, A. P.; COCKS, T. M. Pharmacological reactivity of human epicardial coronary arteries: phasic and tonic responses to vasoconstrictor agents differentiated by nifedipine. **British Journal of Pharmacology**, v.113, n.4, p.1093-1098, 1994.

STUEHR, D. J.; SANTOLINI, J.; WANG, Z. Q.; WEI, C. C.; ADAK, S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279: p.36167–36170, 2004.

SUZUKI, Y. J.; FORD, G. D. Superoxide stimulates IP3-induced  $Ca^{2+}$  release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.262, p.H114–H116, 1992.

TANSEY, M. G.; LUBY-PHELPS, K.; KAMM, K. E.; STULL, J. T.  $Ca^{2+}$ -dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the  $Ca^{2+}$  sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.13, p.9912-9920, 1994.

TAWATA, S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. Syntheses and biological activities of dihydro-5,6-dehydrokawain derivatives. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.60, n.10, p.1643-1645, 1996.

TAYLOR, S. G.; SOUTHERTON, J. S.; WESTON, A. H.; BAKER, J. R. J. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. **British Journal of Pharmacology**, v.94, p.853-863, 1988.

TEERLINK, J. R.; BREU, V.; SPRECHER, U.; CLOZEL, M.; CLOZEL, J. P. Potent vasoconstriction mediated by endothelin ETB receptors in canine coronary arteries. **Circulation Research**, v.74, p.105-114, 1994.

TENG, C. M.; HSU, S. Y.; LIN, C. H.; YU, S. M.; WANG, K. J.; LIN, M. H.; CHEN, C. F. Antiplatelet action of dehydrokawain derivatives isolated from *Alpinia speciosa* rhizoma. **Chinese Journal of Physiology**, v.33, n.1, p.41-48, 1990.

THOMAS, S. R.; CHEN, K.; KEANEY, J. F Jr: Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.6017–6024, 2002.

TOMLINSON, P. B. Commelinales - Zingiberales. p. 341-359. In: METCALFE, C. R. **Anatomy of the monocotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1969.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.373-80, 2005.

- TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Activation of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger modulates angiotensin II-stimulated Na<sup>+</sup>-dependent Mg<sup>2+</sup> transport in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. **Hypertension**, v.34, p.442–449, 1999.
- ULLRICH, V.; BACHSCHMID, M. Superoxide as a messenger of endothelial function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.278, p.1–8, 2000.
- URAKAMI-HARASAWA, L.; SHIMOKAVA, H.; NAKASHIMA, M.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **The Journal of Clinical Investigation**, v.100, p.2793-9, 1997.
- USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer letters**, v. 266, p.37-52, 2008.
- VALDIVIA, C.; VAUGHAN, D.; POTTER, B. V.; CORONADO, R. Fast release of Ca<sup>2+</sup> induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle: evidence for two types of Ca<sup>2+</sup> release channels. **Biophysical Journal**, v.61, n.5, p.1184-1193, 1992.
- VAN DE VOORDE, J.; LEUSEN, I. Role of endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. **European Journal of Pharmacology**, v.87, p.113-120, 1983.
- VAN HINSBERGHM, V. W. M. Endothelial permeability for macromolecules: mechanistic aspects of pathophysiological modulation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.17, p.1018-1023, 1997.
- VAN RENTERGHEM, C.; VIGNE, P.; BARHANIN, J.; SCHMID-ALLIANA, A.; FRELIN, C.; LAZDUNSKI, M. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.157, p.977–985, 1988.
- VANDERLINDE, F. A. **Ação hipotensora e outras atividades farmacológicas do extrato aquoso da *A. speciosa* Schum (colônia)**. 1990, Dissertação (Mestrado), Escola Paulista de medicina, São Paulo 1990.
- VANDERLINDE, F. A. ; SOUCCAR, C. and LAPA, A. J. Atividade farmacológica do extrato de *Alpinia speciosa* Schum. In: IX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1986, **Anais**. Comm. 36, 9, Rio de Janeiro – RJ. 1986
- VANE, J. R.; ANGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **The New England Journal of Medicine**, v.323, p.27-36, 1990.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Endothelium-derived vasoactive factors and the control of the circulation. **Seminars in Perinatology**. v.15, p.4-10, 1991.
- VANHOUTTE P. M. Endothelial dysfunction in hypertension. **Journal of hypertension**, suplemento 5, S83-S93, 1996

VANHOUTTE P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **The Netherlands, Harwood Academic Publishers**, 1-305, 1999.

