

HERALDO GUEDIS LOBO FILHO

EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Alpinia zerumbet NO INFARTO DO MIOCÁRDIO INDUZIDO POR
ISOPROTERENOL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Doutor. José Glauco Lobo Filho

FORTALEZA
2011

L783p Lobo Filho, Heraldo Guedis

Pré-condicionamento com óleo essencial de *Alpinia zerumbet* no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos / Heraldo Guedis Lobo Filho. – Fortaleza, 2011.

111 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia; Fortaleza-CE, 2011.

1. Infarto do Miocárdio 2. Isoproterenol 3. Plantas Medicinais 4. Estresse Oxidativo I. Lobo Filho, José Glauco (Orient.) II. Título.

CDD: 616.1237

HERALDO GUEDIS LOBO FILHO

EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Alpinia zerumbet NO INFARTO DO MIOCÁRDIO INDUZIDO POR
ISOPROTERENOL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em: 21/01/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor. Ricardo Reges Maia de Oliveira
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Doutor. Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Doutor. José Glauco Lobo Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, criador do universo e da vida, que me permitiu nascer em berço de amor e rodeado de almas e mentes virtuosas, que me fez médico e homem, que me conduziu ao encontro da ciência, da busca da verdade e de minha mulher e que me permitiu gerar uma vida.

À parcela da humanidade que conspira para o bem.

Ao meu bisavô João Otávio Lobo, formado médico em 1917 na Universidade Federal do Rio de Janeiro, e que mesmo não compartilhando de sua existência, guardo em mim fortemente a admiração por suas claras virtudes morais e intelectuais que certamente moldaram e continuam moldando o caráter e a personalidade de seus descendentes.

Ao meu bisavô Jose Ramos Torres de Melo, verdadeiro patriarca na condução de sua família, que ao lado de minha bisavó Edite agregou filhos, netos e bisnetos numa convivência verdadeiramente fraterna.

Ao meu bisavô Rui Guedes, que graças aos relatos de suas ações, fortaleceu em mim os sentimentos de espiritualidade e retidão de caráter.

Ao meu avô José Glauco Bezerra Lobo, que para mim é símbolo da agregação de belas e grandes virtudes. Guardo em minha mente o exemplo da força de sua natureza.

A minha avó Artamilce, incansável e enfrentadora nas batalhas da vida. Mestre e doutora na educação baseada no exemplo. Um sol a iluminar nossa família.

Ao meu avô Leão Humberto Monzuma Santiago, estudioso voraz do comportamento humano. Mente repleta de conhecimentos históricos, literários e filosóficos, que emanava simplicidade e paz.

A minha avó Stael, também serena e resiliente frente às adversidades da vida. Mantém a cabeça erguida e a fé inabalável, numa demonstração de que o espírito não envelhece.

Ao meu pai Heraldo Guedis Lobo, pai por natureza, que, mediante uma educação e convivência baseadas no afeto e na verdade, formou mais que filhos, formou admiradores do bem e da paz.

A minha admirável mãe Maria Stael. Poço de bondade e desapego material. Desenvolveu em mim o hábito do estudo disciplinado. Mãe, mulher e médica devotada, é, sem dúvida, um instrumento de Deus para a promoção da bondade na Terra.

As minhas queridas irmãs Juliana e Nayana, fontes inesgotáveis de amor fraterno. Sou um admirador da pureza e do idealismo de seus corações. Se todos fossem iguais a vocês...

Aos meus amigos do peito, representados aqui pelos caríssimos Felipe Bezerra, Emanuel Carneiro e Felipe Sydrião (*in memoriam*). Aprendi o que é amizade com vocês. Mesmo distantes, cada um construindo sua caminhada em diferentes cidades, países ou planos espirituais, estamos unidos pelo laço da amizade verdadeira, que independe da distância, do tempo ou da morte.

A minha mulher Patrícia Leal Dantas Lobo, que me dá a mão e me põe de pé quando caio ou penso em sentar. Que me faz enxergar que uma batalha aparentemete perdida é só uma fase para se completar a missão. Mostra-me diariamente que todo sonho é possível, quando se tem amor, fé e devoção. É mais do que o meu amor, é o conjunto de tudo que me faz bem.

A minha filha Sarah Maria, que em poucos dias chegará ao nosso mundo me presenteando com a faculdade de ser pai, me pondo numa nova etapa da vida, certamente ainda mais bela e acalentadora.

Ao Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho, tio, amigo e incentivador... O Dr. Glauco é um perfeccionista na condução dos pequenos aos grandes atos; é um observador atento e perspicaz do que lhe chega aos sentidos, processando informações com clareza e simplicidade geniais; demonstra que a força do trabalho voltado para o bem e o desenvolvimento traz ao executor a recompensa, sendo a maior delas o crescimento pessoal; mostra que o aperfeiçoamento é gradual e processual e que cada etapa é um alicerce importante a ser bem concretizado; demonstra que a excelência e a modéstia, o conhecimento e a dúvida, a força e delicadeza, o bem e o cuidado com o mal devem andar juntos e inseparáveis; é um homem com uma amplitude de pensamento superior ao que se estabelece em nosso meio e em nosso tempo.

Agradeço por todos os esses anos de convivência e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Professor Associado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Coordenador do Programa de Pós-graduação *stricto sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação nas suas atividades neste programa e pelo apoio e incentivo para elaboração desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO, Professor Associado das disciplinas de Farmacologia Clínica e Oncologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela crença de que a adoção deste modelo experimental, novo em nosso meio, pudesse ser levada adiante em parceria com uma linha de pesquisa em fitoterápicos desenvolvida no Departamento de Farmacologia.

Ao Prof. Dr. FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU, pelos ensinamentos acerca dos cuidados e de técnicas para o manuseio dos animais em laboratório, pelo incentivo e pelas idéias durante toda a execução deste trabalho.

Ao colega Médico Patologista Clínico Dr. HEITOR RIBEIRO FILHO, diretor do Laboratório de Análises Clínicas Evandro Chagas, pela realização de todos os exames séricos desta pesquisa. Agradeço ainda pela forma acolhedora e amiga com a qual fui recebido em seu local de trabalho.

À Profa. Dra. FLAVIA ALMEIDA SANTOS, Professora Adjunta de Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por disponibilizar o Laboratório de Produtos Naturais para que pudéssemos realizar medidas marcadores do estresse oxidativo.

À Farmacêutica e Doutoranda em Farmacologia TALITA CAVALCANTE MORAIS, pela dedicação e cuidado nas mensurações dos níveis de marcadores do estresse oxidativo.

Ao Prof. Dr. JOSÉ TELMO VALENÇA JUNIOR, Professor Associado de Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela presteza, competência e agilidade no preparo e leitura dos estudos histopatológicos realizados neste trabalho.

A Pesquisadora e Doutoranda em Farmacologia ALINE MARIA ARAÚJO MARTINS, pelo incentivo em aumentar a abrangência e complexidade desta pesquisa.

Ao Funcionário da Universidade Federal do Ceará Sr. Bento, pela colaboração insubstituível para os cuidados com os animais envolvidos na pesquisa, bem como com o Laboratório de Cirurgia Experimental.

Ao Médico Dr. EDUARDO REBOUÇAS DE CARVALHO, um colega e colaborador incansável em atividades de estudo e pesquisa, pela ajuda no tratamento estatístico deste trabalho.

Aos Estudantes de Medicina da Universidade Federal do Ceará NESTOR LEMOS FERREIRA, PEDRO BARBOSA CORDEIRO NETO, RAFAEL BEZERRA DE SOUZA, RODRIGO BARBOSA DE AZEVEDO, CARLOS TAIRO DIÓGENES HOLANDA, JOÃO TARCISIO ALVES MAIA FILHO e TIAGO MAGALHÃES FREIRE pela ajuda, motivação e injeções de esperança constantes em toda a evolução desta pesquisa.

Aos colegas e amigos de equipe de Cirurgia Cardiovascular Dr. ROBERTO AUGUSTO CARNEIRO DE MESQUITA LOBO, Dr. GERALDO SILVEIRA, Dr. FERNANDO SANTIAGO, Dr. JULIO ALEXANDRE e Dr. KÉRCIO ARAGÃO, sob chefia do Dr. GLAUCO LOBO, pela convivência na qual tantas coisas aprendi.

Às Secretárias do Programa de Pós-graduação *stricto sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA E MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, Secretárias da UNIFAC, FÁBIA BESERRA LIMA E MARIA TERESA ROCHA, Secretárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará ADELÂNIA ROQUE MARINHO E SHEYLA PRADO DOS SANTOS e a Técnica de Laboratório, também deste Departamento, SILVANA FREIRE DE FRANÇA, por auxílios fundamentais à efetivação desta pesquisa.

“A virtude é difícil de se manifestar,
precisa de alguém para orientá-la e dirigi-la. Mas
os vícios são aprendidos sem mestre.”

Lucius Annaeus Sêneca

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM), definido como a morte do músculo cardíaco decorrente de isquemia, é um dos diagnósticos mais comuns em pacientes hospitalizados nos países industrializados. Para se estudar efeitos de drogas sobre a injúria miocárdica decorrente de IAM, um dos modelos experimentais bastante utilizado é a indução de infarto do miocárdio (IM) com administração de isoproterenol em ratos, uma vez que esta substância causa uma lesão miocárdica semelhante a observada em IAM nos humanos. Nesse estudo o óleo essencial de *Alpinia zerumbet*, na dose de 100 mg/kg de peso, administrado por catorze dias consecutivos, foi avaliado no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol (150 mg/kg de peso do animal) em ratos wistar. A injúria miocárdica induzida pelo isoproterenol foi indicada pela elevação de marcadores de injúria miocárdica, como TGO e troponina I, redução dos níveis de catalase e glutatona, bem como por alterações histopatológicas avaliadas no ápice do ventrículo esquerdo. Avaliou-se ainda a mortalidade, os níveis de hemoglobina, contagem de leucócitos e neutrófilos e níveis de marcadores da função renal. O pré-tratamento com o óleo essencial de *Alpinia zerumbet* apresentou efeitos protetores no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos, uma vez: atenuou as elevações de TGO e troponina I; atenuou a elevação do número de neutrófilos; preservou os níveis de catalase no miocárdio e preservou os níveis de glutatona no miocárdio. No entanto, não exerceu efeitos sobre: mortalidade, variação do peso dos animais; níveis séricos de TGP; níveis séricos de hemoglobina e contagem de leucócitos; níveis séricos de marcadores da função renal; alterações histopatológicas no ápice do ventrículo esquerdo. Os prováveis mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos benéficos deste óleo em reduzir o grau de injúria miocárdica neste modelo experimental podem estar relacionados a propriedades antioxidantes e em aumento dos níveis de óxido nítrico.

Palavras-chave: infarto do miocárdio, isoproterenol, *Alpinia zerumbet*

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI), defined as death of the cardiac muscle after an ischemic process, is worldwide known for its frequent diagnosis within hospitalized patients in modern industrialized countries. Myocardial infarction induced by isoproterenol (ISO) in rats is a very useful assay to study the effect of drugs on myocardial injury as a result of AMI, once its administration is responsible for a post-infarction human-like myocardial lesion. In this study, essential oil of *Alpinia zerumbet* (EOAZ), at a dose of 100 mg / kg, administered for fourteen consecutive days, was assessed in myocardial infarction induced by ISO (150 mg / kg bodyweight) in Wistar rats. The myocardial injury induced by ISO was indicated by elevated markers of myocardial injury, such as AST and troponin I, reduced levels of catalase and glutathione, as well as histopathological changes evaluated at the apex of the left ventricle. It was also evaluated mortality, hemoglobin levels, leukocyte and neutrophil counts and levels of markers of renal function. Pretreatment with the EOAZ showed protective effects on myocardial infarction induced by isoproterenol in rats, as attenuated the elevation of AST, Troponin I, attenuated the increased number of neutrophils; preserved the levels of catalase in the myocardium and preserved glutathione levels in the myocardium. However, do not exert any effects on mortality, weight variation of animals, serum ALT, serum levels of hemoglobin and white blood cell count, serum markers of renal function, histopathological changes in left ventricular apex. The probable mechanisms of action responsible for the beneficial effects of this oil in reduce the degree of myocardial injury in this experimental model may be related to antioxidant properties and increased levels of nitric oxide.

Key –words: myocardial infarction, isoproterenol, *Alpinia zerumbet*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1. Mecanismo de ação dos sistemas de proteção enzimático
- FIGURA 2. Fórmula química do isoproterenol
- FIGURAS 3 e 4. Fotos ilustrativas de *Alpinia zerumbet*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
- FIGURA 5. Fórmula química do terpinen-4-ol
- FIGURA 6. Fórmula química do 1,8-cineol
- FIGURA 7. Fórmula química do γ -terpineno
- FIGURA 8. Aplicação intraperitoneal das drogas anestésicas
- FIGURA 9. Dissecção da aorta abdominal
- FIGURA 10. Punção da aorta abdominal com jelco
- FIGURA 11. Coleta da amostra de sangue no interior da seringa
- FIGURA 12. Armazenamento da amostra de sangue em frascos específicos
- FIGURA 13. Níveis de transaminases (U/L) nos dois grupos do estudo piloto representados pela média e desvio padrão
- FIGURA 14. Níveis de troponina (ng/ml) nos dois grupos do estudo piloto
- FIGURA 15. Estudo histopatológico demonstrando tecido miocárdico com ausência de alterações histológicas (Grau 0)
- FIGURA 16. Estudo histopatológico demonstrando tecido miocárdico com alterações histológicas leves (Grau 1)
- FIGURA 17. Estudo histopatológico demonstrando tecido miocárdico com alterações histológicas moderadas (Grau 2)
- FIGURA 18. Estudo histopatológico demonstrando alterações histológicas acentuadas (Grau 3)
- FIGURA 19. Níveis de transaminases (U/L) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão
- FIGURA 20. Níveis de troponina (ng/ml) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão
- FIGURA 21. Níveis de hemoglobina (g/dL) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão
- FIGURA 22. Contagem de leucócitos/mm³ nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão

FIGURA 23. Contagem de neutrófilos/mm³ nos quatros grupos representada pela média e desvio padrão

FIGURA 24. Níveis de uréia (mg/dL) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão

FIGURA 25. Níveis de creatinina (mg/dL) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão

FIGURA 26. Atividade da catalase (mmol/min.g) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão

FIGURA 27. A concentração de glutathiona (NP-SH µg/g de tecido) nos quatros grupos representada pela média e desvio padrão

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores da média \pm desvio padrão dos pesos dos animais, nos quatro grupos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Acil coenzima A colesterol aciltransferase
Ach	Acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CIN	Cineol
CK	Creatina fosfoquinase
CK-MB	Creatinoquinase fração MB
COMT	Catecol-Orto-metil transferase
CT	Colesterol total
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
HO	Radical hidroxila
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IM	Infarto do miocárdio
ISO	Isoproterenol
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAO	Monoaminoxidase
NOs	Enzima óxido nítrico sintase
O ₂	Radical superóxido
OEAZ	Óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RO	Radical alcóxila
ROO	Radical peróxila
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOD	Superóxido desmutase
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGO	Transaminase glutâmico-pirúvica
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Infarto agudo do miocárdio	17
1.1.1. Histórico	17
1.1.2. Epidemiologia	18
1.1.3. Patogenia	18
1.2. Lesão celular isquêmica	20
1.3. Estresse oxidativo	23
1.3.1. Espécies reativas de oxigênio	24
1.3.2. Espécies reativas de nitrogênio	27
1.3.3. Proteção do organismo contra o estresse oxidativo	28
1.4. Marcadores séricos de injúria miocárdica	32
1.5. Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos	33
1.6. <i>Alpinia zerumbet</i>	36
2. OBJETIVOS	44
2.1. Geral	44
2.2. Específicos	44
3. MÉTODO	45
3.1. Aspectos éticos	45
3.2. Amostra	45
3.3. Ambiente de experimentação	45
3.4. Protocolo piloto	46
3.5. Estudo	47
3.5.1. Distribuição dos grupos	47
3.5.2. Procedimento anestésico	47
3.5.3. Indução do infarto do miocárdio com isoproterenol	47
3.5.4. Preparo e administração das drogas utilizadas	47
3.5.5. Obtenção das amostras	50
3.6 Exames bioquímicos	52
3.7 Avaliação da atividade da enzima catalase no miocárdio	52
3.8 Avaliação das concentrações de glutathiona no miocárdio	52
3.9 Avaliação histopatológica	52
3.10 Análise estatística	53

4. RESULTADOS	54
4.1. Piloto	54
4.1.1. Efeito do isoproterenol sobre a mortalidade	54
4.1.2. Efeito do isoproterenol sobre os níveis de TGO, TGP e troponina I no sangue	54
4.1.3. Efeito do isoproterenol sobre o miocárdio: avaliação histopatológica	55
4.2. Estudo	57
4.2.1. Efeito do OEAZ sobre a mortalidade	57
4.2.2. Efeito do OEAZ sobre a variação do peso dos animais	57
4.2.3. Efeito do OEAZ sobre os níveis séricos de TGO e TGP	58
4.2.4. Efeito do OEAZ sobre a dosagem de troponina I no sangue	59
4.2.5. Efeito do OEAZ sobre os níveis de hemoglobina	60
4.2.6. Efeito do OEAZ sobre a contagem do número de leucócitos e neutrófilos	61
4.2.7. Efeito do OEAZ sobre a dosagem de uréia no sangue	62
4.2.8. Efeito do OEAZ sobre a dosagem de creatinina no sangue	63
4.2.9. Efeito do OEAZ sobre a atividade da enzima catalase no miocárdio	64
4.2.10. Efeito do OEAZ sobre os níveis de glutatona no miocárdio	65
4.2.11. Efeito do OEAZ sobre as alterações histopatológicas no miocárdio	65
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infarto Agudo do Miocárdio

1.1.1. Histórico

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é conhecido como causa de morte desde o início do século XIX. Inicialmente considerado uma entidade clínica imediatamente fatal, no início do século XX foi descrito que nem sempre esse evento causava morte súbita, que os sintomas são mais pronunciados quando a oclusão é aguda e que podia complicar-se com formação de aneurisma ventricular e ruptura miocárdica. Na primeira metade do século XX, o tratamento prescrito era, sobretudo, o repouso, com relatos de uso de digitálicos para pacientes com quadro de congestão pulmonar, cafeína e cânfora na prevenção e tratamento da hipotensão, síncope e bloqueios de condução cardíacos e morfina para o alívio da dor. Nas décadas de 1960 e 1970 assistiu-se ao avanço do uso de agentes fibrinolíticos para a dissolução do trombo causador do IAM (FLETCHER *et al.*, 1958; BRAUWALD, 1998; SARMENTO-LEITE, 2001).

A angioplastia coronariana transluminal percutânea surgiu como procedimento alternativo frente às limitações do uso de agentes trombolíticos na terapêutica de reperfusão miocárdica. O procedimento foi amplamente difundido na década de 1990, por reduzir a incidência da isquemia recorrente, da reoclusão por um novo trombo e da reestenose do vaso (SARMENTO-LEITE, 2001). A introdução do uso de “*stent*” foi responsável por uma grande mudança na era da reperfusão por cateter nos casos de IAM. O uso deste método propiciou, mais ainda que a angioplastia por meio de cateter balão, diminuição da reestenose e de novas intervenções (SURYAPRANATA *et al.*, 1998).

Além do desenvolvimento do tratamento intervencionista para casos de IAM, a evolução do tratamento farmacológico foi fundamental para a redução do dano isquêmico miocárdio e recuperação funcional do músculo cardíaco. Dentre os fármacos de maior importância nesse contexto temos os agentes antiplaquetários, incluindo aspirina, derivados tienopiridínicos e inibidores da glicoproteína IIb/IIIa, heparina, nitratos, betabloqueadores, bloqueadores do sistema regina-angiotensina-aldosterona e estatinas (ANDRADE *et al.*, 2009).

1.1.2. Epidemiologia

O IAM, definido como a morte do músculo cardíaco decorrente de isquemia, é um dos diagnósticos mais comuns em pacientes hospitalizados nos países industrializados. Nos EUA, cerca de 650,000 pacientes apresentam um primeiro IAM, enquanto 450,000 apresentam um episódio recorrente de IAM a cada ano. A taxa de mortalidade em trinta dias é de aproximadamente 30%, com mais de metade dessas mortes ocorrendo antes que o paciente chegue ao hospital. Embora a taxa de mortalidade após a admissão por IAM tenha declinado aproximadamente 30% nas últimas duas décadas, cerca de 4% dos pacientes que sobrevivem à hospitalização inicial morrem no primeiro ano após o evento isquêmico. A sobrevivência é acentuadamente reduzida nos pacientes acima de 75 anos (ANTMAN, 2005). O seu crescimento acelerado em países em desenvolvimento representa uma das questões de saúde pública mais relevantes da atualidade (WHELTON *et al.*, 1995). A modalidade mais frequente de parada cardiorrespiratória nas primeiras horas do IAM é a fibrilação ventricular (MYERBURG; CASTELLANOS, 2001).

Cerca de 10% dos IAM ocorre em indivíduos com menos de 40 anos de idade, enquanto 45% são observados em indivíduos com menos de 65 anos. Negros e brancos costumam ser igualmente afetados, e há maior incidência em homens do que em mulheres. Com exceção daquelas que apresentam alguma condição aterogênica predisponente, as mulheres são notavelmente protegidas contra o IAM durante a vida reprodutiva. Após a menopausa, o risco de IAM no sexo feminino tende a se igualar ao do sexo masculino pela cessação na produção dos hormônios ovarianos e a conseqüente perda da proteção vascular (ANDRADE, 2001).

1.1.3. Patogenia

O IAM ocorre predominantemente em virtude da redução da perfusão coronariana em relação à demanda do miocárdio devido, em grande parte, a uma complexa alteração dinâmica entre obstrução coronariana, trombose intraluminal que se superpõe à ruptura de uma placa aterosclerótica, agregação plaquetária e vasoespasmos. A estimulação adrenérgica, ocasionando hipertensão sistêmica ou vasoespasmos locais, pode agravar este processo. As rupturas de placas ateroscleróticas ocorrem mais frequentemente em ateromas moderadamente estenóticos, lesões que comprometem cerca de 50 a 75% da luz do vaso coronariano, ricos em lipídios. Com base em autópsias, na taxa de sucesso do tratamento com trombólise ou angioplastia, e em estudos angiográficos no seguimento de pacientes tratados

por um desses métodos, estabeleceu-se a seqüência mais comumente observada na obstrução arterial coronariana (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2009).

Primeiramente, ocorre uma alteração súbita na morfologia de um ateroma, causando hemorragia no interior da placa, erosão, úlceras, ruptura ou fissuras. As plaquetas iniciam os processos de adesão, agregação, ativação e liberação de agentes agregadores, como fatores plaquetários 3 e 4, tromboxano A₂ e serotonina, tendo como estímulo a interação com o conteúdo necrótico da placa e com o colágeno subendotelial. A agregação plaquetária e os mediadores liberados estimulam ainda o vasoespasmos. A ativação da via extrínseca da coagulação por outros mediadores também contribui com o aumento do trombo. (ANDERSON, 2008).

A oclusão de uma artéria coronária ocasiona profundas conseqüências morfológicas, bioquímicas e funcionais. Resulta em isquemia e potencialmente morte celular em toda região anatômica suprida pela artéria, mais pronunciadamente no subendocárdio (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2009).

O IAM pode ser caracterizado como transmural ou como subendocárdico. No IAM transmural, a necrose envolve a totalidade ou quase totalidade da parede ventricular, irrigada por uma única artéria coronária. Esse tipo de IAM geralmente ocorre por doença aterosclerótica. No IAM subendocárdico, a necrose se limita ao terço inferior ou, no máximo, à metade da parede ventricular, podendo se estender lateralmente, além do território vascular de uma única coronária. Neste tipo, o IAM pode ocorrer em situações de aumento da demanda miocárdica, sem doença aterosclerótica associada, como estenose aórtica grave.

Mesmo com a profunda relação entre o IAM transmural e a trombose por ruptura de placa ateromatosa, cerca de 10% dos casos tem associação com outros fatores como: vasoespasmos associado ou não ao uso de cocaína (SMITH, 1987; LANGE, 2003); êmbolos originados do átrio esquerdo associados à fibrilação atrial (MARTINEZ *et al.*, 1994); êmbolos oriundos das valvas mitral ou aórtica, em casos de endocardite vegetante; êmbolos paradoxais originados no coração direito ou em veias periféricas que passam à circulação sistêmica através de uma comunicação entre câmaras direitas e esquerdas (CARANO *et al.*, 2004); mecanismos não esclarecidos, como vasculite de pequenos vasos coronarianos intramurais, hemoglobinopatias e deposição de proteína amilóide na parede vascular .

1.2. Lesão celular isquêmica

A compreensão dos mecanismos da injúria miocárdica tem sido o objetivo de muitos estudos devido a sua elevada relevância no diagnóstico e tratamento de pacientes portadores de doença arterial coronariana (BUJA; ENTMAN, 1998).

A isquemia é o tipo mais comum de lesão celular e traduz uma situação na qual o suprimento de oxigênio e nutrientes é ineficiente para atender às demandas teciduais, normalmente devido à diminuição do fluxo sanguíneo, em virtude de uma obstrução mecânica no sistema arterial ou aumento da demanda energética do tecido (KUMAR; ABUL, 2000).

A maior parte da energia utilizada pelos mamíferos é derivada, principalmente, do metabolismo celular aeróbico que, por meio da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, gera moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Em situações nas quais há baixo suprimento de oxigênio, como no IAM, a fosforilação oxidativa cessa rapidamente e o ATP passa a ser sintetizado principalmente por meio da glicólise anaeróbica. Essa via de produção energética, por sua vez, não gera ATP em quantidade suficiente para atender adequadamente a demanda celular, resultando no consumo dos estoques de ATP e de creatina-fosfato. Quando perpetuada, pela contínua depleção de oxigênio, há produção de grandes quantidades de lactato e íons H^+ , com conseqüente redução do pH intracelular. Na medida em que os estoques de glicogênio são consumidos, a velocidade da glicólise diminui, o que contribui ainda mais para a depleção de ATP (JENNINGS; REIMER, 1981).

Em virtude do importante déficit energético, inúmeras alterações intracelulares ocorrem, dentre os quais os distúrbios da homeostase iônica celular, que se processam precocemente (GROOT; RAUEN, 2007). Com um substancial declínio dos níveis de ATP, e conseqüente redução da atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase há conseqüente aumento da concentração de Na^+ intracelular e do efluxo de K^+ para o meio extracelular (BUJA, 2005). O influxo de Na^+ é acompanhado pelo influxo de Cl^- e, conseqüentemente, por ganho isosmótico de água, o que resulta em edema celular. A acentuada concentração de Na^+ intracelular causa mudança na atividade normal do trocador Na^+/Ca^{++} que, ao invés de propiciar influxo de Na^+ e efluxo de Ca^+ , passa a agir de forma inversa, aumentando a concentração de Ca^{++} intracelular (DONG *et al.*, 2006; FIOLET; BAARTSCHEER, 2000). Outros mecanismos também contribuem para o aumento da concentração de Ca^{++} intracelular, como a redução das atividades de bombas de Ca^{++} presentes na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático.

O Ca^{++} exerce importantes funções no desenvolvimento da injúria celular, como ativação de fosfolipases, principalmente fosfolipase A2, proteases, endonucleases, ATPases e

dano mitocondrial, resultando em queda mais acentuada da produção energética, além da liberação de proteínas pró-apoptóticas aprisionadas entre as membranas mitocôndrias externa e interna (GROOT; RAUEN, 2007; FIOLET; BAARTSCHEER, 2000; DONG *et al.*, 2006).

Durante os primeiros minutos de isquemia, alterações morfológicas e metabólicas podem ser revertidas caso o suprimento sanguíneo seja restaurado. Contudo, quando a isquemia perdura continuamente por cerca de vinte a trinta minutos, as células desenvolvem lesões irreversíveis e progridem para morte celular (FERDINANDY; SCHULZ; BAXTER, 2007). A caracterização do momento em que a injúria passa a ser irreversível é fruto de muitas discussões entre autores (MANJO; JORIS, 1995). Kroemer *et al* (2009) propõe que a célula deve ser considerada morta quando pelo menos um dos seguintes critérios morfológicos e moleculares é observado: perda da integridade da membrana celular; fragmentação celular em discretos fragmentos, muitas vezes definidos como corpos apoptóticos; ingestão da célula ou de seus fragmentos por outra célula adjacente..

Existem dois padrões morfológicos básicos de injúria celular que culmina em morte celular. Um deles é acompanhado por tumefação celular, resultando em morte por necrose e outro se desenvolve por redução do volume celular, morte por apoptose (EDINGER; THOMPSON, 2004).

A necrose é o principal tipo de morte celular decorrente de isquemia. Embora historicamente considerada uma forma de morte celular desorganizada, evidências recentes demonstram que a necrose pode ser regulada por uma série de vias de transdução de sinais e mecanismos catabólicos variados. Isso é suportado pelo fato de que quando são inibidos eventos essenciais da apoptose e da autofagia, pode-se induzir a morte celular por necrose. (GOLSTEIN; KROEMER, 2007; KROEMER *et al.*, 2009).

Morfologicamente a necrose se manifesta por aumento do volume celular, razão pela qual muitos autores propõe o resgate do termo oncoses, que significa tumefação, edema de organelas citoplasmáticas, ruptura da membrana plasmática e conseqüente extravasamento de conteúdo citoplasmático, que leva a uma reação inflamatória local (KROEMER *et al.*, 2009; EDINGER; THOMPSON, 2004; TRUMP *et al.*, 1997). No caso do IAM, essas alterações histológicas que caracterizam a necrose miocárdica só se tornam aparentes cerca de quatro a doze horas após o evento isquêmico. Contudo, em virtude da perda da integridade da membrana plasmática, enzimas e proteínas cardíacas específicas, como CK-MB e troponinas, extravasam do cardiomiócito com aumento de suas concentrações séricas, podendo ser detectadas cerca de duas horas após o IAM (KUMAR; ABUL, 2000).

Apesar da morte celular no IAM ser predominantemente por necrose, estudos recentes indicam que algumas células podem desenvolver morte celular por apoptose, principalmente durante os primeiros minutos do insulto ou quando há reperfusão (BUJA; ENTMAN, 1998). O grau de redução dos níveis de ATP tem sido considerado um importante fator nesse aspecto, uma vez que para haver apoptose é necessário estoque de ATP, pois envolve complexas seqüências de reações enzimáticas (LEIST *et al.*, 1997; BUJA, 2005; EDINGER; THOMPSON, 2004).

A reperfusão, ou seja, a restauração do fluxo sanguíneo ao órgão isquêmico é fundamental para garantir a sua viabilidade e função, bem como para prevenir lesões celulares irreversíveis, principalmente quando esta ocorre rapidamente após o início da isquemia (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004). Contudo, a reperfusão pode provocar danos adicionais àqueles decorrentes da isquemia. Esses danos ocorridos após o início da reperfusão consistem na lesão por isquemia e reperfusão e são clinicamente importantes, pois estão envolvidos em várias situações clínicas como transplantes de órgãos, angioplastia coronariana, terapias trombolíticas e cirurgias cardiovasculares (CARDEN; GRANGER, 2000).

Quando se inicia a reperfusão, novos mecanismos lesivos podem ser ativados, que embora ainda não completamente compreendidos, provavelmente incluem o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o aumento da concentração de Ca^{++} intracelular, uma reação inflamatória aguda e disfunção endotelial e microvascular (KUMAR; ABUL, 2000; ELTZSCHIG; COLLARD, 2004; VERMA *et al.*, 2002; DIRKSEN *et al.*, 2007).

Durante a lesão por isquemia e reperfusão, a formação de ERO por células endoteliais e parenquimatosas do tecido isquêmico e por leucócitos infiltrados no tecido é acentuada (BUJA, 2005). Outro fator que exacerba o dano causado pelas ERO é o fato de que mecanismos antioxidantes, como a ação das enzimas superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona, estão comprometidas pelo período de isquemia. A ação das ERO é de particular importância, pois pode explicar praticamente todos os outros mecanismos de injúria por reperfusão (ZWEIER; TALUKDER, 2006). Acentua o influxo de Ca^{++} por meio da inibição da ATPase de Ca^{+} no retículo sarcoplasmático e inibição da Na^{+}/K^{+} ATPase levando ao aumento da concentração de Na^{+} e conseqüente aumento do influxo de Ca^{++} . Além disso, as ERO causam peroxidação dos lipídios da membrana plasmática, com conseqüente aumento da permeabilidade e influxo de Ca^{++} (ZWEIER; TALUKDER, 2006; DONG *et al.*, 2006). Provocam ainda quimiotaxia de neutrófilos, fontes de produção de mais ERO (VERMA *et al.*, 2002). Dessa forma, muitos mecanismos propostos para lesão causada

pela reperfusão estão interligados e envolvem muitos eventos de amplificação dos mesmos (GROOT; RAUEN, 2007).

Após a restauração do fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico, uma reposta inflamatória é desencadeada devido à liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios produzidos durante o período de isquemia. Esta resposta pode ser tão intensa em alguns casos, que pode resultar no desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ou na síndrome da disfunção múltipla dos órgãos, as quais representam cerca de 30 a 40% das causas de mortalidade em unidades de terapia intensiva (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004).

1.3. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como uma lesão celular acarretada pela produção aumentada ou remoção insuficiente de moléculas altamente reativas derivadas do oxigênio e do nitrogênio (KAO *et al.*, 2010).

ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são denominadas radicais livres por possuírem elétrons desemparelhados em sua camada de valência, o último nível de distribuição eletrônica do átomo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, logo, a formação de ERO e ERN ocorre tanto em disfunções orgânicas como em condições fisiológicas. No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos em diversos processos metabólicos como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Estudos sugerem que a principal causa de geração endógena de ERO advem da atividade de doenças metabólicas, podendo ainda ser geradas por estímulos ambientais, citocinas, radiação ultravioleta (UV), agentes quimioterápicos, hipertermia e fatores de crescimento (FINKEL; HOLBROOK, 2000). ERO estão envolvidas em uma ampla variedade de doenças, incluindo neoplasias malignas, diabetes mellitus tipo II, aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas, lesões por isquemia e reperfusão e doenças neurodegenerativas (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007). No entanto, devido à alta taxa metabólica e à reduzida capacidade de regeneração celular comparada com outros tecidos, o tecido cerebral é o mais susceptível aos danos provocados pelos efeitos das ERO (ANDERSEN, 2004).

Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das ERO e ERN podem ser prevenidos por determinadas enzimas como a SOD, glutathiona peroxidase e CAT, assim como por antioxidantes não-enzimáticos. No entanto, quando a produção de radicais livres excede a

capacidade de defesa antioxidante, o estresse oxidativo pode causar efeitos maléficos sobre a integridade funcional e estrutural do tecido biológico (TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2009).

1.3.1. Espécies reativas de oxigênio

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, radicalares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); e não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Hidroxila (HO^\bullet)

O radical HO^\bullet , devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo* e tem ação próxima ao seu local de produção, atacando as moléculas por abstração de hidrogênio e por sua adição a insaturações, causando, assim, danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e da mitocondria. Logo, devido a sua alta reatividade é necessária uma grande quantidade de antioxidantes para evitar que cause danos ao organismo.

A produção de HO^\bullet pode ocorrer durante a homólise da água por exposição à radiação ionizante, como ultravioleta, gerando HO^\bullet e H^\bullet , ou por meio da reação do Fe^{2+} com H_2O_2 (Reação de Fenton). Em condições fisiológicas normais, o ferro está ligado a moléculas de transporte ou de armazenamento, mas sob condições de estresse o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) possui a habilidade de liberar Fe^{2+} dessas proteínas, reagindo com H_2O_2 produzindo Fe^{3+} , OH^\bullet e OH^- , caracterizando, assim, a Reação de Fenton (VALKO *et al.*, 2007).



O dano do radical OH^\bullet ao DNA ocorre por meio da abstração de um dos átomos de hidrogênio da desoxirribose, que quase sempre leva à ruptura, e de sua adição as insaturações das bases nitrogenadas.

O ataque de HO^\bullet aos aminoácidos ocorre por adição do radical ou por abstração de hidrogênio e pode ter como consequência a perda da atividade enzimática, dificuldades no

transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular. Ocorre predominantemente sobre os lipídios da membrana celular, que é atacada em sítios susceptíveis como o grupo metilênico alílico, produzindo novos radicais livres (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes em fosfolipídios das membranas celulares são extremamente susceptíveis a oxidação. Os radicais HO[•] subtraem um átomo de hidrogênio dessas moléculas, iniciando uma cascata de reações de peroxidação lipídica. Os peróxidos de lipídios se degradam em sequência formando produtos como o malonaldeído e o hidroxinonenal, que formam ligações cruzadas com proteínas gerando produtos finais de lipoxidação. O malonaldeído e o hidroxinonenal associados a resíduos do aminoácido lisina, têm sido verificados em lipoproteínas de placas ateroscleróticas (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007).

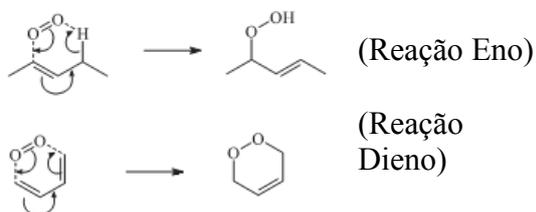
Oxigênio Singlete (¹O₂)

A forma mais deletéria do oxigênio ao organismo é o oxigênio singlete (¹O₂), pois é o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O₂ em organismos vivos. O seu tempo de meia-vida depende muito do meio onde se encontra.

O oxigênio singlete pode ser formado por meio da reação do ânion O₂^{•-} com o radical HO[•] (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006):



O oxigênio singlete reage com algumas classes de biomoléculas e, em geral, essas reações são do tipo eno e dieno (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



Devido às múltiplas insaturações conjugadas, compostos bastante reativos frente ao oxigênio singlete são os carotenóides e ácidos graxos polinsaturados. Em relação aos ácidos graxos, quanto maior o número de insaturações presentes nestas moléculas, mais rapidamente ocorrerá uma reação, que se dá por incorporação do oxigênio à cadeia com conseqüente migração da ligação dupla, formando ácidos hidroperóxidos (VALKO *et al.*, 2007).

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, possui meia-vida longa e pode transpor as membranas celulares facilmente, gerando o radical hidroxila através da reação de Fenton.

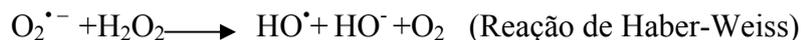
O H₂O₂ pode ser formado através da redução de dois elétrons de oxigênio ou da dismutação do O₂^{•-}. Este radical livre oxida proteínas que apresentam resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos e pode ainda induzir alterações cromossômicas, rompendo a coluna do DNA (SILVA; GONÇALVES, 2010).

Estudo realizado com a indução de estresse oxidativo por H₂O₂ em cardiomiócitos demonstrou que as células resultantes do processo estavam hipertrofiadas, com aumento das fibras de actina e distribuição alterada das fibras de miosina (CHEN *et al.*, 2000).

Sua eliminação ocorre por meio da ação de enzimas como CAT, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Superóxido (O₂^{•-})

O radical ânion superóxido (O₂^{•-}) ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo e participa de certos processos químicos auxiliando na produção do radical HO[•] através da redução de quelatos de Fe³⁺, formando Fe²⁺ e o liberando das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



O processo de dismutação do ânion superóxido pela superóxido dismutase resulta na produção de H₂O₂ que pode interagir com o O₂^{•-} por meio da Reação de Haber-Weiss (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007).

A formação de O₂^{•-} ocorre no interior da mitocôndria, organela celular responsável pela produção de ATP através da cadeia transportadora de elétrons. Durante a transdução energética na mitocôndria, um pequeno número de elétrons escapa do oxigênio prematuramente, formando o radical livre superóxido (VALKO *et al.*, 2007).

Dentre os aminoácidos, a cisteína é o único aminoácido que sofre oxidação com o radical O₂^{•-} e, a partir dessa reação, forma-se um superóxido e o tio-radical.

O radical O₂^{•-} tem importância vital para as células de defesa protegendo o organismo contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos, por meio de sua produção por fagócitos, linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, que catalisa a redução por um

elétron do O_2 com gasto de uma molécula de NADPH. No entanto, o radical ânion superóxido formado é bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, porém gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos.

Peróxido (ROO^\bullet)

Outra espécie reativa de oxigênio é o radical peróxido (ROO^\bullet), como o hidroperóxido (HOO^\bullet) que é a forma protonada do radical superóxido e desempenha a função de peroxidação de ácidos graxos (VALKO *et al.*, 2007).

O HOO^\bullet é intermediário quanto a reatividade, ficando entre $O_2^{\bullet-}$ e o OH^\bullet .

ERO, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radicais hidroxila (OH^\bullet) causam a oxidação dos fosfolípidios da membrana, proteínas e DNA, tendo implicação na patogênese da lesão por isquemia e reperfusão.

1.3.2. Espécies reativas de nitrogênio

Dentre as ERN destacam-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O radical NO^\bullet é formado através de processos específicos por óxido-nítrico sintases que metabolizam o aminoácido arginina em citrulina liberando NO^\bullet que é solúvel em meio aquoso e lipídico, logo, se difunde através do citoplasma e membrana plasmática. Esse radical também pode ser produzido por fagócitos humanos. Além disso, o nitrato pode transformar-se em nitrito, que reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso (HNO_2) (VALKO *et al.*, 2007).

O óxido nítrico (NO^\bullet) atua como uma importante molécula biológica oxidativa de sinalização em uma variedade de processos fisiológicas, incluindo neurotransmissão, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso e regulação do sistema imune.

Durante uma resposta imunológica celular, há produção de óxido nítrico e superóxido. Nestas condições, o óxido nítrico e superóxido podem reagir entre si para produzir ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), um agente oxidante poderoso que provoca a fragmentação do DNA e oxidação lipídica, visto que o óxido nítrico NO^\bullet não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente.



O óxido nítrico (N_2O_3) também é precursor do HNO_2 através da sua reação com a água.



O HNO_2 promove a desaminação das bases do DNA que contêm grupo amina livre que são citosina, adenina e guanina, formando-se uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

1.3.3. Proteção do Organismo Contra o Estresse Oxidativo

O sistema de defesa antioxidante, existente no organismo ou proveniente da dieta, minimiza os danos causados pelo estresse oxidativo. Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). O sistema de defesa endógeno pode ser classificado como enzimático ou não-enzimático.

O Sistema de Proteção Enzimático

É representado pelas enzimas Superóxido Desmutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e a Glutathione Redutase (GR) (BONNEFOY *et al.*, 2002).

A ação e regulação do sistema enzimático de defesa antioxidante depende do substrato (radicais livres), da produção de co-substratos e da afinidade, seletividade e especificidade por esse substrato (SIES, 1993).

As SOD são metaloenzimas que atuam na dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, um radical menos reativo que pode ser degradado por outras enzimas como a CAT e a GPx.

Existem quatro tipos isoenzimáticos de SOD bem caracterizados, cada uma responsável por um compartimento celular específico, podendo conter em seus sítios ativos os elementos cobre, ferro, zinco ou manganês (FRIDOVICH, 1998). As formas mais importantes são a Manganês-SOD, que está localizada no interior das mitocôndrias, e a Cobre-Zinco-SOD, que está localizada no citoplasma (ROBBINS, 2010). Pacientes portadores de IAM apresentam diminuição dos níveis dessa enzima no tecido miocárdico (SUNSHIL *et al.*, 1995).