VANHOUTTE, P. M.; FÉLÉTOU, M. Existence of multiple endothelium-derived hyperpolarizing factor(s)?. In: VANHOUTTE P. M. (ed.). **Endothelium-derived hyperpolarizing factor**. The Netherlands, Harwood: Academic Publishers, 1999. P.303-5.

VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M.; Mombouli, J. V. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. **American Journal of Cardiology**, v.76, p.3E-12E, 1995.

VANHOUTTE, P. M.; KATUSIC, Z. S. Endothelium-derived relaxing and contracting factors **The FASEB Journal**, v.3, n.9, p.2007-2018, 1989.

VASCONCELOS, N. M. S.; ALMEIDA, M. M. B.; LOPES, M. F. G.; NOGUEIRA, C. M. D.; MORAIS, N. M. T. Plantas Medicinais: Um estudo analítico. **Anais Associação Brasileira de Química**, v.49, n.3, p.115-118, 2000.

VENEMA, R. C.; SAYEGH, H. S.; KENT, J. D.; HARRISON, D. G. Identification, Characterization, and Comparison of the Calmodulin-binding Domains of the Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases. **The Journal Of Biological Chemistry**, v.271, n.11, p. 6435–6440, 1996.

VIEIRA J. E. V. MATOS F. J. A. BARROS G. S. SOUZA M. P., MEDEIROS, M. C.; MEDEIROS M. J. Pharmacological study of plants from northeastern Brasil II. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.49, p.67-75, 1968.

VOLDSTEDLUND, M.; VINTEN, J.; TRANUM-JENSEN, J. cav-p60 expression in rat muscle tissues. Distribution of caveolar proteins. **Cell and Tissue Research**, v.306, p.265–276, 2001.

VRINTS, G.; HERMAN, A. G. Role of the endothelium in the regulation of coronary artery tone. **Acta Cardiologica**, v.46, p.399-418, 1991.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Biochemical mechanism underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.12, n.5, p.S115-S118, 1988.

WANG, Y-C; HUANG, T-L. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.43, n.2: p.295-300, 2005.

WATERHOUSE, A. L. Wine phenolics. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.957, p.21–36, 2002.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v.27, n.1-4, p.201-6, 2003.

- WELCH, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide and cardiovascular system. **Journal of Cardiac Surgery**, v.9, p.361-371, 1994.
- WENNMALM, A. Endotelial nitric oxid and cardiovascular disease. **Journal of Internal Medicine**, v.235, p.317-327, 1994.
- WINTERS, G. Jardinagem - Zingiberáceas, **Revista Natureza**, v.91, n.7: p.14-23, 1995.
- WISE, H.; JONES, R. L. Focus on prostacyclin and its novel mimetics. **Trends in Pharmacological Sciences**, 17: 17-21, 1996.
- WOLIN, M. S.; AHMAD, M.; GUPTA S. A. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: Basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.289, p.L159–L173, 2005.
- WU, X.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.220, p.658-63, 1996.
- XU H.; DONG, H.; SIM, K. Labdane diterpenes from *Alpinia zerumbet*. **Phytochemistry**, v.42, n.1, p.149-51, 1996.
- YAMAWAKI, H.; SATO, K.; HORI, M.; OZAKI, H.; KARAKI, H. Platelet-derived growth factor causes endothelium-independent relaxation of rabbit mesenteric artery via release of a prostanoid. **British Journal of Pharmacology**. v.131, p.1546–1552, 2000.
- ZAFARI, A. M.; USHIO-FUKAI, M.; AKERS, M.; YIN, Q.; SHAH, A.; HARRISON, D. G.; TAYLOR, W. R.; GRIENGLING K. K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. **Hypertension**, v.32, p.488–495, 1998.
- ZIYYAT, A; MEKHFI, H.; BNOUHAM, M.; TAHRI, A.; LEGSSYER, A.; HOERTER, J.; FISCHMEISTER, R. Arbutus unedo induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta, **Phytotherapy Research**. v.16, p.572–575, 2002.
- ZOGHBI, M. D. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) Schum. **Flavour and Fragrance Journal**, v,14, n.6, p.411-414, 1999.
- ZOU, M. H.; COHEN, R. A.; ULLRICH, V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Endothelium**, v.11, n.2, p.89–97, 2004.