A CAT é uma ferrihemoenzima que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. É um tetrâmero formado por quatro unidades idênticas que

possuem em seu centro catalítico o grupo prostético heme. A conversão de peróxido de hidrogênio, a água e oxigênio molecular requer a presença de NADPH para que os tetrâmeros da enzima fiquem ativos. A principal fonte de NADPH é a primeira reação da via das pentoses, catalisada pela enzima glicose-6-fostato desidrogenase (URSINI *et al.*, 1997). A CAT é encontrada principalmente no interior dos peroxissomos, embora já tenha sido identificada uma CAT citosólica presente em células eucarióticas (SPEVAK *et al.*, 1986).

A GPx reduz peróxido de hidrogênio e outros peróxidos a água ou álcool. Existem quatro formas de glutatona peroxidase: GPx 1 ou clássica, encontrada no citoplasma de todas as células do corpo; GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA. A família de GPx integra o grupo de selenoenzima, que têm, em seu sítio ativo, o selênio (Se). A GPx tem sua ação baseada na oxidação da Glutationa (GSH) ao Dissulfeto de Glutationa (GSSH). Normalmente a relação Glutationa Reduzida/Glutationa Oxidada nas células é alta, pois existe uma enzima responsável por reduzir a GSSH a GSH novamente, a Glutationa Redutase (GR). (FIGURA 1)

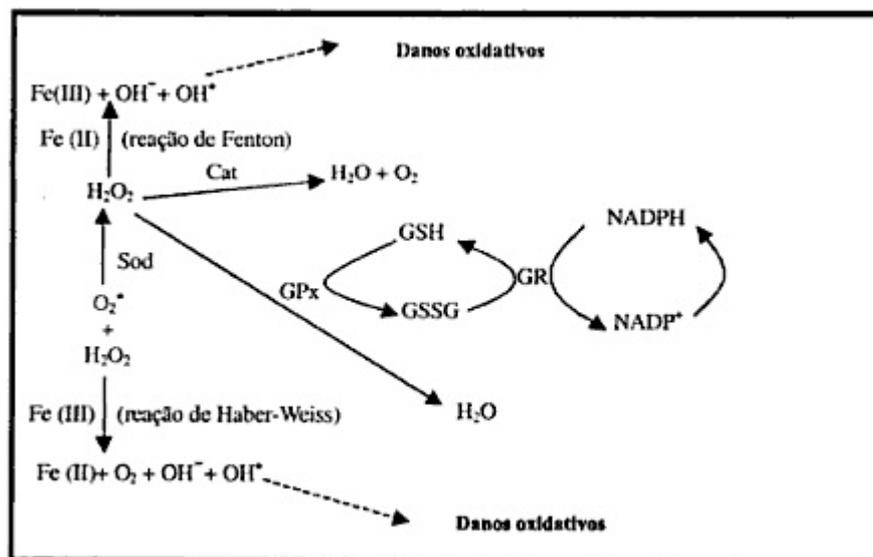


Figura 1 – Mecanismo de ação dos sistemas de proteção enzimático.

O Sistema de Proteção Não-Enzimático

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático é composto por nutrientes adquiridos a partir da alimentação, tais como o β -caroteno (pro-vitamina-A), α -tocoferol

(vitamina-E), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos (flavonóides e poliflavonóides), ou podem ser produzidos *in vivo* como é o caso da glutathiona, da ubiquinona e do ácido úrico. Os antioxidantes não-enzimáticos são encontrados principalmente no meio extracelular.

O hidrocarboneto extensamente insaturado *beta*-caroteno é o precursor da vitamina A, também conhecida como retinol (CAMPBELL, 2000). Vários estudos têm indicado que o β -caroteno pode ter ação anti e pró-oxidante. Sob condições normais de pressão de oxigênio, est hidrocarboneto age como antioxidante, porém, um aumento na pressão de oxigênio faz com que perca esta atividade e passe a atuar como um pró-oxidante (BURTON; INGOLD, 1984; PALOZZA *et al.*, 1997).

A vitamina E é constituída por quatro tocoferóis e secundariamente por quatro tocotrienóis, sendo o mais ativo o α -tocoferol. Esta vitamina é capaz de impedir a continuidade das reações em cadeia produzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas (TRABER, 1997). O estresse oxidativo pode ser inibido pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutathiona, a vitamina C e os carotenóides, sendo, assim, um dos principais mecanismos de defesa endógena (RILEY, 1994).

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é um nutriente essencial para os seres humanos. Ela atua como agente redutor e sua função primária é se ligar aos principais metais e cofatores em seus menores estados de valência, como por exemplo o Fe e Cu. Além disso, atua contra a peroxidação de lipídios. No plasma sanguíneo, atua na prevenção do estresse oxidativo através de reações com ERO e ERN, ou na restauração de fosfolipídios da membrana celular, por meio de doação de hidrogênio. Isso pode explicar seu papel na prevenção de doenças ateroscleróticas, pois sem a formação dos radicais lipídio-peroxila não há o ataque às proteínas do endotélio arterial, o que causaria acúmulo de lipídios e obstrução ao fluxo sanguíneo (BUETTNER, 1993).

Os flavonóides mais investigados em relação aos efeitos antioxidantes são a quercetina, a mircetina, a rutina e a naringenina. Na literatura existe muita controvérsia em relação à ação dos flavonóides, porém, estudos atuais demonstram que alguns flavonóides possuem maior eficácia antioxidante que a vitamina C (HARTMAN; SHANKEL, 1990).

Existem ainda, entre o sistema de proteção não-enzimático, os antioxidantes que são produzidos pelo próprio organismo como é o caso da glutatona, da ubiquinona e do ácido úrico.

A glutatona é um tripeptídeo (*L*- γ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) que exerce funções como cofator de enzimas, como a glutatona peroxidase (GPx), onde exerce um importante papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto de glutatona (GSSH).

A ubiquinona, coenzima Q₁₀, (CoQ), é o único lipídio endogenamente sintetizado através da via do mevalonato, que apresenta função redox. Desempenha papel central na cadeia respiratória mitocondrial, na cadeia de transporte de elétrons extra-mitocondrial, participa da regulação da permeabilidade, diminui a oxidação de proteínas de membrana, previne a oxidação do DNA e impede a disfunção endotelial, provavelmente por aumentar a disponibilidade de NO (GANDRA, 2004).

Sua forma antioxidante, o ubiquinol (CoQH₂), produto da redução de CoQ, inibe a iniciação e propagação da peroxidação lipídica, com conseqüente impedimento da formação de ROO (radical peroxila), contribuindo também para a prevenção de doença aterosclerótica. Além disso, a coenzima Q regenera a vitamina E do radical tocoferila.

O ácido úrico (UrH₃) tem ação antioxidante em função da capacidade dos uratos de seqüestrar radicais livres. Oxidantes fortes, tais como OH, podem oxidar o ânion urato (UrH₂⁻) ao radical urato, que é dissociado, ao ânion radical urato (UrH₁⁻). O urato também reage com radicais ROO antes de este penetrar a membrana celular e iniciar o dano e, com o dióxido de nitrogênio (NO₂), para formar o ânion nitroxila NO₂⁻ e, por fim, atua como antioxidante, por sua capacidade de quelar metais de transição. O ânion radical urato (UrH₁⁻) pode reagir com ascorbato (AscH⁻), regenerando o urato.

A utilização de antioxidantes parece ser uma estratégia plausível para a redução do dano provocado pelo estresse oxidativo.

1.4. Marcadores séricos de injúria miocárdica

O diagnóstico do IAM baseia-se em critérios clínicos, eletrocardiográficos e enzimáticos. Uma vez que o quadro clínico muitas vezes é inespecífico e que o eletrocardiograma (ECG) pode ser inconclusivo, os marcadores séricos bioquímicos de injúria miocárdica são imprescindíveis para a elucidação do diagnóstico (NIGAM, 2007).

O primeiro estudo sobre marcadores de injúria miocárdica foi publicado em 1954. Foram mensurados os níveis séricos da enzima transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) de algumas horas até 15 dias após um IAM, em um grupo de pacientes. Observaram um aumento dos níveis de TGO poucas horas após o IAM, atingindo um pico após 2 ou 3 dias, com retorno aos níveis normais em um período de sete dias (KEMP, 2007).

A creatinoquinase (CK) é uma enzima que se encontra altamente concentrada no cérebro, no miocárdio e no músculo esquelético. É composta de dois dímeros, denominados M e B. A isoenzima CK-MM origina-se predominantemente do músculo esquelético, a CK-BB origina-se do cérebro, dos pulmões e de muitos outros tecidos; e a CK-MB origina-se principalmente do miocárdio, embora quantidades variáveis possam ser encontradas no músculo esquelético. A atividade total da CK começa a aumentar dentro de duas a quatro horas após o início do IAM, atinge um pico em cerca de 24 horas e normaliza-se dentro de, aproximadamente, 72 horas. O pico é acelerado em pacientes que tiveram reperfusão. A atividade total da CK é sensível, porém não é específica visto que a enzima também está elevada em outras condições, como lesão do músculo esquelético. A especificidade é aumentada por meio da determinação da fração CK-MB. A CK-MB aumenta dentro de 4-8 horas após o evento isquêmico, atinge um pico em 18 horas e, em geral, volta aos níveis normais em 48 a 72 horas. A ausência de uma alteração dos níveis de CK e CK-MB durante os dois primeiros dias de dor torácica exclui praticamente o diagnóstico de IAM (KUMAR; ABUL, 2000).

A liberação de mioglobina, em decorrência da injúria miocárdica ocorre precocemente e é muito sensível para a detecção do IAM. No entanto, não é um teste muito específico uma vez que um mínimo trauma no músculo esquelético também libera mioglobina. (CHIU, 1999). No entanto, tem uma grande vantagem em relação à CK-MB devido à sua rápida cinética. A mioglobina possui um peso molecular bem menor que a CK e suas isoformas, podendo ser detectado o seu aumento após 1h do início do evento coronariano, tendo seu pico entre 2-3h, e seu desaparecimento antes de completar 24h (ADAMS, 1993; CHIU, 1999; KEMP, 2007).

Para ser ideal, o marcador deve ser uma proteína cardíaca específica abundante, liberada na circulação sistêmica após uma lesão em quantidades proporcionais ao grau da lesão, que seja persistente e passível de ensaio rápido, fácil e de baixo custo (VAN DER WERF, 1996). As troponinas são proteínas que regulam a contração do músculo cardíaco e do músculo esquelético mediada pelo cálcio. A troponina I (TnI) e a troponina T (TnT) não são normalmente detectadas na circulação, e existem diferentes genes que codificam essas proteínas no músculo esquelético mediada pelo cálcio. Por conseguinte, as elevações séricas são anormais, e as formas cardíaca e do músculo esquelético podem ser distinguidas por anticorpos específicos, que também permitem a realização de ensaios imunológicos quantitativos. Após IAM, tanto os níveis de TnI quanto TnT aumentam aproximadamente ao mesmo tempo que a CK-MB. A sensibilidade diagnóstica da determinação da troponina cardíaca assemelha-se àquela da CK-MB nos estágios iniciais. Entretanto, os níveis de troponina permanecem elevados durante sete a dez dias após o evento agudo, permitindo o diagnóstico de IAM, bem depois da normalização dos níveis de CK-MB (ADAMS *et al.*, 1994). Os limites de referência variam em diversos estudos, porém considera-se o diagnóstico de IAM valores superiores a 0,1 ng/mL. Com esse critério, a sensibilidade para o diagnóstico de IAM aproxima-se a 100% (MARTINS, 2009; KOCIOL, 2010).

1.5. Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos

O isoproterenol (isopropilarterenol, isopropil norepinefrina, isoprenalina, isopropil norepinefrina, *d,l*- β -[3,4-diidroxiifenil]- α -isopropilaminoetanol) é um potente agonista não seletivo de todos os receptores β , com afinidade muito baixa pelos receptores α . É considerado, então, uma catecolamina agonista β -adrenérgica que causa dano severo no miocárdio gerando necrose semelhante a produzida no IAM (WEXLER, 1978).

A infusão intravenosa de isoproterenol diminui a resistência vascular periférica, primariamente no músculo esquelético, mas também nos leitos vasculares renal e mesentérico, ocorrendo queda da pressão diastólica. A pressão arterial sistólica pode permanecer inalterada ou aumentar, embora ocorra tipicamente uma queda da pressão arterial média. O débito cardíaco aumenta em consequência dos efeitos inotrópico e cronotrópico positivos do fármaco na presença de diminuição da resistência vascular periférica. Sua administração pode levar a palpitações, isquemia miocárdica, taquicardia sinusal e arritmias mais graves. A administração de grandes doses pode causar necrose do miocárdio em animais. Sofre rápida absorção quando administrado por via parenteral ou na forma de aerossol. É metabolizado

primariamente no fígado e em outros tecidos pela catecol-orto-metil transferase (COMT). É um substrato relativamente fraco para a monoamina-oxidase (MAO) e não é captado pelos neurônios simpáticos com a mesma intensidade que a epinefrina e norepinefrina. Por conseguinte, a duração de ação pode ser mais longa que a da epinefrina, embora também seja breve (WESTFALL; WESTFALL, 2006).

A fórmula química do isoproterenol pode ser observada a seguir (FIGURA 2).

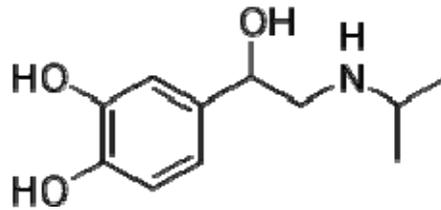


Figura 2 - Fórmula química do isoproterenol

Para se estudar efeitos de drogas sobre a injúria miocárdica decorrente de IAM, um dos modelos experimentais bastante utilizado é a indução de infarto com administração de isoproterenol em ratos, uma vez que esta substância causa uma lesão miocárdica semelhante a observada em IAM nos humanos (ITHAYARASI; DEVI, 1997). A administração exógena de isoproterenol causa um importante estresse miocárdico, resultando em necrose miocárdica. Dentre os vários mecanismos propostos para explicar o dano miocárdio induzido pelo isoproterenol, a geração de radicais livres altamente citotóxicos, decorrente da auto-oxidação de catecolaminas, tem sido implicada como um dos importantes fatores causadores. Isoproterenol também aumenta a atividade de enzimas lisossômicas. Há na literatura, uma série de estudos que, utilizando este modelo, avalia o efeito de diferentes substâncias sobre alterações bioquímicas e histopatológicas decorrentes da injúria miocárdica em ratos (ENGLE *et al.*, 2009; GEORGE; LINER; HOIT, 2010).

Isoproterenol reduz a atividade da Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase, podendo ser responsável por uma quebra de balanço iônico que causa dano à membrana celular (BLOOM; DAVIS, 1972). Também é apontado como indutor da ativação de diversas hidrolases lisossômicas, responsáveis pela destruição celular (SATHISH; EBENEZAR; DEVAKI, 2003). Está relacionada ao aumento dos níveis séricos de CK, LDH, TGO, TGP, colesterol total (CT) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (MOHAN; BLOOM, 1999). Estudos indicam que quinonas derivadas do isoproterenol reagem com o oxigênio, produzindo ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, causando o estresse oxidativo (RATHORE *et al.*, 2000).

O efeito cardiotoxico do isoproterenol também está associado também à sobrecarga de Ca^{2+} . Estudos sugerem que a entrada de Ca^{2+} em miócitos cardíacos após a administração de isoproterenol ocorre em duas fases: uma fase inicial rápida, seguida por uma fase lenta que se inicia cerca de uma hora após a injeção de ISO, levando a um nível de Ca^{2+} no miocárdio ao pico após cerca de quatro horas (MOHAN; BLOOM, 1997).

Grimm *et al* (1998) estudaram os efeitos da administração subcutânea de diversas doses de isoproterenol em ratos objetivando avaliar o grau do dano miocárdico. Foram testadas seis diferentes doses, sendo a dose de 150 mg/kg a mais eficaz.

Como citado anteriormente, o isoproterenol é uma substância com ação β -adrenérgica e os efeitos de ISO no coração são mediados por receptores adrenérgicos β -1 e β -2, ambos mediando um efeito inotrópico e cronotrópico, com conseqüente depleção de ATP (BRODDE, 1991), produzindo uma isquemia relativa ou hipóxia pela hiperatividade do miocárdio e hipotensão coronária, induzindo também isquemia miocárdica pela entrada de Ca^{2+} em excesso (YEAGER; IAMS, 1981). ISO produz também isquemia miocárdica pelo excesso de produção de radicais livres resultando do metabolismo oxidativo de catecolaminas (SINGAL; BEAMISH; DHALLA, 1983).

Em uma série de estudos se observa que os níveis de antioxidantes como ceruloplasmina e glutathione e as atividades de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT, glutathione peroxidase, glutathione redutase e glutathione S-transferase diminuem, enquanto há aumento de marcadores de injúria miocárdica como TGO, TGP, LDH, CPK, CK-MB e troponina nos ratos onde se administrou isoproterenol em comparação com os ratos controle (UPAGANLAR; GANDHI; BALARAMAN, 2009; PRINCE *et al.*, 2008; SANGEETHA; QUINE, 2008; ANANDAN *et al.*, 2007; TRIVEDI *et al.*, 2006; AHMED; RANA; DIXIT, 2004; RATHORE *et al.*, 2000). Sathish, Ebenezer e Devaki (2003) apontaram o isoproterenol como um desestabilizador de membranas, levando a indução da ativação de diversas hidrolases lisossômicas que resultam em dano miocárdico em ratos.

Mohan e Bloom (1999) observaram que o isoproterenol induz lipólise no miocárdio de ratos. Esse fenômeno resultaria em ácidos graxos livres, sendo que estes, ou os produtos de sua degradação, apresentam-se tóxicos às células cardíacas pelos danos causados a membrana plasmática.

Rathore *et al.*, (2000) concluíram que a administração de isoproterenol em ratos altera o sistema antioxidante dos eritrócitos. Afirmam que o isoproterenol, ao sofrer oxidação, produz quinonas que reagem com o oxigênio para produzir ânions superóxido e peróxido de hidrogênio.

Bloom e Davis (1972) relataram que, após a administração de isoproterenol em ratos, o nível de cálcio miocárdico total encontrou-se aumentado. Os autores postularam que o isoproterenol exerce um efeito de distribuição do Ca^{2+} pelas organelas celulares, sendo que o incremento de Ca^{2+} nas mitocôndrias leva a um desbalanço iônico que prejudica a síntese de ATP, assim danificando o metabolismo energético dos miócitos. Singal, Beamish e Dhalla (1983) observaram que o isoproterenol causa isquemia miocárdica pelo excesso de produção de radicais livres, causado pelo metabolismo oxidativo das catecolaminas.

Vários são os mecanismos pelos quais o isoproterenol causa dano nos cardiomiócitos de ratos, sendo um modelo científico amplamente utilizado em diversos estudos que avaliam o efeito de muitas drogas no metabolismo cardíaco.

1.6. *Alpinia zerumbet*

Alpinia zerumbet (*A. zerumbet*) é uma espécie de planta herbácea, integrante da família Zingiberaceae. Esta família apresenta uma grande biodiversidade, compreendendo um total de 53 gêneros e aproximadamente 1200 espécies. Quanto à origem dessas espécies, afirma-se que o surgimento se deu nas zonas tropicais do sul e do sudeste asiático (CRONQUIST, 1981; KRESS; PRINCE; WILLIAMS, 2002).

No Brasil, a introdução de representantes desta família, incluindo a espécie *A. zerumbet*, parece ter sido aleatória, quando, na época da expansão marítima, amostras de caules aqui chegavam, em meio à areia usada como lastro pelas embarcações lusitanas que retornavam das Índias (ALBUQUERQUE, 1999; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005). A miscelânea de propriedades econômicas e medicinais associadas a esses vegetais favoreceu a difusão de seu uso. O caule rizoma, por exemplo, possui féculas que constituem uma fonte de energia. As características aromáticas permitem seu uso na preparação de perfumes, condimentos e corantes. Salienta-se também importante participação na fabricação de fibras e papel (TOMLINSON, 1969), além de a beleza estética da folhagem e da inflorescência de algumas espécies, pertencentes sobretudo aos gêneros *Zingiber*, *Alpinia*, *Nicolaia*, *Hedychium* e *Kaempferia* fazerem da ornamentação uma outra atividade econômica (WINTERS, 1995).

Dados da literatura afirmam que a popularidade da *A. zerumbet* está intimamente relacionada às suas propriedades medicinais, entre elas: depurativas, diuréticas, anti-histéricas, estomáquicas e vermífugas (ALMEIDA, 1993). Certas comunidades em nosso país a utilizam no tratamento de enfermidades reumáticas e cardiovasculares (CARLINI, 1972).

Em relação aos aspectos farmacológicos de formulações obtidas desta espécie, confirmou-se o seu efeito hipotensor (MENDONÇA *et al.*, 1991; LARANJA; BERGAMASCHI; SCHOR, 1992). Pesquisas apresentaram resultados positivos significativos quanto ao efeito diurético (ALMEIDA, 1993), porém, outras obtiveram resultados controversos para o mesmo efeito (LARANJA; BERGAMASCHI; SCHOR, 1992). Outros estudos demonstraram ação antiinflamatória, sendo eficaz na inibição da gênese do edema (SANTANA; PINTO; D'ALBUQUERQUE, 1966). Tem sido também estudada quanto às suas atividades antifúngicas (LIMA *et al.*, 1993) e antibacterianas, além da produção de inseticidas a partir dos óleos essenciais da flor (MORITA, 1992).

Estudos demonstram que das folhas, do rizoma, da raiz e das flores de *A. zerumbet* podem ser obtidos dihidro-5,6-desidrokaawaína (DDK) e compostos fenólicos, ambos com forte atividade antioxidante (ELZAAWELLY, 2007a; ELZAAWELLY, 2007b). Análises bioquímicas indicam ainda que as folhas de *A. zerumbet* são ricas em flavonóides (catequinas, epicatequina, rutina, quercetina, kaempferol 3-O-rutinosídeo, kaempferol 3-O-glicoronídeo) e DDK (MPALATINOS, 1998).

A. zerumbet é um vegetal entouceirado, atingindo um comprimento de dois a três metros. As hastes da planta são numerosas e recurvadas, a partir das quais se desenvolvem folhas coriáceas e espessas. Os principais nomes pelos quais ela é conhecida são colônia, paco-seroca, cuité-açu, pacova e gengibre-concha (LORENZI; SOUZA, 1995).

Em se tratando da morfologia da flor, sua textura é do tipo cerosa. As pétalas trímeras compõem uma corola tubuliforme correspondente ao gineceu, aparelho reprodutor feminino. O androceu, aparelho reprodutor masculino, é formado por um estaminódio petalóide de matizes amarela e escarlate. Apesar de as várias espécies da família Zingibereaceae possuírem muitas estratégias reprodutivas e de polinização (KRESS; BEACH, 1994; SAKAI; KATO; INOUE, 1999), a flexistilia é a mais comumente observada no gênero *Alpinia* (RENNER, 2001; BARRETT, 2002). Reprodutivamente falando, há ativação dos aparelhos reprodutores ginecóide e andróide em períodos distintos, ocorrendo diariamente neste gênero (BARRETT, 2002). Essa estratégia evolutiva favorece a polinização cruzada, contudo há relatos de xenogâmia facultativa e autopolinização (CRUDEN, 1977).



Figuras 3 e 4 - Fotos ilustrativas de *Alpinia zerumbet*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Em exemplares de *A. zerumbet*, células oleíferas encontram-se no mesófilo e na face abaxial das folhas (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004). Essas são as principais regiões anatômicas de onde é retirado o óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAZ).

A literatura afirma que os efeitos medicinais da *A. zerumbet* advêm de substâncias químicas existentes nas diferentes partes da planta. Dependendo da região anatômica utilizada como matéria-prima na fabricação do óleo, esses compostos podem existir em maior ou menor quantidade, bem como estar associados a respostas fisiológicas distintas. No caso do OEAZ, utilizado neste estudo, obtido por meio de suas folhas, as substâncias que se apresentam em maiores concentrações são o terpinen-4-ol, 1,8 cineol e gama-terpineno (LAHLOU, 2003).

Terpinen-4-ol

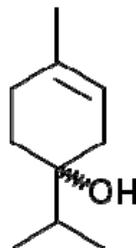


Figura 5 - Fórmula química do terpinen-4-ol

Lahlou *et al* (2003) avaliaram a atividade hipotensora do OEAZ e do terpinen-4-ol, constatando que o composto mais abundante no extrato do óleo possui uma ação redutora dose-dependente sobre a pressão arterial média, dez vezes maior do que a resposta induzida pelo OEAZ, também dose-dependente.

No trabalho de Calcabrini *et al* (2004) o terpinen-4-ol mostrou-se eficaz na inibição do crescimento *in vitro* de células de melanoma humanas. Essa descoberta representa um marco no tratamento dessa neoplasia, uma vez que o tumor é conhecido por ser altamente invasivo, metastático e resistente à quimioterapia. As células acometidas pelo melanoma também são caracterizadas por apresentar um alto potencial de resistência intrínseca a vários agentes citostáticos tanto *in vitro* como *in vivo* (SCHADENDORF *et al.*, 1994). O mecanismo apoptótico induzido pelo terpinen-4-ol foi o caspase-dependente, observando-se maior prevalência do efeito na variante celular portadora de resistência. Assim, o resultado positivo desta pesquisa constitui um advento promissor no tratamento dessa modalidade de câncer, especialmente em pacientes, cujas células tumorais são resistentes a múltiplas drogas (CALCABRINI *et al.*, 2004).

1,8-cineol



Figura 6 - Fórmula química do 1,8-cineol

O 1,8-Cineol, também conhecido como eucaliptol, é um monoterpene saturado usado tradicionalmente como medicação secretolítica em bronquite, sinusite e resfriados. Bioquimicamente falando, o 1,8-cineol e outros terpenos, como mentol ou cânfora, por exemplo, são isoprenóides (C_5) consistindo de duas subunidades de 2-isopreno (C_{10}). Essas moléculas estão relacionadas aos isoprenóides humanos, entre eles os sesquiterpenos (C_{15}), os hormônios esteróides ($2 \times C_{15}$), além dos glicocorticosteróides e dos tocoferóis (C_{20}), em que cada um deles apresenta um número crescente de subunidades de isopreno (JUERGENS *et al.*, 2003).

Em se tratando das propriedades desse composto, a literatura discorre sobre a inibição do mecanismo da ciclooxigenase como primeira evidência de uma potencial atividade antiinflamatória (DEWHIRST, 1980). Sabe-se também que os mediadores inflamatórios induzem hipersecreção por estimulação da secreção do íon cloreto (Cl⁻) nas vias aéreas (LUNDGREN; SHELHAMER, 1990; MARON *et al.*, 1982). Por causa disso, Juergens, Stöber e Vetter (1998) relataram que o 1,8-cineol demonstrou uma supressão esteróide-símile do metabolismo do ácido aracdônico e da produção *in vitro* de citocinas. Além disso, o 1,8-cineol mostrou uma inibição dose-dependente da produção de mediadores de monócitos em níveis terapêuticos plasmáticos *in vitro*, cuja magnitude do efeito pode ser comparada à ação de budesonida (JUERGENS; STÖBER; VETTER, 1998). Ainda, estudos controlados ratificaram uma significativa melhora nos testes de função pulmonar (WITTMANN *et al.*, 1998; KASPER *et al.*, 1994) enquanto pesquisas não controladas atestaram uma inibição importante de LTB₄ e IL-1 em monócitos estimulados *ex vivo* após terapia adicional com 1,8cineol (JUERGENS; STOBER; VETTER, 1998).

Juergens *et al* (2003) descreveram a ação do 1,8-cineol quando da sua administração no tratamento da asma brônquica. Embora o uso de óleos essenciais na prática clínica permaneça insipiente, devido a efeitos colaterais como irritação das vias aéreas superiores e reações bronco-espásticas agudas, a família dos monoterpenos, da qual o eucaliptol faz parte, parece ser bem tolerada. Na Alemanha, por exemplo, o 1,8-cineol é registrado como produto medicinal licenciado e comercializado na forma de cápsulas, que são facilmente absorvidas no trato gastrintestinal (JUERGENS *et al.*, 2003).

Santos (2001) avaliou seu poder gastroprotetor, utilizando um modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol em ratos. Ressaltou a importância deste modelo, haja vista que o álcool é o agente etiológico mais prevalente de úlcera gástrica em humanos. O etanol também é muito usado para avaliação da atividade anti-ulcerativa, pois promove hiperemia da mucosa gástrica, por aumento da permeabilidade vascular, caracterizada como um evento de natureza inflamatória (SZABO, 1985). Observou eficácia e segurança da utilização do 1,8-cineol na gastroproteção induzida pelo álcool, e verificou que essa ação não é atribuída nem à liberação de adenosina endógena nem à liberação de óxido nítrico, substâncias, cujas vias de atuação encontram-se descritas na literatura e estão interligadas na cascata antiinflamatória.

Ainda contribuindo com o corpo de evidências favoráveis ao uso do 1,8-cineol na prática clínica, descobriu-se que ele é capaz de inibir a produção de citocinas em linfócitos e monócitos humanos. A relevância desse achado é promissora no sentido de constituir uma

alternativa ao uso dos glicocorticóides inaláveis. Por conseguinte, concluiu-se que monoterpenos isolados, como o 1,8-cineol, podem oferecer uma nova modalidade de tratamentos de curto e longo prazo contra doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma, uma vez que mostrou eficácia antiinflamatória similar à posologia de 3,75 mg de prednisona por dia em portadores de asma severa. Os resultados da pesquisa afirmam que as propriedades do 1,8-cineol podem ser descritas como segue: inibe as vias Th1 e Th2, além de ser um potente inibidor da produção de TNF- α , IL-1 β e de quimiotáticos, entre eles IL-8 e IL-5 (JUERGENS, 2004).

O efeito relaxante vascular está intimamente associado à ação de componentes do OEAZ com o endotélio (PINTO *et al.*, 2009). Ainda não foram esclarecidos precisamente quais fatores da camada vascular interagem com componentes do OEAZ, no entanto, evidenciou-se que a inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOs) por meio de L-NAME aboliu completamente a resposta verificada. Isso sugere que o OEAZ atua ou na produção ou na liberação do óxido nítrico (NO). Além disso, verificou-se também que a remoção da camada endotelial impedia esse efeito relaxante. Sabe-se que alguns agonistas, como acetilcolina (ACh), bradicinina e ATP, que estimulam a síntese e liberação de NO, podem também estimular a liberação de prostaciclina (NILIUS; DROOGMANS, 2001). Constatou-se também ser improvável que o relaxamento vascular induzido tanto pelo OEAZ quanto pelo 1,8 - cineol (CIN) envolva parcialmente a liberação de prostaciclina, visto que indometacina não interferiu nesta ação (PINTO *et al.*, 2009). Por outro lado, há descrições de que a redução do íon cálcio no meio intracelular das células musculares lisas de forma a resultar em relaxamento dos vasos pela indução do NO, é devido não somente à ativação da guanilato ciclase, mas também ao aumento do efluxo de íons potássio decorrente da ativação dos canais desse cátion (ARNOLD *et al.*, 1977). A consequência desse fenômeno, portanto, é uma hiperpolarização das células do endotélio vascular, tornando-as menos propícias à vasoconstrição (TARE *et al.*, 1990).

γ -terpineno

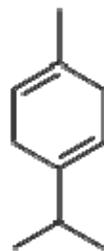


Figura 7 - Fórmula química do γ -terpineno

O γ -terpineno, por sua vez, possui, entre outras propriedades, efeito antioxidante na oxidação do linoleato de metila, do DNA e de eritrócitos (LI; LIU, 2009), além de potencial sinérgico na inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) quando usado em associação com o flavonóide rutina (MILDE; ELSTNER; GRASSMANN, 2004) como também inibição da peroxidação lipídica (FOTI; INGOLD, 2003).

Estudos laboratoriais *in vitro* corroboraram a atividade anti-hipertensiva da *A. zerumbet*, utilizada no nordeste brasileiro com finalidades anti-hipertensiva e diurética (LEAL-CARDOSO; FONTENELES, 1999; LAHLOU *et al.*, 2003).

Do extrato aquoso de *A. zerumbet* foram obtidos flavonóide e pironas kava. Os flavonóides identificados foram: rutina, quercetina, caempferol-3-*O*-rutinosídeo, caempferol-3-*O*-glicuronídeo, (+)-catequina e (-)-epicatequina. Substâncias estas conhecidas por contribuir com efeitos antioxidantes, hipotensores, diuréticos e antiulcerogênicos. As pironas kava, por sua vez, obtidas a partir do extrato aquoso, foram diidro-5,6- desidrokawain (DDK) e 5,6-desidrokawain (DK), que possuem características antiulcerogências e antitrombótica. As propriedades dessas substâncias, já bastante elucidadas pelo acervo científico, e que não tinham sido previamente isoladas das folhas de *A. zerumbet*, pode explicar o uso dessa planta no tratamento da hipertensão (MPALANTINOS *et al.*, 1998).

Segundo pesquisas anteriores, vinho tinto isento de álcool e alguns produtos obtidos a partir da pele de uvas de áreas vinícolas são ricos em flavonóides, os quais apresentam efeitos vasodilatador e anti-hipertensivo em modelos experimentais com animais (SOARES DE MOURA *et al.*, 2004).

A literatura também alega que os isoflavonóides possuem atividade antibacteriana, antialérgica, antimutagênica e anticoagulante (MIZUI *et al.*, 1987). A rutina, por exemplo, detém propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antimutagênicas e antitumorais, como também pode ser um bom agente terapêutico no tratamento de sangramento de córnea, derrames capilares e trombose coronariana (TRNOVSKY *et al.*, 1993; PISHA; PEZZUTO, 1994; YILDIZOGLE *et al.*, 1991). A quercetina, por sua vez, é popularmente conhecida como um forte quelante para íons metálicos, um seqüestrador de radicais livres, um inibidor da xantina oxidase, além de estar envolvido na prevenção de doenças cardiovasculares e úlceras pépticas (KNEKT *et al.*, 2002).

Além disso, os estudos descritos a seguir foram sobremaneira importantes, porque avaliaram o efeito protetor da rutina ou da quercetina em ratos submetidos à injeção subcutânea de isoproterenol.

Stanley e Priya (2010) obtiveram evidências histológicas e *in vitro* de que a rutina protege as enzimas lisossomais cardíacas em ratos submetidos às condições acima citadas. Esse resultado é devido ao seqüestro de radicais livres e à propriedade antioxidante da rutina, bem como de sua capacidade de estabilizar a membrana celular, todas atribuídas a esse flavonóide.

Punithavathi e Stanely (2010), por sua vez, constataram que o pré-tratamento combinado de quercetina e alfa-tocoferol foi intensamente capaz de normalizar todos os parâmetros bioquímicos utilizados para análise de lesão mitocondrial decorrente de infarto, preservar a integridade do tecido cardíaco e restituir a função mitocondrial normal em ratos, cujo miocárdio encontrava-se infartado.

Punithavathi, Shanmugapriya e Prince (2010) observaram os efeitos protetores da rutina *in vivo* e *in vitro* em ratos que apresentavam cardiotoxicidade induzida por isoproterenol em um estudo que pode ter um impacto significativo sobre pacientes acometidos por IAM. Os mecanismos sugeridos para explicar essas constatações são: seqüestro de radicais livres, redução de peróxidos lipídicos e de cálcio, além do aumento de atividades multienzimas, níveis de glutathione e trifosfato de adenosina (ATP) de forma a melhorar a estrutura e a função mitocondriais no coração.

Prince e Sathya (2010) afirmaram que a quercetina diminuiu a elevação do segmento ST e os níveis de produtos da peroxidação no plasma e no coração de ratos tratados com isoproterenol. Houve também redução dos níveis de colesterol total, triglicérides, ácidos graxos livres, lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente). Em contrapartida, constatou-se aumento significativo de lipoproteína de alta densidade (HDL). Portanto, a atividade antioxidante da quercetina inibe a peroxidação lipídica e previne o acúmulo de lipídios, além de alterações nas lipoproteínas e no eletrocardiograma de ratos, cuja cardiotoxicidade foi induzida por isoproterenol. Por fim, Punithavathi e Prince (2009) avaliaram o efeito combinado da quercetina e do α -tocoferol no metabolismo lipídico e nos componentes de glicoproteínas em murinos também tratados com isoproterenol.

Dentro desse contexto buscamos avaliar os efeitos do óleo essencial de *Alpínea zerumbet* neste tipo de injúria.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL:

- Avaliar os efeitos do OEAZ no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos.

2.2.ESPECÍFICOS:

Usando um modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos, objetivamos:

- Avaliar, em nosso meio, o modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos, usando análises bioquímica e histopatológica, por meio de um estudo piloto
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre a mortalidade
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre a variação do peso dos animais
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre os níveis séricos de marcadores de injúria miocárdica;
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre os níveis de hemoglobina e contagem de leucócitos e neutrófilos
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre os níveis séricos de marcadores de função renal
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre a atividade da enzima catalase no miocárdio;
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre os níveis de glutathiona no miocárdio;
- Avaliar os efeitos do OEAZ sobre as alterações histopatológicas no ápice do ventrículo esquerdo.

3. MÉTODO

3.1. Aspectos éticos

Os protocolos utilizados nesse trabalho foram feitos de acordo com os padrões éticos estabelecidos pela Comissão de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo (69/10). Foram obedecidas as normas estabelecidas pelo Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

3.2. Amostra

Foram utilizados 76 ratos jovens, púberes, machos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), pesando de 145 a 230 g, peso médio g, da linhagem Wistar, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

3.3. Ambiente de Experimentação

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Observou-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Os ratos foram alimentados com uma dieta padrão com a seguinte composição: 22% de proteína, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo, 5% de extrato etéreo, 8% de matéria fibrosa, 10% de matéria mineral, 12% de umidade. A dieta era enriquecida com as seguintes substâncias, por quilograma do produto: vitamina A 13.200 UI, vitamina D3 2.000 UI, vitamina B1 5,0 mg, vitamina B2 6,0 mg, vitamina B12 23 mcg, vitamina E 35 mg, vitamina K3 5 mg, biotina 0,05 mg, niacina 60 mg, colina 650 mg, lisina 100 mg, metionina 300 mg, cobre 10 mg, manganês 60 mg, ferro 50 mg. A água oferecida era potável. A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente.

Os ratos foram previamente aclimatados por um período de 7 dias antes da realização dos experimentos. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

3.4. Protocolo Piloto

Para a validação do modelo de infarto induzido por isoproterenol, modelo experimental novo em nossa universidade, foi realizado um estudo piloto com 16 ratos, divididos de forma aleatória em dois grupos de oito ratos cada: grupo Piloto-Controle e grupo Piloto-ISO. O grupo Piloto-Controle foi submetido à falsa indução do infarto do miocárdio. No grupo Piloto-ISO, os ratos foram submetidos à indução do infarto do miocárdio. Vinte e quatro horas após a última aplicação de ISO, os ratos de ambos os grupos foram anestesiados e sacrificados, para estudo histopatológico do ápice cardíaco.

3.5. Protocolo Estudo

3.5.1. Distribuição dos grupos

Um grupo de 60 ratos foi distribuído ao acaso em quatro grupos:

- **Grupo Simulado (SHAM) (n: 10):** recebeu administração diária durante catorze dias de 0,5 ml de água destilada (AD), por gavagem, e nos dias 13 e 14, foi realizada falsa indução de infarto do miocárdio com solução salina.

- **Grupo Controle (CONTROLE) (n:10):** recebeu administração diária durante catorze dias de 0,5 ml de AD, por gavagem, e nos dias 13 e 14, foi realizada indução de infarto do miocárdio com isoproterenol .

- **Grupo Óleo essencial de *Alpínea Zerumbet* com falsa indução de Infarto (OEAZ-SAL) (n: 10):** foi administrado durante catorze dias por gavagem, óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAZ), e nos dias 13 e 14 foram submetidos à falsa indução de infarto do miocárdio .

- **Grupo Óleo Essencial de *Alpínea Zerumbet* com indução de Infarto (OEAZ-ISO) (n: 20):** foi administrado durante catorze dias por gavagem OEAZ, e nos dias 13 e 14 foram submetidos à indução de infarto do miocárdio.

Os ratos de cada grupo foram pesados individualmente, no primeiro dia (D1), no sétimo dia (D7) e no décimo segundo dia (D12) do experimento, para permitir o cálculo das doses das drogas administradas no curso do estudo.

Os animais permaneceram em jejum e sem oferta de água a partir de 2 horas antecedentes à realização da gavagem para administração de AD ou OEAZ. A gavagem era rotineiramente realizada às oito horas da manhã.

Os animais permaneceram em jejum e sem oferta de água a partir de 12 horas antecedentes à realização da anestesia que precedeu o sacrifício, para coleta de sangue , com

intuito de realizar hemograma completo e as dosagens de uréia, creatinina, TGO, TGP e troponina I, retirada do ápice do ventrículo esquerdo para exame histopatológico e fragmento do ventrículo esquerdo, para avaliação da atividade da catalase e dos níveis de glutathiona.

3.5.2. Procedimento anestésico

A técnica escolhida para anestesia envolveu o uso de cloridrato de cetamina, utilizada na dose de 50 mg/kg do animal e cloridrato de xilasina, utilizada na dose de 10 mg/kg do animal, ambas aplicadas por via intraperitoneal. O animal foi considerado anestesiado quando se apresentava imóvel ao manuseio com ausência de resposta a estímulos nociceptivos, enquanto mantinha frequência e amplitude respiratórias normais.

3.5.3 Indução do Infarto do Miocárdio com Isoproterenol

A indução do infarto do miocárdio foi realizada mediante a administração subcutânea de isoproterenol, numa dose de 150 mg/kg/dia diluída em 2 ml de solução salina, durante dois dias consecutivos, dias 13 e 14 com um intervalo de 24 horas entre as aplicações. A falsa indução do infarto do miocárdio foi realizada por meio da administração subcutânea de 2 ml de solução salina durante dois dias consecutivos com um intervalo de 24 horas entre as aplicações. Estes procedimentos eram rotineiramente realizados duas horas após as realizações das gavagens.

3.5.4 Preparo e administração das drogas utilizadas

Água destilada

A água destilada administrada por meio de gavagem nos grupos CONTROLE e SHAM é produzida pela empresa Fresenius Kabi Brasil Ltda.

Solução salina

A solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) administrada por via subcutânea, nos grupos Piloto-Controle, OEAZ-SAL e SHAM, e utilizada no preparo da solução de isoproterenol, nos grupos Piloto-ISO, CONTROLE e OEAZ-ISO, é produzida pela empresa Halex Istar Indústria Farmacêutica.

Óleo essencial de *Alpinea zerumbet*

As folhas frescas usadas para preparar o OEAZ foram extraídas de uma plantação localizada no sítio Vila Nova, no distrito de Ladeira Grande, município de Maranguape, no estado do Ceará – Brasil. A topografia exata é 3°59'26.49" de latitude sul e 38°42'59.10" de longitude oeste. A identificação botânica do referido espécime é feita de acordo como o herbáreo Prisco Bezerra da UFC.

O óleo essencial foi isolado pela técnica do arraste de vapor, cuja principal vantagem deve-se à extração dos constituintes prescindindo temperaturas elevadas, isto é, evita assim a degradação por mecanismo de pirólise. Na etapa laboratorial do processo, é realizada uma destilação simples por meio do uso de um funil de adição, o qual permite acréscimo de água a uma vazão constante. Assim, o nível de água no rasco de destilação permanece inalterado.

Estudo por cromatografia do OEAZ, realizado pelo Laboratório de CG/EM, do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, evidenciou a seguinte composição com as respectivas percentagens:

- Terpinen-4-ol: 25,7%
- 1,8-Cineol: 24,61%
- γ -Terpineno: 14,28%
- Sabineno: 10,99%
- ρ -Cimeno: 5,88%
- α -Tunjeno: 4,49%
- α -Terpineno: 2,89%
- β -Pineno: 2,82%
- z- Cariotileno: 1,73%
- α -Pineno: 1,72%
- Terpinoleno: 1,5%
- α -Terpineol: 1,21%
- Óxido de Cariofileno: 1,14%
- Linalool: 1,05%

A administração do OEAZ, na dose de 100mg/kg de peso, nos grupos AZ-SAL e AZ-ISO foi realizada por meio de gavagem, durante os 14 primeiros dias do procedimento. As doses calculadas levaram em consideração os pesos dos animais em D1, D7 e D12, sendo modificadas, neste dias, de acordo com o ganho ou perda de peso do animal. Para cada rato a

dose do OEAZ, era devidamente pesada, no interior de uma seringa de 1 ml em balança de precisão, e adicionada a AD, para formar uma suspensão de 0,5 ml, sendo então administrada.

Isoproterenol

O cloridrato de isoproterenol foi obtido da empresa Sigma, na forma de frascos contendo, em cada um, um grama do pó do princípio ativo puro. A dose calculada no grupo Piloto-ISO levou em consideração o peso do animal no primeiro dia de indução do infarto do miocárdio. As doses administradas nos grupos CONTROLE e AZ-ISO, eram calculadas baseadas nos pesos dos animais avaliados no D12. Para a aferição do peso do princípio ativo (150 mg/kg de peso do animal) foi utilizada uma balança de precisão. De posse da quantidade exata da substância, foi composta uma solução com 2ml de solução salina para administração subcutânea.

Cloridrato de Cetamina

O cloridrato de cetamina foi obtido da empresa Cristália, em frasco com concentrações de 50 mg/ml. Por ocasião do dia do sacrifício foi administrada, por via intraperitoneal, uma dose de 50 mg/kg de peso do animal..

Cloridrato de Xilasina

O cloridrato de xilasina foi obtido da empresa Konig, em frasco com concentrações de 20mg/ml. Por ocasião do dia do sacrifício foi administrada, por via intraperitoneal, uma dose de 10 mg/kg de peso do animal.



Figura 8 - Aplicação intraperitoneal das drogas anestésicas

3.5.5. Obtenção das Amostras

Vinte e quatro horas após a indução do infarto, verdadeiro ou falso, os ratos dos os grupos foram anestesiados conforme descrito. Após adequado plano anestésico foi realizada uma incisão em T invertido se estendendo do pescoço ao púbis.

Coleta de sangue

Obteve-se acesso ao retroperitônio, sendo dissecada a aorta abdominal, em sua porção infra-renal. A coleta do sangue foi então efetuada por meio de uma punção da aorta abdominal com um jelco descartável de número 24 (24 gauge). Dessa forma a aorta era cateterizada com o jelco, sendo desprezado o mandril, agulha presente no interior do jelco. Com o uso de uma seringa descartável de 5 ml, acoplada ao jelco, eram colhidos 5 ml de sangue. Deste volume, 2 ml eram armazenados em um tubo para realização de hemograma completo e 3 ml em um tubo para as dosagens bioquímicas (uréia, creatinina, TGO e troponina I). Os tubos, devidamente identificados, eram então postos em um isopor com gelo.



Figura 9 - Dissecção da aorta abdominal



Figura 10 - Punção da aorta abdominal com jelco

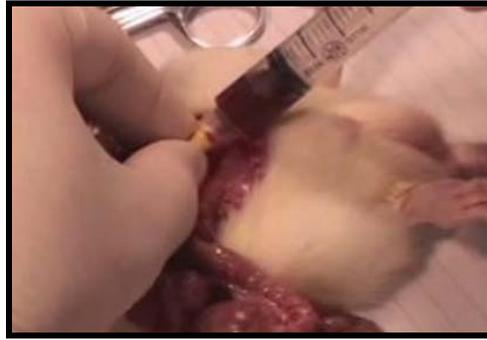


Figura 11 - Coleta da amostra de sangue no interior da seringa



Figura 12 - Armazenamento da amostra de sangue em frascos específicos

Coleta do ápice cardíaco para estudo histopatológico e imunohistoquímico

Após a fase de coleta do sangue, procedeu-se de forma imediata a abertura do tórax e retirada do coração, por secção da aorta, artéria pulmonar, veia cava e átrio esquerdo. O coração era então lavado com solução salina e o ápice era posto em um frasco, devidamente identificado, contendo solução de formolina a 10% tamponado.

Coleta de fragmentos do miocárdio para mensuração da atividade da enzima catalase e dos níveis de glutathione

Após a fase de coleta do ápice cardíaco, procedeu-se de forma imediata a ressecção de dois fragmentos da musculatura do ventrículo esquerdo. Este fragmento era pesado e colocado no interior de um criotubo devidamente identificado, sendo posto em recipiente contendo nitrogênio líquido. Após coleta dos fragmentos em todos os ratos, os criotubos foram armazenados em um freezer numa temperatura de -70 graus C, até a realização da análise, em um período de até duas semanas.

3.6. Exames bioquímicos

Os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório Evandro Chagas, localizado no edifício da Casa de Saúde e Maternidade São Raimundo, em Fortaleza, cadastrado sob número 2529157 na Agência Nacional de Saúde (ANS).

3.7. Avaliação histopatológica

Os exames histopatológicos foram realizados no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os ápices dos corações, fixados em solução de formalina a 10% foram embebidos em parafina, em um período de cerca de 24 horas após o início da fixação. Cortes medindo quatro micrometros foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e observados microscopicamente. A gravidade e extensão do infarto do miocárdio foi observada para cada caso. O patologista não sabia a qual grupo correspondia cada lâmina. Os achados foram classificados nos seguintes graus: (0) sem alterações; (1) Leve (dano miócito focal ou pequena degeneração multifocal com ligeiro grau de processo inflamatório); (2) Moderado (extensa degeneração miofibrilar e/ou processo inflamatório difuso); (3) Acentuado (necrose com processo inflamatório difuso) (ACIKEL et al., 2005).

3.8 .Avaliação da atividade da enzima catalase

A atividade da catalase foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Foi medida de acordo com o método descrito por Aebi em 1994. 20µL do homogenato do tecido a 5% em tampão fosfato (50mM, pH 7) foram adicionados a 2 mL de tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7) contendo H₂O₂ 10mM. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 nmol de H₂O₂ por minuto, a 25 °C e pH 7. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 230 nm. Os resultados foram expressos como milimols por minuto por grama de tecido (mmol/min/g tecido).

3.9. Avaliação dos concentrações de grupos sulfidrilas não protéicos (Glutathiona)

O tecido foi homogeneizado com uma solução de EDTA 0,02M gelado, para preparação do homogenato a 10%. Em seguida, foram adicionados, a uma alíquota de 0,5 mL do homogenato, 0,4 mL de água destilada e 0,1 mL de ácido tricloroacético 50%, e então as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. Um volume de 0,5 mL foi então

retirado do sobrenadante e adicionados 1 mL de tampão Tris 0,4 M pH 8,9 e 25 μ L de DTNB 0,01 M. A absorbância foi medida dentro de 5 min a 412 nm. A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva padrão de glutatona reduzida (GSH) e os resultados expressos em μ g de NP-SH/g de tecido.

3.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* estatístico SPSS® para *Windows* (v.16, SPSS Inc. Chicago, IL). As variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* foram apresentadas por média e desvio padrão. A dosagem de troponina no estudo PILOTO foi a única variável que não apresentou distribuição normal, sendo representada pelos valores mínimo e máximo, pela mediana e pelo intervalo interquartil.

No estudo piloto, utilizou-se teste *t* de *Student* para a comparação de transaminases entre os grupos PILOTO-CONTROLE e PILOTO-ISO. Para a dosagem de troponina foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. ANOVA *one-way* com comparações múltiplas de médias (*post-hoc* Tukey) foi o teste realizado em todas as variáveis do grupo ESTUDO.

Os resultados foram expressos em forma de gráficos, o qual foram elaborados com o *software* GraphPad® (v.5, GraphPad Software, San Diego, CA).

Em todas as análises estabeleceu-se 0.05 como probabilidade α do erro tipo I, sendo considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 5\%$ (IC 95%).

4. RESULTADOS

4.1. Piloto

4.1.1 Efeito do isoproterenol sobre a mortalidade

A mortalidade no grupo PILOTO-ISO foi de de 37.5% (3 óbitos), enquanto que não houve óbito no grupo PILOTO-CONTROLE.

4.1.2 Efeito do isoproterenol sobre a dosagem de TGO, TGP e troponina I no sangue e

Os ratos submetidos à administração de isoproterenol apresentaram um aumento de transaminases, porém a diferença não foi significativa (TGO – U:5; W:20; p: 0.143) (TGP – U:7; W:22; p:0.278). Em relação aos níveis de troponina, a diferença foi estatisticamente significativa (U:0; W: 15; p: 0.007*).

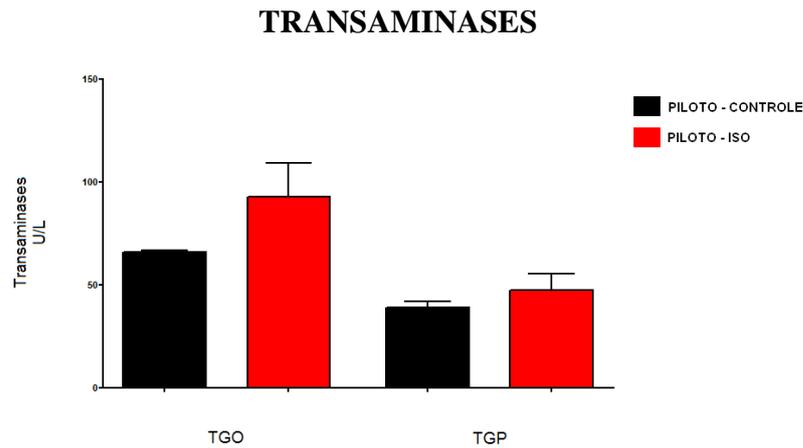


Figura 13- Níveis de transaminases (U/L) nos dois grupos do estudo piloto representados pela média e desvio padrão. O grupo PILOTO-CONTROLE apresenta níveis maiores de TGO em relação aos grupos SHAM,OEAZ-ISO e OEAZ-SAL, porém essa diferença não é estatisticamente significante.

TROPONINA

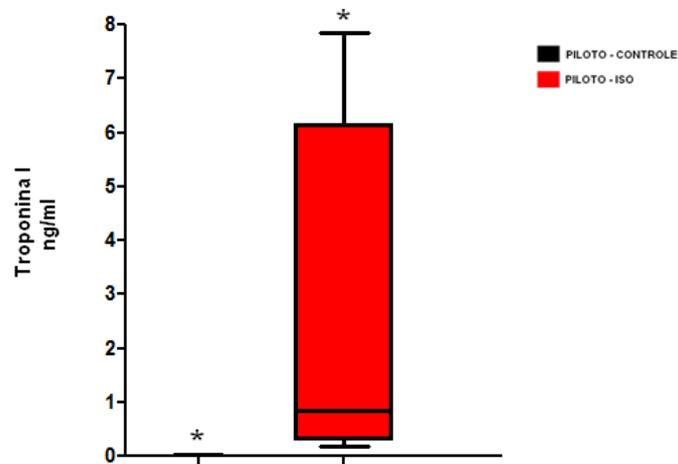


Figura 14 - Níveis de troponina (ng/ml) nos dois grupos do estudo piloto, representados pelos valores mínimo e máximo, mediana e intervalo interquartil. O grupo PILOTO-ISO apresenta níveis maiores de troponina em relação aos grupo CONTROLE e essa diferença é estatisticamente significativa.

* Grupo SHAM e grupo CONTROLE; $p=0.001$

4.1.3 Efeito do isoproterenol sobre o miocárdio: avaliação histopatológica

Os ratos do grupo PILOTO-ISO tiveram uma maior pontuação na escala histológica de lesão miocárdica em relação ao grupo PILOTO-CONTROLE, tanto na porção distal quanto proximal do ápice do ventrículo esquerdo, com diferença estatisticamente significativa ($U= 0$; $W= 36$; $p=0.00$).

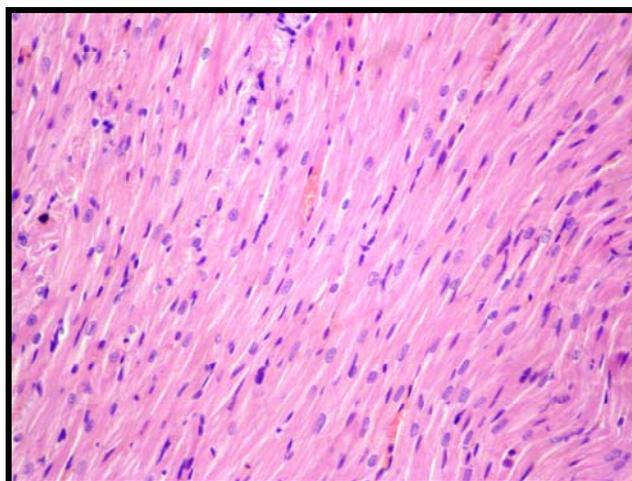


Figura 15 – Estudo histopatológico demonstrando tecido miocárdico com ausência de alterações histológicas (Grau 0)

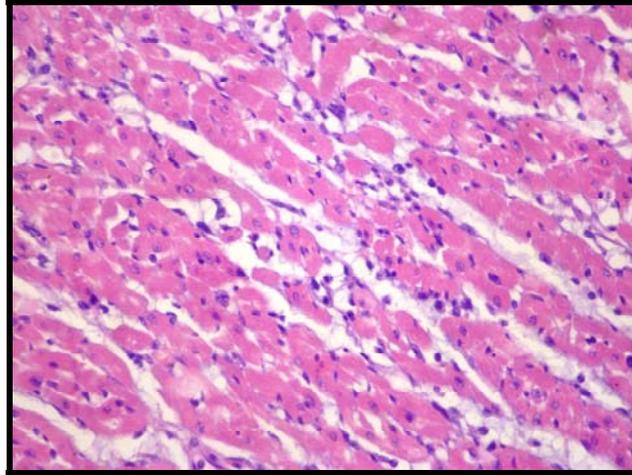


Figura 16 - Estudo histopatológico demonstrando tecido miocárdico com alterações histológicas leves (Grau 1)

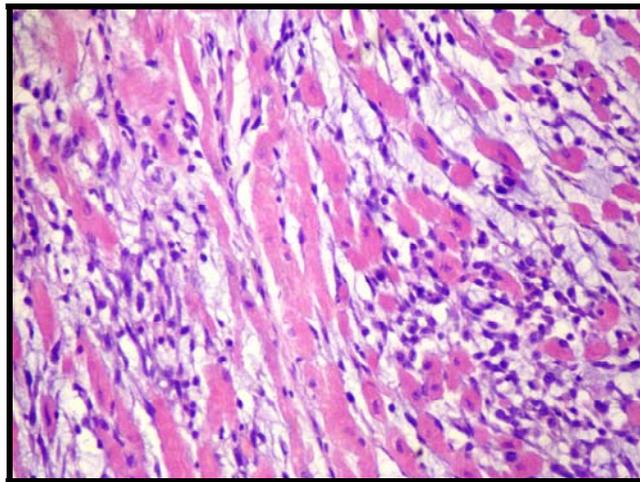


Figura 17 - Estudo histopatológico demonstrando tecido miocárdico com alterações histológicas moderada (Grau 2)

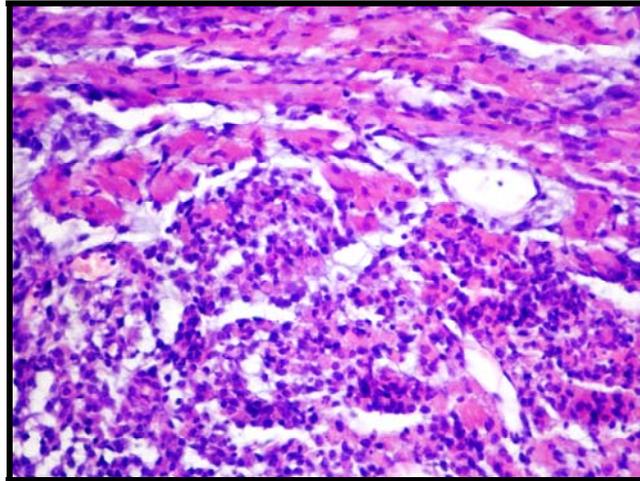


Figura 18 – Estudo histopatológico demonstrando alterações histológicas acentuadas (Grau 3)

4.2. Estudo

4.2.1. Efeito do OEAZ sobre a mortalidade

Não houve mortalidade nos grupos SHAM e OEAZ-SAL. Não houve diferença entre as taxas de mortalidade dos grupos CONTROLE (25%) e OEAZ-ISSO (25%).

4.2.2. Efeito do OEAZ sobre a variação do peso dos animais

A média de peso dos animais foi semelhante nos quatro grupos. A administração do OEAZ não interferiu nas variações do peso durante os doze primeiros dias do experimento.

Tabela 1 - Valores da média \pm desvio padrão dos pesos dos animais, nos quatro grupos

GRUPOS	DIAS		
	D 1	D 7	D 12
SHAM	184 \pm 26.11	215.1 \pm 28.04	227 \pm 29.82
CONTROLE	184.45 \pm 17.4	212.65 \pm 21.99	223.05 \pm 29.08
OEAZ-SAL	187.5 \pm 13.59	207.8 \pm 24.62	221.9 \pm 24.86
OEAZ-ISO	187.37 \pm 16.7	216.47 \pm 25.11	231.47 \pm 26.77

Não houve diferença estatisticamente significativa

4.2.3. Efeito do OEAZ sobre os níveis séricos de TGO e TGP

O grupo CONTROLE apresentou níveis maiores de TGO em relação aos grupos SHAM, OEAZ-ISO e OEAZ-SAL. Os níveis séricos de TGO foram semelhantes nos quatro grupos..

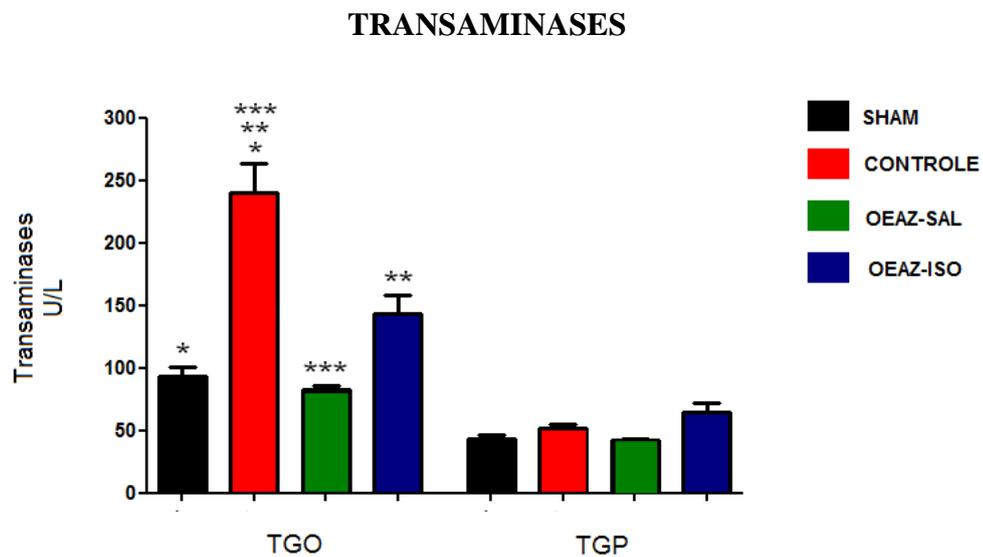


Figura 19 - Níveis de transaminases (U/L) nos quatro grupos em estudo representados pela média e desvio padrão. * Grupo SHAM e grupo CONTROLE; $p=0.002$
 ** Grupo CONTROLE e grupo OEAZ-ISO; $p=0.029$
 *** Grupo CONTROLE e grupo OEAZ-SAL; $p=0.002$

4.2.4. Efeito do OEAZ sobre a dosagem de troponina I no sangue

O grupo CONTROLE apresentou níveis maiores de troponina I em relação aos grupos SHAM, OEAZ-ISO e OEAZ-SAL.

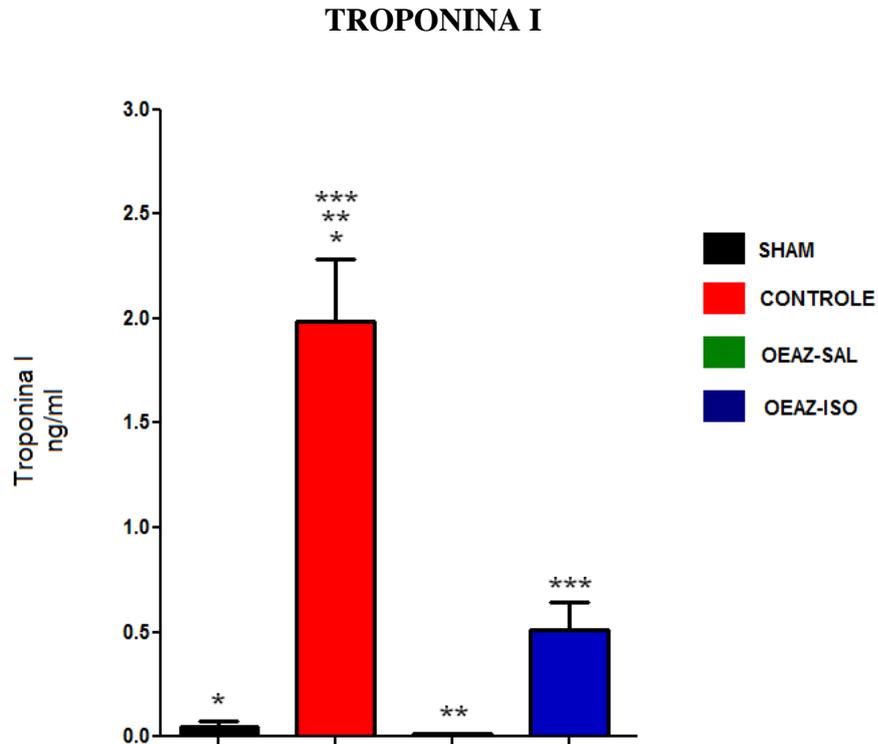


Figura 20 - Níveis de troponina (ng/ml) nos quatro grupos em estudo representados pela média e desvio padrão.

* Grupo SHAM e grupo CONTROLE; $p=0.002$

** Grupo CONTROLE e grupo OEAZ-ISO; $p=0.008$

*** Grupo CONTROLE e grupo OEAZ-SAL; $p=0.002$

4.2.5. Efeito do OEAZ sobre os níveis de hemoglobina

Não houve diferença estatisticamente significativa nos séricos de hemoglobina na comparação entre os grupos.

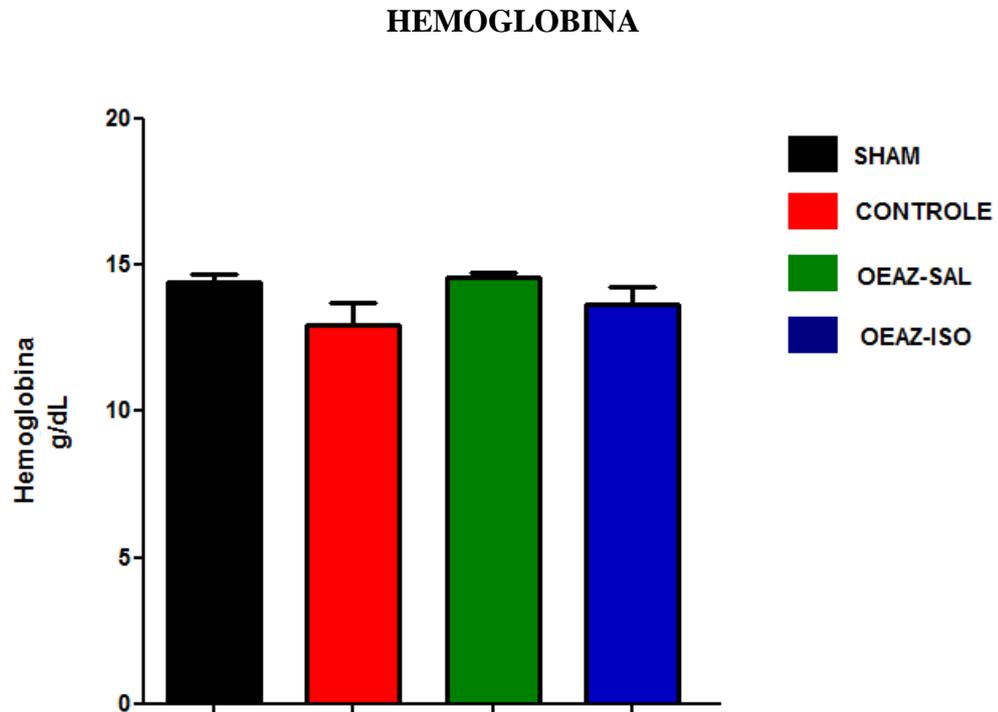


Figura 21- Níveis de hemoglobina (g/dL) nos quatro grupos em estudo representados pela média e desvio padrão.

4.2.6. Efeito do OEAZ sobre a contagem do número de leucócitos e neutrófilos

Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de leucócitos entre os grupos.

O grupo CONTROLE apresentou em média maior número de neutrófilos relação aos grupos SHAM e OEAZ-SAL, sendo essa diferença estatisticamente significativa. O grupo OEAZ-ISO exibiu média maior de neutrófilos em relação ao grupo OEAZ-SAL, porém não há diferença estatisticamente significativa.

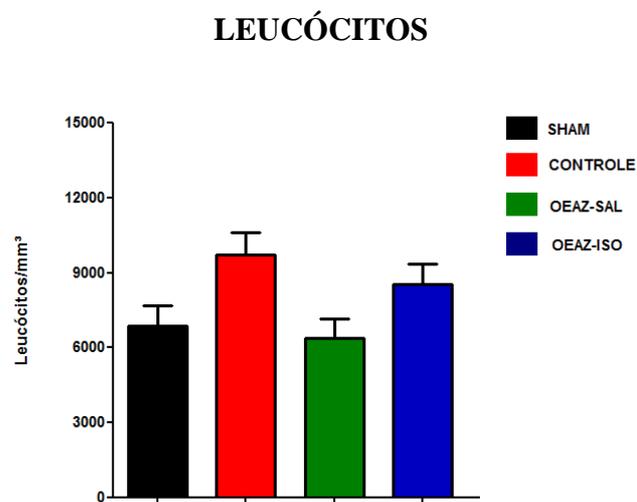


Figura 22 – Contagem de leucócitos/mm³ nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão.

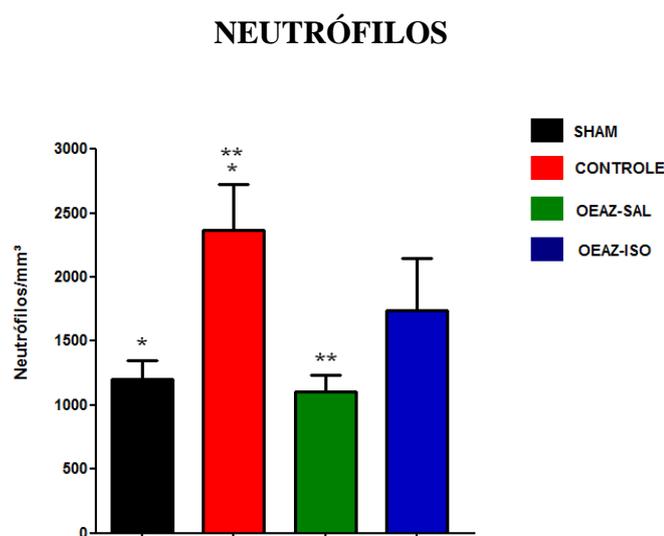


Figura 23 – Contagem de neutrófilos/mm³ nos quatros grupos representada pela média e desvio padrão.

* Grupo SHAM e grupo CONTROLE; $p=0.026$

** Grupo CONTROLE e grupo OEAZ-SAL; $p=0.014$

4.2.7. Efeito do OEAZ sobre a dosagem de uréia no sangue

O grupo CONTROLE apresentou níveis maiores de uréia em relação aos grupos SHAM e OEAZ-SAL, sendo essa diferença estatisticamente significativa. O grupo OEAZ-ISO apresenta em média níveis maiores de uréia em relação ao grupo OEAZ-SAL, com diferença estatisticamente significativa.

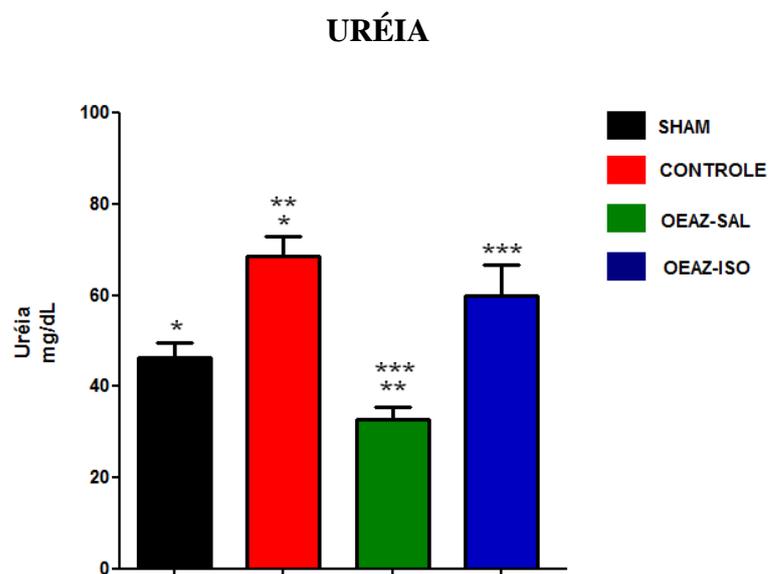


Figura 24 - Níveis de uréia (mg/dL) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão. * Grupo SHAM e grupo CONTROLE; $p=0.002$
** Grupo CONTROLE e grupo OEAZ-SAL; $p=0.000$
*** Grupo OEAZ-SAL e grupo OEAZ-ISO; $p=0.001$

4.2.8. Efeito do OEAZ sobre a dosagem de creatinina no sangue

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação aos níveis séricos de creatinina.

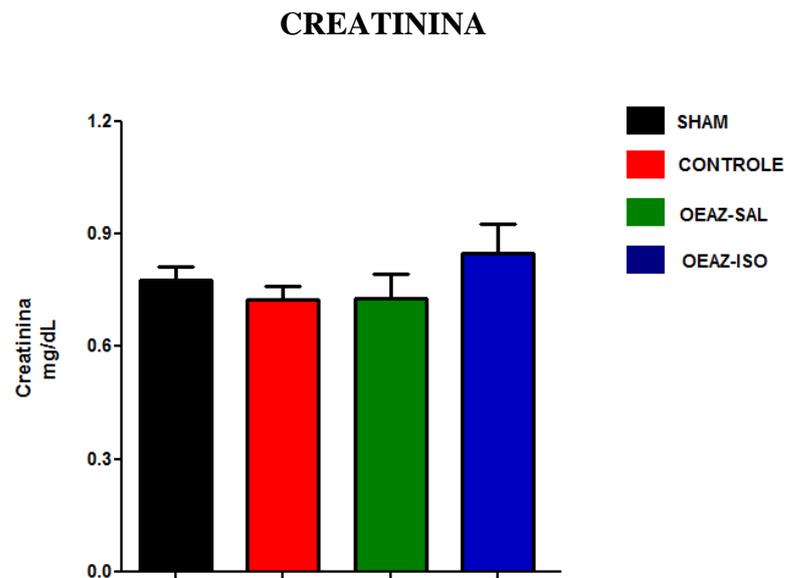


Figura 25 – Níveis de creatinina (mg/dL) nos quatro grupos em estudo representados pela média e desvio padrão.

4.2.9. Efeito do OEAZ sobre a atividade da enzima catalase no miocárdio

O grupo CONTROLE apresentou menor atividade da enzima catalase em relação aos grupos SHAM e OEAZ-SAL, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

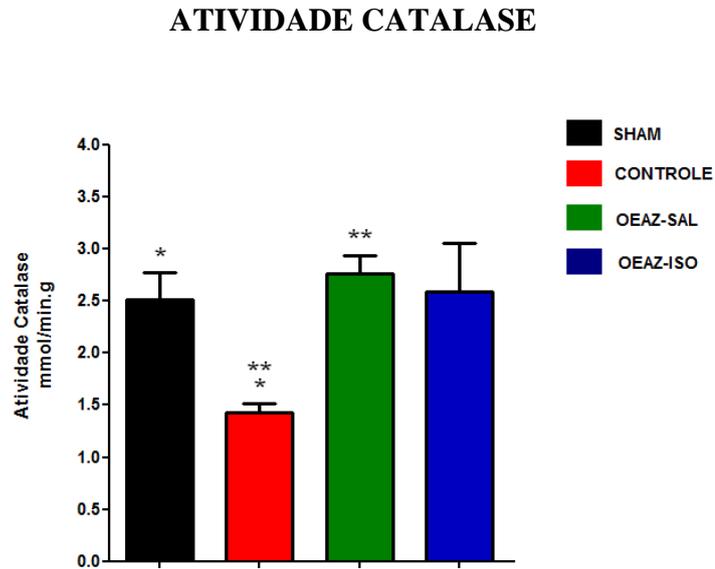


Figura 26 – Atividade da Catalase (mmol/min.g) nos quatros grupos em estudo representados pela média e desvio padrão.

* Grupo SHAM e grupo CONTROLE; $p=0.039$

** Grupo CONTROLE e grupo OEAZ-SAL; $p=0.001$

4.2.10. Efeito do OEAZ sobre os níveis de glutathiona no miocárdio

O grupo CONTROLE apresentou menor concentração de glutathiona em relação ao grupo SHAM. O grupo OEAZ-ISO não apresentou diferença significativa na concentração de glutathiona em relação ao grupo OEAZ-SAL.

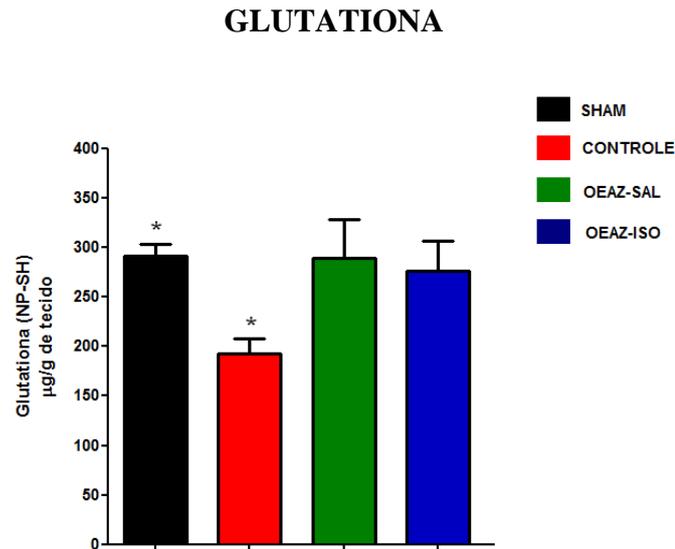


Figura 27 – A concentração de glutathiona NP-SH (µg/g de tecido) nos quatro grupos é representada pela média e desvio padrão.

* Grupo SHAM e grupo CONTROLE; $p=0.003$

4.2.11. Efeito do OEAZ sobre as alterações histopatológicas no miocárdio

Os grupos CONTROLE e OEAZ-ISO apresentaram maiores pontuações na escala histológica de lesão miocárdica em relação aos grupos SHAM E OEAZ-SAL, respectivamente, tanto na porção distal quanto proximal do ápice do ventrículo esquerdo, com diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença entre os grupos CONTROLE e OEAZ-ISO na avaliação deste parâmetro.

5. DISCUSSÃO

Esse estudo, desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, demonstrou que a indução do IM em ratos por administração subcutânea de isoproterenol é um modelo experimental prático e eficaz para a avaliação de possíveis benefícios de drogas na proteção do miocárdio em situação de estresse isquêmico. Conforme dados referentes ao estudo piloto, observou-se uma taxa de mortalidade de 37,5% no grupo PILOTO-ISO, enquanto não houve mortalidade no grupo PILOTO-CONTROLE. Essa observação condiz com dados da literatura, apontando o IM induzido por isoproterenol como causador de mortalidade nesse modelo experimental. Acikel *et al.*, (2005) relatou mortalidade de 33,3%, semelhante ao encontrado nessa pesquisa

A administração subcutânea de isoproterenol causa aumento significativo dos níveis séricos de marcadores de injúria miocárdica, como TGO, TGP, CPK, CK-MB, LDH e troponina (AHMED; RANA; DIXIT, 2004; VIMAL; DEVAKI, 2004; ACIKEL *et al.*, 2003). Os níveis plasmáticos desses marcadores são diretamente proporcionais ao grau de lesões necróticas presentes no miocárdio, e dessa forma servem como bom marcadores de dano ao tecido miocárdio (GEETHA; SAUKAR; THANKAMAN, 1990; ACIKEL *et al.*, 2005).

Foi observado nesse estudo que o grupo PILOTO-ISO apresentou maiores níveis de TGO, TGP e troponina I em relação ao grupo PILOTO-CONTROLE, sendo um aumento estatisticamente significativo no caso da troponina I.

Estudos prévios demonstraram que kits para dosagem de troponina T e I para humanos podem ser usados em ratos (CHOCRON *et al.*, 1996; O' BRIEN *et al.*, 1997). Nesse estudo optamos por aferir os níveis de TGO, TGP e troponina I. Foi observado que todos os ratos do grupo PILOTO-ISO apresentaram níveis de troponina I maiores que 0,1 ng/ml, valor de corte que indica IAM em humanos. No grupo PILOTO-SALINA todos apresentaram níveis de troponina igual a 0,01 ng/ml. Salientamos que no estudo piloto realizamos também medidas séricas de CPK, CK-MB e LDH, no entanto, ao contrário do que é observado na literatura, os resultados foram contraditórios não apresentando correlação alguma com administração de isoproterenol, níveis de TGO, TGP e troponina I, bem como com os achados ao exame histopatológico. Atribui-se a esse achado o fato de que CPK, CK-MB e LDH são enzimas mais inespecíficas podendo inclusive não haver compatibilidade do kit usados para humanos quando na avaliação em ratos. Por essa razão as dosagens desses três marcadores não foi usada para avaliação dos efeitos do OEAZ.

Ainda em relação ao estudo piloto, todos os ratos do grupo PILOTO-CONTROLE apresentaram ausência de alterações histopatológicas, definido como Grau 0. No grupo PILOTO-ISO, dos cinco ratos que sobreviveram apenas 1 apresentou alterações histopatológicas leves (Grau: 1) enquanto nos outros quatro todos apresentaram alterações histopatológicas acentuadas ou no corte distal, ou no corte proximal do ápice do ventrículo esquerdo, sendo em um caso em ambos os cortes. Dessa forma, em conformidade com diversos estudos, o modelo experimental foi adequadamente reproduzido em nosso meio.

Efeito do OEAZ sobre a mortalidade

Nesse estudo observamos uma taxa de mortalidade de 25% nos grupos CONTROLE e OEAZ-ISO. Salienta-se que não houve mortalidade nos grupos SHAM e OEAZ-SALINA, indicando claramente ser o isoproterenol o agente definidor para a mortalidade nos grupos CONTROLE e OEAZ-ISO. Esse dado também é importante, pois demonstra que a administração de OEAZ não causou mortalidade no grupo OEAZ-SAL, corroborando com dados já presentes na literatura demonstrando ausência de toxicidade desta formulação (OLIVEIRA, 2008).

Com base nesses resultados, observou-se que a pré-administração por 14 dias de OEAZ na dose de 100mg/kg de peso, neste modelo, não foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade ocasionada pelo IM.

Efeito do OEAZ sobre a variação do peso dos animais

Conforme descrito nos resultados, a administração do OEAZ não interferiu no ganho de peso dos animais, ao longo dos doze primeiros dias do experimento. Não foram encontrados estudos na literatura avaliando o efeito do uso continuado de OEAZ sobre o peso de animais. Dentro desse contexto, esse estudo esclarece que dentro de um prazo de doze dias não há alterações no ganho ponderal.

Efeito do OEAZ sobre os níveis séricos de TGO, TGP e troponina I

A pré-administração de OEAZ evitou o aumento substancial de TGO e troponina I nos ratos do grupo OEAZ-ISO em relação ao grupo OEAZ-SAL, indicando possível efeito protetor dessa formulação. Ao contrário, no grupo CONTROLE os níveis de TGO e troponina I foram significativamente maiores que no grupo SHAM.

Altos níveis séricos de TGO e troponina refletem altos graus de injúria miocárdica. A lesão aos cardiomiócitos induzida pelo isoproterenol está associada com os seguintes mecanismos de ação:

1 - Desbalanço entre o suprimento de oxigênio e a demanda dos cardiomiócitos, relacionado à hipotensão no leito coronariano e a hiperatividade miocárdica, pelo aumento do cronotropismo e inotropismo (YEAGER, 1982);

2 - Aumento da sobrecarga de Ca⁺⁺ intracelular (BLOM; DAVIS, 1972);

3 - Ativação da enzima adenilatociclase, com depleção dos níveis de ATP (BHAGATETAL, 1978);

4 - Aumento do estresse oxidativo por produtos do metabolismo do isoproterenol e geração de radicais livres (SINGAL *et al.*, 1982). Oxidação de catecolaminas aumenta a produção de ERO (REICHENBACH; BENDITT, 1970; BORS *et al.*, 1978; SINGAL *et al.*, 1983) resultando em disfunção miocárdica (YATES; DHALLA, 1975).

Substâncias que agem reduzindo a injúria miocárdica neste tipo de modelo experimental apresentam atividades atenuantes sobre um ou mais desses mecanismos.

Em relação ao primeiro mecanismo poderia se supor que o OEAZ pudesse exercer alguma forma de antagonismo da atividade adrenergica do isoproterenol. De acordo com dados da literatura, avaliando o efeito vasodilatador de componentes da *A. zerumbet*, sobretudo terpenos, dos quais o terpinem-4-ol é o mais potente, observou-se que a vasodilatação é reduzida em vasos sem endotélio e contraem na presença de norepinefrina (MOURA, 2005). Dessa forma, ação anti-adrenérgica desses compostos é improvável.

Um possível mecanismo de proteção do OEAZ sobre a injúria miocárdica poderia estar relacionado ao seu mecanismo de ação em produzir vasodilatação. O óxido nítrico, importante modulador da função vascular parece ter um importante papel no efeito vasodilatador de componentes da *A. zerumbet*. Estudos demonstram que o L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase reduz esse efeito vasodilatador. Dessa forma o efeito vasodilatador desses compostos está provavelmente relacionado à ativação da via do óxido nítrico e GMP cíclico (VANHOUTTE; MOMBOULI, 1996; REES *et al.*, 1989). O óxido nítrico também inibe a agregação plaquetária e níveis reduzidos estão implicados no aumento da injúria por isquemia e reperfusão. Estudos demonstram que o óxido nítrico e doadores de óxido nítrico parecem melhorar a performance cardíaca e coronariana durante isquemia miocárdica e proteger o cardiomiócito contra dano celular e citotoxicidade por ERO (LEI *et al.*, 1992; SIEGFRIED *et al.*, 1992). Efeitos em aumentar a oferta de óxido nítrico, inclusive

podendo causar dilatação coronariana, poderia ser um mecanismo de proteção contra a injúria miocárdica provocada pelo isoproterenol.

No que concerne ao aumento da sobrecarga de Ca^{++} intracelular algumas drogas, como dantrolene, podem reduzir a concentração de Ca^{++} citosólica por inibir a liberação de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático, diminuindo o grau de injúria miocárdica induzida por isoproterenol (ACIKEL *et al.*, 2005). Se comprovado o efeito de componentes da *A. zerumbet* em aumentar o óxido nítrico poderia se aventar um mecanismo protetor da injúria miocárdica relacionado ao Ca^{++} , haja vista que o óxido nítrico reduz o Ca^{++} intracelular, daí o seu efeito hipotensor, não somente em função da ativação da guanilatociclase solúvel, mas também pela hiperpolarização celular induzida pela abertura de canais de K^+ (MURAD, 1987).

Em relação à depleção de fosfatos de alta energia, nada foi encontrada na literatura acerca da ação de componentes da *A. zerumbet* em aumentar as reservas de ATP.

No contexto do aumento do estresse oxidativo como um dos mecanismos mais importantes para a injúria miocárdica induzida pelo uso do isoproterenol, compostos presentes na *A. zerumbet* poderiam ter importância na atenuação desse processo. Estudos demonstram que das folhas, do rizoma, da raiz e das flores de *A. zerumbet* podem ser obtidos dihidro-5,6-desidrokaawaína (DDK) e compostos fenólicos, ambos com forte atividade antioxidante (ELZAAWELLY, 2007a; ELZAAWELLY, 2007b). Análises bioquímicas indicam ainda que as folhas de *A. zerumbet* são ricas em flavonóides (catequinas, epicatequina, rutina, quercetina, kaempferol 3-O-rutinosídeo, kaempferol 3-O-glicoronídeo) e DDK (MPALATINOS, 1998). Como exposto na introdução os três principais componentes do OEAZ usados nesse estudo são o terpinem-4-ol, o 1-8 cineol e o γ -terpineno.

Em relação ao terpinem-4-ol, excetuando-se uma possível ação de redução da cototoxicidade induzida por ERO, mediada pelo aumento da oferta de óxido nítrico (MOURA *et al.*, 2005), não encontramos estudos relacionando esse composto com atividades antioxidantes.

Estudo publicado por Santos e Rao (2001), avaliando ação do 1,8-cineol sobre o dano da mucosa gástrica induzida pelo etanol, observou que este componente da *A. zerumbet* atenuou a redução de grupos sulfidrilas na mucosa gástrica induzida pelo etanol, sugerindo uma possível atividade antioxidante.

Como já citado, o γ -terpineno, por sua vez, possui, entre outras propriedades, efeito antioxidante na oxidação do linoleato de metila do DNA e de eritrócitos (LI; LIU, 2009), além de potencial sinérgico na inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) quando usado em associação com o flavonóide rutina (MILDE; ELSTNER;

GRASSMANN, 2004) como também inibição da peroxidação lipídica (FOTI; INGOLD, 2003).

Compostos fenólicos e DDK, que apresentam alto poder antioxidante são comumente desperdiçados no preparo do OEAZ, que exige um processo de destilação. Outras substâncias extraídas da *A.zerumbet* como a rutina e a quercetina, flavonoides com atividade antioxidante, foram testadas em modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol, demonstrando ação protetora (PUNITHAVATHI, STANELY, 2010; PUNITHAVATHI, SHANMUGAPRIYA; PRINCE, 2010; PRINCE; SATHYA, 2010). No entanto, não é por nós conhecida a concentração dessas substâncias no óleo essencial.

Efeito do OEAZ sobre os níveis de hemoglobina

Não houve diferença entre os níveis de hemoglobina entre os grupos, demonstrando nesse estudo que nem a administração de isoproterenol nem o pré-tratamento com OEAZ geraram alteração desse parâmetro.

A influência da administração de isoproterenol sobre os níveis de hemoglobina é pouco citada na literatura. Sangeetha e Quine (2008) observaram um aumento na contagem total de eritrócitos e nível de hemoglobina em ratos submetidos à indução de IM com isoproterenol.

Efeito do OEAZ sobre a contagem do número de leucócitos e neutrófilos

Nesse estudo observou-se que a administração de isoproterenol causou um aumento no número de leucócitos nos grupos CONTROLE e OEAZ-ISO, quando comparados com os grupos SHAM e OEAZ-SAL respectivamente, no entanto essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Analisando o efeito isolado do OEAZ administrado por catorze dias consecutivos, observou-se que não houve interferência na contagem de leucócitos uma vez que nos grupos SHAM e OEAZ-SAL estes valores foram quase idênticos.

Em relação ao número de neutrófilos observou-se que o grupo CONTROLE apresentou níveis maiores do que no grupo SHAM nas contagens dessas células, de forma estatisticamente significativa. No grupo OEAZ-ISO, o pré-tratamento com OEAZ atenuou este aumento de forma que não houve diferença estatisticamente significativa deste parâmetro entre os grupos OEAZ-SAL e OEAZ-ISO.

Contagens elevadas de leucócitos e neutrófilos são observadas em ratos com IM induzido por isoproterenol (SANGEETHA; QUINE, 2008). Contagem elevada de leucócitos é

considerada como situação de risco para o desenvolvimento de IAM (BURR *et al.*, 1992). Friedman *et al* (1990) foram os primeiros a observar a relação entre a contagem de neutrófilos e o subsequente desenvolvimento de IAM. No IAM, neutrófilos podem contribuir para a injúria miocárdica em virtude da liberação de leucotrienos, ERO, e enzimas hidrolíticas. O grau de leucocitose pode estar associado ainda à magnitude da necrose miocárdica (SANGEETHA; QUINE, 2008).

Efeito do OEAZ sobre a dosagem de uréia no sangue

Nesse estudo, observou-se que o isoproterenol causou elevação dos níveis de uréia nos grupos CONTROLE e OEAZ-ISO, provavelmente em virtude de ter ocasionado um estado de baixo débito cardíaco por disfunção ventricular. O pré-tratamento com OEAZ não exerceu influência sobre o incremento dos níveis de uréia.

Não foram encontrados na literatura estudos que discorram sobre alterações de marcadores da função renal nesse tipo de modelo experimental. Essa observação pode abrir janelas para a realização de futuras pesquisas acerca de proteção renal em casos de baixo débito cardíaco por IM.

Efeito do OEAZ sobre a dosagem de creatinina no sangue

Conforme relatado nos resultados, a administração de isoproterenol não causou alterações nos níveis séricos de creatinina. A administração de OEAZ também não levou à alterações nesses parâmetros.

O aumento significativo dos níveis de uréia sem elevação dos níveis de creatinina em ratos submetidos a indução do IM com isoproterenol indica que o dano renal apresenta características de lesão renal de natureza pré-renal, e não de dano renal direto. Esta situação de insuficiência renal pré-renal provavelmente está relacionada a um estado de baixo débito cardíaco por disfunção ventricular.

Efeito do OEAZ sobre a atividade da enzima catalase no miocárdio

Enzimas varredoras de radicais livres como a SOD e a CAT são a primeira linha de defesa contra a injúria oxidativa, decompondo O_2 e H_2O_2 antes de suas interações para formar o radical hidroxila ($OH\cdot$). As atividades de SOD e CAT no miocárdio estão reduzidas em caso de administração de isoproterenol em ratos (SHARMA *et al.*, 2001).

Durante o IAM, radicais superóxido modulam a SOD e a CAT resultando em perda da atividade dessas enzimas e acúmulo de radicais superóxido, que causa dano ao

miocárdio (SARAVANAN; PRAKASH, 2004). O pré-tratamento com OEAZ preservou a atividade da catalase indicando aumento da remoção de radicais superóxido, dessa forma, reduzindo o dano miocárdico causado por radicais livres.

Efeito do OEAZ sobre os níveis de glutathione no miocárdio

As ERO são geradas em estágios precoces do IAM e a glutathione está envolvida na redução de radicais livres peróxidos de hidrogênio, havendo diminuição dos níveis de glutathione neste período. A glutathione é importante na proteção do miocárdio contra injúria por radicais livres e uma redução de seus níveis pode comprometer a recuperação após períodos de isquemia (PRINCE; PRISCILLA; DEVIKA, 2009).

O pré-tratamento com OEAZ preservou os níveis de glutathione reduzida no coração de ratos infartados. Esse dado sugere ação antioxidante deste óleo nesse modelo experimental.

Santos e Rao (2001) realizaram um estudo sobre a ação do 1,8 cineol em um modelo de gastrite induzida por etanol. A mucosa gástrica tem uma elevada concentração basal de glutathione que funciona como antioxidante (MUTOH *et al.*, 1990). A glutathione representa a maioria dos compostos sulfidrilas (ROBERT; EBERLE; KAPLOWITZ, 1984), e o dano gástrico induzido por etanol tem sido associado com uma significativa redução com os níveis de compostos sulfidrilas na mucosa gástrica (SZABO; TRIER; FRANKEL, 1981). Santos e Rao (2001) observaram que o 1,8 cineol foi capaz de evitar a depleção de compostos sulfidrilas na mucosa gástrica, induzida pelo etanol, sugerindo uma possível ação antioxidante. A ação dessa substância pode ter sido um dos mecanismos responsáveis pela manutenção dos níveis de glutathione em ratos infartados em que houve o pré-tratamento com OEAZ.

Efeito do OEAZ sobre as alterações histopatológicas no miocárdio

A administração de isoproterenol causou alterações histológicas moderadas à acentuadas nos grupos CONTROLE e OEAZ-ISO, não havendo diferença entre esses grupos quanto ao escore global. Dessa forma, em termos de alterações histopatológicas, avaliadas em cortes histológicos do ápice de ventrículo esquerdo, o pré-tratamento com OEAZ não foi capaz de reduzir o grau dessas alterações. No entanto, haja vista que a liberação de marcadores de injúria miocárdica foi menor no grupo OEAZ-ISO em relação ao grupo Controle, podemos admitir que a extensão das zonas de necrose tecidual, considerando todo o

miocárdio, e não somente o ápice do ventrículo esquerdo, foi menor no grupo pré-tratado com OEAZ. Esta observação reforça a necessidade de que em trabalhos futuros seja realizada avaliação histopatológica em mais regiões do miocárdio, bem como aferição da área de necrose por meio de métodos como o uso do trifeniltetrazolium.

Outro dado importante foi o fato de que nenhum dos animais do grupo OEAZ-SAL apresentou qualquer alteração histopatológica demonstrando que esta formulação não apresentou efeitos tóxicos sobre o miocárdio.

Estudos avaliando o efeito de fitoterápicos no modelo de IM induzido por isoproterenol em ratos

Como exemplo de compostos ou formulações derivados de plantas e avaliados em modelo de IM induzido por isoproterenol em ratos, e que tiveram ação e reduzir o grau de injúria miocárdica, temos: o carotenóide crocina, constituinte da *Crocus sativus* L. (GOYAL *et al.*, 2010); myricetina, um flavonóide e composto polifenóide com propriedade antioxidante presente na *Vitis vinifera* Linn. (TIWARI *et al.*, 2009); sesamol, composto polifenólico (VENNILE; RUGALENDI, 2010); ácido salvianólico, componente bioativo da *Salvia miltiorrhiza* Bunge, vegetal largamente utilizado na medicina tradicional chinesa em tratamento de doenças vasculares; ginsenoside Rb3, maior constituinte bioativo da *Panax ginseng*, usada clinicamente para o tratamento de doenças vasculares na China (WUANG, 2010); extrato da *Calotropis procera*, planta encontrada na Ásia e na África, bastante utilizada na medicina indiana, com atividades cardiotônicas, hepatoprotetoras, antimicrobianas e antineoplásicas (AHMED; RANA; DIXIT, 2004); ácido caféico, um dos mais comuns ácidos fenólicos presentes em frutas e grãos (KUMARAN; PRINCE, 2010); ácido gálico, ácido fenólico presente sobretudo em vinho tinto e chá verde (PRINCE; PRISCILLA; DEVIKA, 2009); o composto polifenólico quercetina, flavonóide mais comumente presente na dieta humana; rutina, bioflavonóide cujas principais fontes são os vegetais folhosos e frutas cítricas (STANLEY; PRIYA, 2010).

Como observado, a comunidade científica internacional considera extremamente válido esse modelo experimental e vem avaliando de forma efetiva o efeito de diferentes compostos extraídos de plantas sobre a injúria miocárdica. No Brasil, o único estudo similar, no entanto usando um modelo de IM por meio de ligadura arterial, foi conduzido por Santiago *et al* (2009), que demonstrou efeitos benéficos do alho. Em função da importância que representa a doença coronariana, da praticidade e efetividade do modelo experimental de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos e das inúmeras possibilidades de

pesquisas com fitoterápicos, dada a grande biodiversidade da flora em nosso país, espera-se que haja continuidade desta linha de pesquisa.

Tendo sido encontrado um possível efeito protetor do OEAZ no IM nesse modelo experimental, deve-se, em uma próxima etapa, avaliar os efeitos de seus principais componentes (terpinem-4-ol, 1,8 cineol e γ -terpineno) quando usados isoladamente.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados expostos, concluímos que o modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos foi adequadamente reproduzido em nosso laboratório e causou aumento de mortalidade e de marcadores de injúria miocárdica, redução da atividade da catalase e dos níveis de glutathione e alterações histopatológicas.

Concluímos que o pré-tratamento com o óleo essencial de *Alpinia zerumbet* apresentou efeitos protetores no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos, uma vez:

- Atenuou as elevações de TGO, troponina I
- Atenuou a elevação do número de neutrófilos
- Preservou os níveis de catalase no miocárdio
- Preservou os níveis de glutathione no miocárdio

No entanto, não exerceu efeitos sobre:

- Mortalidade
- Variação do peso dos animais
- Níveis séricos de TGP
- Níveis séricos de hemoglobina e contagem de leucócitos
- Níveis séricos de marcadores da função renal
- Alterações histopatológicas no ápice do ventrículo esquerdo

7. REFERÊNCIAS

- ACIKEL, M.; BUYUKOKUROGLU, M.E.; ERDOGAN, F.; AKSOY, H.; BOZKURT, E.; SENOCAK, H. Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: biochemical and histological findings. **International Journal of Cardiology**, v. 98, p.389–394, 2005.
- ADAMS, J.E. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? **Circulation**, v. 88, p.750-763, 1993.
- AHMED, K.K.; RANA, A.C.; DIXIT, V.K. Effect of Calotropis procera latex on isoproterenol induced myocardial infarction in albino rats. **Phytomedicine**, v. 11, n. 4, p.3273-30, 2004.
- ALBUQUERQUE, E.S.B. Anatomia foliar e floral de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith – Zingiberaceae. 1999. p.111, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- ALBUQUERQUE, E.S.B; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta bot. bras.**, v. 18, n. 1, p.109-121, 2004.
- ALMEIDA, E.R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Ed. Hemus, 1993. 341p.
- ANANDAN, R.; MATHEW, S.; SANKAR, T.V.; VISWANATHA, N.P.G. Protective effect of n-3 polyunsaturated fatty acids concentrate on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 76, n. 3, p.153-158, 2007.
- ANDERSEN, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature**, v. 5 (neuroscience), p.18-25, 2004.
- ANDERSON, J.L. Cecil medicine, In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D.; **ST.Segment Elevation Acute Myocardial Infarction and Complications of Myocardial Infarction**. 23. ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2008. cap. 72.
- ANDRADE, E.M. Ginecologia, In: VIANA, L.C.; MARTINS, M.; GEBER, S. **Cardiopatía isquêmica e terapia de reposição hormonal**. Rio de Janeiro: Medicina e Científica Ltda, 2001. p.639-648.
- ANDRADE, J.P.; PIEGAS, L.S.; TIMERMAN, A.; FEITOSA, G.; ROSSI NETO, J.M.; NICOLAU, J.C.; MATTOS, L.A. IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 93, n. 6, supl. 2, p.179-264, 2009.
- ANTMAN, E.M.; BRAUNWALD, E. Harrison's principles of internal medicine. In: KASPER, D.L.; FAUCI, A.S.; LONGO, D.L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S.L.; JAMESON, J.L. **ST-segment elevation myocardial infarction**. 16. ed. New York: McGraw-Hill, 2005. cap. 228, p.1448-1459.

- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 74, p.3203–3207, 1977.
- BARREIROS, L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova.**, v. 29, n. 1, 2006.
- BARRETT, S.C.H. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 274-84, 2002.
- BELLÓ-KLEIN, A. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. In: MARRONI, N.P. **Dano oxidativo e regulação biológica dos radicais livres**. 1. ed. Porto Alegre: Ulbra, 2002, cap. 1, p.15-19.
- BHAGAT, B.; SULLIVAN, J.M.; FISCHER, V.W.; NADEL, E.M.; DHALLA, N.S. cAMP activity and isoproterenol-induced myocardial injury in rats. **Recent. Adv. Stud. Card. Struct. Metab.**, v. 12, p.465–470, 1978.
- BLOOM, S.; DAVIS, D.L. Calcium as mediator of isoproterenol-induced myocardial necrosis. **Am. J. Pathol.**, v. 69, p.459-470, 1972.
- BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse. Med.**, v. 31, n. 25, p.1174-1184, 2002.
- BORS, W.; MICHAEL, C.; SARAN, M.; LENGFELDER, E. The involvement of oxygen radicals during the autooxidation of adrenaline. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 540, p.162–172, 1978.
- BRAUWALD E. Evolution of the management of acute myocardial infarction: a 20th century saga. **Lancet**, v. 352, p. 1771-1774, 1998.
- BRODDE, O-E. h1- and h2 adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alteration in chronic heart failure. **Pharmacol. Ver.**, 1991.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p.535–543, 1993.
- BUJA, L.M.; ENTMAN, M.L. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. **Circulation**, v. 98, p.1355-1357, 1998.
- BUJA, L.M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 14, p.170-175, 2005.
- BURR, M.L.; HOLLIDAY, R.M.; FEHILY, A.M.; WHITEHEAD, P.J. Hematological prognostic indices after myocardial infarction: evidence from the diet and reinfarction trial (DART). **Eur. Heart. J.**, v. 13, n. 2, p.166–170, 1992.
- BUTTROS, J.B.; BERGAMASCHI, C.T.; RIBEIRO, D.A.; FRACALOSSO, A.C.; CAMPOS, R.R. Cardioprotective actions of ascorbic acid during isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. **Pharmacology**, v. 84, n. 1, p.29-37, 2009.

CAMPBELL, M. K. (2000). *Bioquímica*, 3.ed. Porto Alegre.

CARANO, N.; AGNETTI, A.; HAGLER, D.J.; TCHANA, B.; SQUARCIA, U.; BERNASCONI, S. Acute myocardial infarction in a child: possible pathogenic role of patent foramen ovale associated with heritable thrombophilia. **Pediatrics**, v. 114, p.255-258, 2004.

CARDEN, D.L.; GRANGER, D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury, **J. Pathol.**, v. 190, p.255–266, 2000.

CARDOSO, J.H.L.; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 71, p.207-213, 1999.

CARLINI, E.A. “Screening” farmacológico de plantas brasileiras. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 32, n. 2, p.265-274, 1972.

CHEN, Q.M.; TU, V.C.; WU, Y.; BAHL, J.J. Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p.242–248, 2000.

CHIU, A.; CHAN, W.-K.; CHENG, S.-H.; LEUNG, C.-K.; CHOI, C.-H. Troponin I, myoglobin, and mass concentration of creatinine kinase-mb in acute myocardial infarction. **Q. J. Med.**, v. 92, p.711-718, 1999.

CHOCRON, S.; ALWAN, K.; TOUBIN, G.; KANTELIP, B.; CLEMENT, F.; KANTELIP, J.P.; ETIEVENT, J.P. Effects of myocardial ischemia on the release of cardiac troponin I in isolated rat hearts. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 112, p.508– 513, 1996.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. **New York: Columbia University Press**, 1262p, 1981.

CRUDEN, R.W. Pollen-ovules ratios: a conservation indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, v. 31, p.32-46, 1977.

DE GROOT, H.; RAUEN, U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. **Transplant. Proc.**, v. 39, p.481–484, 2007.

DIRKSEN, M.T.; LAARMAN, G.J.; SIMOONS, M.L.; DUNCKER, D.J.G.M. Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. **Cardiovasc. Res.**, v. 74, p.343–355, 2007.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Calcium in cell injury and death. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p.405-434, 2006.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 16, p.663–669, 2004.

ELZAAWELY, A.A.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. leaves

exposed to copper sulphate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p.347–353, 2007.

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.

ELTZSCHIG, H.K.; COLLARD, C.D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. **Br. Med. Bull.**, v. 70, p.71–86, 2004.

ENGLE, S.K.; JORDAN, W.H.; PRITT, M.L.; CHIANG, A.Y.; DAVIS, M.A.; ZIMMERMANN, J.L.; RUDMANN, D.G.; HEINZ-TAHENY, K.M.; IRIZARRY, A.R.; YAMAMOTO, Y.; MENDEL, D.; SCHULTZE, A.E.; CORNWELL, P.D.; WATSON, D.E. Qualification of cardiac troponin I concentration in mouse serum using isoproterenol and implementation in pharmacology studies to accelerate drug development. **Toxicol. Pathol.**, v. 37, n. 5, p. 617-628, 2009.

FERDINANDY, P.; SCHULZ, R.; BAXTER, G.F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. **Pharmacol. Rev.**, v. 59, p.418-458, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p.239-247, 2000.

FIOLET, J.W.T.; BAARTSCHEER, A. Cellular calcium homeostasis during ischemia; a thermodynamic approach. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, p.100-106, 2000.

FLETCHER A.P.; SHERY, S.; ALKJAERSIG, N.; SMYRNOTIS, F.E.; JICK, S. The maintenance of a sustained thrombolytic state in man. Clinical observations on patients with myocardial infarction and other thromboembolic disorders. **J. Clin. Invest.**, v. 38, p.1111-1958, 1958.

FOTI, M.C.; INGOLD, K.U. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by gamma-terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. **J Agric. Food. Chem.**, v. 51, n. 9, p.2758-2765, 2003.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p.1203-1209, 1998.

FRIEDMAN, G.D.; TEKAWA, I.; GRIMM, R.H.; MANOLIO, T.; SHANNON, S.G.; SIDNEY, S. The leucocyte count: correlates and relationship to coronary risk factors: the CARDIA study. **Int. J. Epidemiol.**, v. 19, p.889–893, 1990.

GANDRA, P.G.; ALVES, A.A.; MACEDO, D.V.; KUBOTA, L.T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p.980-985, 2004.

- GEETHA, A.; SANKAR, R.; THANKAMANI, M.; DEVI, C.S. a-tocopherol reduces dexorubicin induced toxicity in rats histological and biochemical evidence. **Indian. J. Pharmacol.**, v. 34, p.94–100, 1990.
- GENOVA, M.L.; PICH, M.M.; BIONDI, A.; BERNACCHIA, A.; FALASCA, A.; BOVINA, C.; FORMIGGINI, G.; CASTELLI, G.P.; LENZA, G. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 228, p.506–513, 2003.
- GEORGE, J.C.; LINER, A.; HOIT, B.D. Isoproterenol-induced myocardial injury: a systematic comparison of subcutaneous versus intraperitoneal delivery in a rat model. **Echocardiography**, v. 27, n. 6, p.716-721, 2010.
- GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci.**, v. 32, n. 1, p.37–43, 2007.
- GOYAL, S.N.; ARORA, S.; SHARMA, A.K.; JOSHI, S.; RAY, R.; BHATIA, J.; KUMARI, S.; ARYA, D.S. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 17, p.227–232, 2010.
- GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p.1912–1916, 2003.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radic. Biol. Med.** 3.ed. Claredon, Oxford. pp. 105-150. (2000).
- HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p.145-182, 1990.
- HIGUCHI, Y.; OTSU, K.; NISHIDA, K.; HIROTANI, S.; NAKAYAMA, H.; YAMAGUCHI, O.; MATSUMURA, Y.; UENO, H.; TADA, M.; HORI, M. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 34, p.233–240, 2002.
- ITHAYARASI, A.P.; DEVI, C.S.S. Effect of alpha tocopherol on lipid peroxidation in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 41, p.359-356, 1997.
- JAFRI, M.S.; DUDYCHA, S.J.; O'ROURKE, B. Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 3, p.57–81, 2001.
- JENNINGS, R.B.; REIMER, K.A. Lethal myocardial ischemic injury. **Am. J. Pathol.**, v. 102, p.241–255, 1981.

JUERGENS, U.R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v. 97, p.250-256, 2003.

JUERGENS, U.R.; ENGELEN, T.; RACKE, K.; STÖBER, M.; GILLISSEN, A.; VETTER, H. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulm. Pharmacol. Therapeut.**, v. 17, p.281–287, 2004.

JUERGENS, U.R.; SCHILLING, S.L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineol) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **Eur. J. Med. Res.**, v. 3, p.407–412. 1998.

JUERGENS, U.R.; STÖBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8- cineol) in human blood monocytes in vitro. **Eur. J. Med. Res.**, v. 3, p.508–510, 1998 .

JUERGENS, U.R.; STÖBER, M.; VETTER, N. Steroid-like inhibition of monocyte arachidonic acid metabolism and IL-1b production by eucalyptol (1,8-cineol) (in German). **Atemw-Lungenkrkh**, v. 24, p.3–11, 1998.

KAO, M.P.C.; ANG, D.S.C.; PALL, A.; STRUTHERS, A.D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of Human Hypertension**, v. 24, p.1–8, 2010.

KEMP, M.; DONOVAN, J.; HIGHAM, H.; HOOPER, J. Biochemical markers of myocardial injury. **Br. J. Anaesth.**, v. 93, n. 1, p.63-73, 2004.

KHATRI, J.J.; JOHNSON, C.; MAGID, R.; LESSNER, S.M.; LAUDE, K.M.; DIKALOV, S.I.; HARRISON, D.G.; SUNG, H.J.; RONG, Y.; GALIS, Z.S. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. **Circulation**, v. 109, p.520–525, 2004.

KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JARVINEN, R.; RISSANEN, H.; HELIOVARA, M.; REUNANEN, A.; HAKULINEN, T.; AROMA, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p.560–568, 2002.

KOCIOL, R.D.; PANG, P.S.; GHEORGHIADE, M.; FONAROW, G.C.; O'CONNOR, C.M.; FELKER, G.M. Troponin Elevation in Heart Failure - Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. **JACC**. v. 56, n. 14, p.1071-1078, 2010.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ.**, v. 16, n. 1, p.3-11, 2009.

KASPER, P.; REPGES, R.; DETHLEFSEN, U.; PETRO, W. Comparison of secretolytics. Change of ciliary frequency and lung function after therapy with cineol and ambroxol (in German). **Z Atemweg/Lungenerkr**, v. 20, p.605–614, 1994.

KWON, S.H.; PIMENTEL, D.R.; REMONDINO, A.; SAWYER, D.B.; COLUCCI, W.S. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration dependent activation of distinct kinase pathways. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 35, p.615–621, 2003.

KRESS, W.J.; BEACH J.H. Flowering plant reproductive systems at La Selva Biological Station. In: MCDADE, L.A. et al. (Eds.). *La selva: ecology and natural history of a neotropical rain forest*. Chicago: University of Chicago Press, 1994. p.161-182.

KRESS, W.J.; PRINCE, L.M.; WILLIAMS, K.J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **Am. J. Bot.**, v. 89, n. 10, p.1682-96, 2002.

KUMAR, V.; ABUL, K. Patologia estrutural e funcional. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia celular I: lesão e morte da célula**. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. cap. 1, p.1-26.

KUMARAN, K.S.; PRINCE, P.S.M. Preventive effect of caffeic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **J. BIOCHEM. MOLECULAR TOXICOLOGY.**, v. 24, n. 2, p.115-122, 2010.

LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L.F.L.; CARDOSO, J.H.L.; 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, 2003.

LANGE, R.A. Cocaine and Myocardial Infarctions. **Adv. Stud. Med.**, v. 3, n. 8, p.448-454, 2003.

LARANJA, S.M.R.; BERGAMASCHI, C.M.; SCHOR, N. Avaliação de três plantas com potencial efeito diurético. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 38, n. 1, p.13-16, 1992.

LEHNINGER, A.L.; Nelson, D.C.; Cox, M.M.; *Princípios de Bioquímica*, 2a ed.; Sarvier Ed. Ltda.: São Paulo, 1995, p. 264

LEI, S.Z.; PAN, Z.H.; AGGARWAL, S.K.; CHEN, H.S.; HARTMAN, J.; SUCHER, N.J.; LIPTON, S.A. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. **Neuron.**, v. 8, n. 6, p.1087-1099, 1992.

LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A.F.; KÜHNLE, S.; NICOTERA, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 8, p.1481–1486, 1997.

LI, C; BROWDER, W; KAO, R.L. Early activation of transcription factor NF-κB during ischemia in perfused rat heart. **Am J Physiol.**, v. 276, n. H, p.543–552, 1999.

LI, D.; ZHAO, L.; LIU, M.; DU, X.; DING, W.; ZHANG, J.; MEHTA, J.L.; Kinetics of tumor necrosis factor alpha in plasma and the cardioprotective effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha in acute myocardial infarction. **Am Heart J.**, v. 137, n. 6, p.1145–1152, 1999.

- LI, G.X.; LIU, Z.Q. Unusual antioxidant behavior of alpha- and gamma-terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 57, n. 9, p.3943-3948, 2009.
- LI, J.M.; GALL, N.P.; GRIEVE, D.J.; CHEN, M.; SHAH, A.M. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension**, v. 40, p.477-484, 2002.
- LI, N.; KARIN, M. Is NF-kB the sensor of oxidative stress? **FASEB J.**, v. 13, p.1137-1143, 1999.
- LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; GIESBRECHT, A.M.; PAULO, M.Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, p.333-336, 1993.
- 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p.4435-4443. 2008.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa: Plantarum, 1995. 720p
- LUNDGREN, J.D.; SHELHAMMER, J.H. Pathogenesis of airway muçus hypersecretion. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 85, p.399-419, 1990.
- MACHIDA, Y.; KUBOTA, T.; KAWAMURA, N.; FUNAKOSHI, H.; IDE, T; UTSUMI, H.; LI, Y.Y.; FELDMAN, A.M.; TSUTSUI, H; SHIMOKAWA, H; TAKESHITA, A. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha increases production of hydroxyl radical in murine myocardium. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 284, n. H, p.449-455, 2003.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p.3-15, 1995.
- MAROM, Z.; SHELHAMER, J.H.; BACH, M.K.; MORTON, D.R.; KALINER, M. Slowreacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 126, p.449-451, 1982.
- MARTINEZ FILHO, E.E.; STEFANINI, E; MEHTA, N. Atrial fibrillation and coronary artery disease. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 4, n. 3, p.273-277, 1994.
- MARTINS, C.S. Troponina: Estrutura, Fisiopatologia e Importância Clínica para Além da Isquemia Miocárdica. **Arquimed.**, v. 23, n. 6, p.221-240, 2009.
- MEDEIROS, M.F.T.; SENNA-VALLE, L.; ANDREATA, R.H.P. Flora medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil: taxonomia e aspectos etnobotânicos. **Publicações Avulsas do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 106, p.3-24, 2005.
- MELDRUM, D.R; DINARELLO, C.A.; SHAMES, B.D.; CLEVELAND, J.C.J.; CAIN, B.S.; BANERJEE, A.; MENG, X.; HARKEN, A.H. Ischemic preconditioning decreases post-

ischemic myocardial tumor necrosis factor- production: potential ultimate effector mechanism of preconditioning. **Circulation**, v. 98, suppl. II, p.214–219, 1998.

MENDONÇA, V.L.M.; OLIVEIRA, C.L.A.; CRAVEIRO, A.A.; RAO, V.S.; FONTELES, M.C.L. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, supl. II, p.93-97, 1991.

MILDE, J.; ELSTNER, E.F.; GRASSMANN, J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, gamma-terpinene, and ascorbic acid. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2-3, p.105-113, 2004.

MIZUI, T.; SATO, H.; HIROSE, F.; DOTEUCHI, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sci.**, v. 41, p.755–763, 1987.

MOHAN, P.; BLOOM, S. Lypolysis in a important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. **Cardiovasc. Phathol.**, v. 8, p.255-261, 1999.

MORITA, D. Insecticides and bactericide made of sell flower essential oil. **Int. Cl A 01 N 25/00**. US Patent 5110594. 1992.

MOURA, R.S.; MIRANDA, D.Z.; PINTO, A.C.A.; SICCA, R.F.; SOUZA, M.A.V.; RUBENICH, L.M.S.; CARVALHO, L.C.R.M.; RANGEL, B.M.; TANO, T.; MADEIRA, .V.F.; RESENDE, A.C. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 44, p.302–309. 2004.

MOURA, R.S.; EMILIANO, A.F.; CARVALHO, L.C.R.M.; SOUZA, M.A.V.; GUEDES, D.C.; TANO, T.; RESENDE, A.C. Antihypertensive and Endothelium-Dependent Vasodilator Effects of *Alpinia zerumbet*, a Medicinal Plant. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 46, p.288–294, 2005.

MPALANTINOS, M.A.; DE MOURA, R.S.; PARENTE, J.P.; KUSTER, R.M. Biologically active flavonoids and kava pyrones form the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. **Phytother. Res.**, v. 12, p.442–444, 1998.

MUTOH, H.; HIRAISHI, H.; OTA, S.; YOSHIDA, H.; IVEY, K.J.; TERANO, A.; SUGIMOTO, T. Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. **Gastroenterology** v. 98, p.1452–1460, 1990.

MYERBURG, R.J.; CASTELLANOS, A. Textbook of cardiovascular medicine. In: BRAUNWALD, E. **Prevention of cardiac arrest and sudden cardiac death**. 8. ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2007. cap. 36, p.933-974.

NATANSON, C.; EICHENHOLZ, P.W.; DANNER, R.L.; EICHAKER, P.Q.; HOFFMAN, W.D.; KUO, G.C.; BANKS, S.M.; MACVITTIE, T.J.; PARRILLO, J.E. Endotoxin and tumor necrosis factor challenge in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. **J Exp Med.**, v. 169, p.823–832, 1989.

NIGAM, P.K.; Biochemical markers of myocardial injury. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. v. 22, n. 1, p.10-17, 2007.

MIWA, S.; BRAND, M.D. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p.1300–1301, 2003.

MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol. Rev.**, v. 39, p.163–196, 1987.

NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiol. Ver.**, v. 81, p.1415–1459, 2001.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, n. 11, p.1287–1312, 2001.

O'BRIEN, P.J.; DAMERON, G.W.; BECK, M.L.; KANG, Y.J.; ERICKSON, B.K.; DI BATTISTA, T.H.; MILLER, K.E.; JACKSON, K.N.; MITTELSTADT, S. Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. **Lab. Anim. Sci.**, v. 47, n. 5, p.486-495, 1997.

ODBAYAR, T.O.; BADAMHAND, D.; KIMURA, T.; TAKAHASHI, Y.; TSUSHIDA, T.; IDE, T. Comparative studies of some phenolic compounds (quercetin, rutin, and ferulic acid) affecting hepatic fatty acid synthesis in mice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p.8261– 8265. 2006.

OLIVEIRA, C.C. **Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (PERS) BURTT & SMITH.** 2008.91p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p.143–83, 2007.

PARK, S.Y.; BOK, S.H.; JEON, S.M.; PARK, Y.B.; LEE, S.J.; JEONG, T.S.; CHOI, M.S. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. **Nutr. Res.**, v. 22, p.283–295, 2002.

PENNATHUR, S.; WAGNER, J.D.; LEEUWENBURGH, C.; LITWAK, K.N.; HEINECKE, J.W. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 7, p.853–860, 2001.

PETERS, R.T.; LIAO, S.M.; MANIATIS, T. IKK-epsilon is part of a novel PMA-inducible Ikappa-B kinase complex. **Mol Cell.**, v. 5, p.513–522, 2000.

PINTO, N.V.; ASSREUY, A.M.S.; DE-SOUZA, A.N.C.; CECCATTO, V.M.; MAGALHAES, P.J.C.; LAHLOUA, S.; CARDOSO, J.H.L. 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.

PRINCE, P.S.M.; PRISCILLA, H.; DEVIKA, P.T. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 139, p.139–143, 2009.

PRINCE, P.S.; SATHYA, B. Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 635, n. 1-3, p142-148, 2010.

PRINCE, P.S.; SUMAN, S.; DEVIKA, P.T.; VAITHIANATHAN, M. Cardioprotective effect of 'Marutham' a polyherbal formulation on isoproterenol induced myocardial infarction in Wistar rats. **Fitoterapia**, v. 79, n. 6, p.433-438, 2008.

PUNITHAVATHI, V.R.; PRINCE, P.S. Combined effects of quercetin and alpha-tocopherol on lipids and glycoprotein components in isoproterenol induced myocardial infarction Wistar rats. **Chem. Bio. Interact.**, v. 181, n. 3, p.322-327, 2009.

PUNITHAVATHI, V.R.; PRINCE, S.M. Protective effects of combination of quercetin and ascor-tocopherol on mitochondrial dysfunction and myocardial infarction rats: biochemical, transmission electron microscopic, and macroscopic enzyme mapping evidences. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 24, n. 5, p.303-312, 2010.

PUNITHAVATHI, V.R.; SHANMUGAPRIYA, K.; PRINCE, P.S. Protective effects of rutin on mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiotoxic rats: an *in vivo* and *in vitro* study. **Cardiovasc. Toxicol.**, v. 10, n. 3, p.181-189, 2010.

RATHORE, N.; KALE, M.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol-induced oxidative stress in rat erythrocyte. **Ind. J. Physiol Pharmacol.**, v. 44, p.161-166, 2000.

REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol.*, v. 96, p.418-424, 1989.

REICHENBACH, D.D.; BENDITT, E.P. Catecholamines and cardio- myopathy: the pathogenesis and potential importance of myofibrillar degeneration. **Human. Pathol.**, v. 1, p.125-150, 1970.

RENNER, S.S. Heterodichogamy, how common is it? **Trends Ecology Evolution**, v. 16, n. 11, p.595-7, 2001.

RILEY, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 65, n. 1, p.27-33, 1994.

ROBERT, A.; EBERLE, D.; KAPLOWITZ, N. Role of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. **Am. J. Physiol.**, v. 247, n. G, p.296-304, 1984.

SABRI, A.; HUGHIE, H.H.; LUCCHESI, P.A. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. **Antioxid. Redox Signal.** v. 5, n. 6, p.731-740, 2003.

SAJJADI, F.G.; TAKABAYASHI, K.; FOSTER, A.C.; DOMINGO, R.C.; FIRESTEIN, G.S.; Inhibition of TNF- expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. **J Immunol.**, v. 156, p.3435-3442, 1996.

SAKAI, S.; KATO, M.; INOUE, T. Three pollination guilds and variation in floral characteristics of Bornean gingers (Zingiberaceae and Costaceae). **Am. J. Bot.**, v. 86, p.646-58, 1999.

SANGEETHA, T.; QUINE, S.D. Protective effect of S-allyl cysteine sulphoxide (alliin) on glycoproteins and hematology in isoproterenol induced myocardial infarction in male Wistar rats. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, n. 5, p.710-106, 2008.

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

SANTIAGO, M.B.; NASCIMENTO, A.M.; COUTO, W.C.S.; OLIVEIRA NETO, W.N.; LESSA, F.C.R.; FRANQUINI, J.V.M.; PINTO, V.D.; ANDRADE, T.U. Efeito da administração do *Allium sativum* sobre as alterações cardiovasculares de ratos *Wistar* com infarto do miocárdio. **Ver. Ciênc. Farm. Básica. Apl.**, v. 30, n. 1, p.62-69, 2009.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. 1,8-Cineol, a Food Flavoring Agent, Prevents Ethanol-Induced Gastric Injury in Rats. **Dig. dis. sci.**, v. 46, p.331-337, 2001.

SARAVANAN, G.; PRAKASH, J. Effect of garlic (*Allium sativum*) on lipid peroxidant in experimental myocardial infarction in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p.155-158, 2004.

SARMENTO-LEITE, R.; KREPSKY, A.M.; GOTTSCHALL, C.A.M. Infarto agudo do miocárdio. Um século de história. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, n. 6, p. 593-601, 2001.

SATHISH, V.; EBENEZAR, K.K.; DEVAKI, T. Synergistic effect of nicorandil and amilopine on lysosomal hydrolases during experimental myocardial infarction in rats. **Biomed. Pharmacother.**, v. 57, p.309-313, 2003.

SCHADENDORF, D.; WORM, M.; ALGERMISSEN, B.; KOHLMUS, C.M.; CZARNETZKI, B.M. Chemosensitivity testing of human malignant melanoma. A retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity. **Cancer**, v. 73, p.103-108, 1994.

SESHIAH, P.N.; WEBER, D.S.; ROCIC, P.; VALPPU, L.; TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K.K. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. **Circ. Res.**, v. 91, p.406-413, 2002.

SHAHANI, R.; MARSHALL, J.G.; RUBIN, B.B; LI, R.K.; WALKER, P.M.; LINDSAY, T.F. Role of TNF-alpha in myocardial dysfunction after hemorrhagic shock and lower-torso ischemia. **Am J Physiol.**, v. 287, n. H, p.942-950, 2000.

SHARMA, M.; KISHORE, K.; GUPTA, S.K.; JOSHI, S.; ARYA, D. Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 225, p.75-83, 2001.

SIEGFRIED MR, ERHARDT J, RIDER T.; Ma, X.L.; LEFER, A.M. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 260, n. 2, p.668-675, 1992.

SIES, H. Strategies of antioxidant defese. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p.213-219, 1993.

SILVA, A.A.; GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p.994-1002, 2010.

SINGAL, P.K.; KAPUR, N.; DHILLON, K.S.; BEAMISH, R.E.; DHALLA, N.S. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p.1390–1397, 1982.

SINGAL, P.K.; BEAMISH, R.E.; DHALLA, N.S. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 161, p.391–440, 1983.

SMITH, H.W. III; LIBERMAN, H.A.; BRODY, S.L.; BATTEY, L.L.; DONOHUE, B.C.; MORRIS, D.C. Acute myocardial infarction temporally related to cocaine use. Clinical, angiographic and pathophysiologic observations. **Ann. Intern. Med.**, v. 107, p.13-18, 1987.

SPEVAK, W.; HARTIG, A.; MEINDL, P.; RUIS, H. Heme control region of the catalase T gene of the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Gent.**, v. 203, p.73-78, 1986.

STANELY, M.P.P.; PRIYA, S. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardiotoxic rats: biochemical, histological and *in vitro* evidences. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 649, n. 1-3, p.229-235, 2010.

SUNSHIL, D.; WELCH, J.; FOGEL, S.; BUCHMAN, C.; KARIN, M. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p.2745-2752, 1995.

SURYAPRANATA, H.; VAN'T HOF, A.W.J.; HOORNTJE, J.C.A.; DE BOER, M.J.; ZIJLSTRA, F. Randomized comparison of coronary stenting with balloon angioplasty in selected patients with acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 97, p.2502-2505, 1998.

SUZUKI, K.; SAWA, Y.; KAGISAKI, K.; TAKETANI, S.; ICHIKAWA, H.; KANEDA, Y.; MATSUDA, H. Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70. **Basic Res Cardiol.**, v. 95, n. 5, p.397–403, 2000.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A. SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, p.228–236, 1985.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p.200–202, 1981.

TARE, M., PARKINGTON, H.C., COLEMAN, H.A., NEILD, T.O., DUSTING, G.J., Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from endothelium. **Nature**, v. 346, p.69–71, 1990.

TIWARI, R.; MOHAN, M.; KASTURE, S.; MAXIA, A.; BALLERO, M. Cardioprotective Potential of Myricetin in Isoproterenol-induced Myocardial Infarction in Wistar Rats. **Phytother. Res.**, v. 23, p.1361–1366, 2009.

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

TOUFEKTSIAN, M.C.; BOUCHER, F.R.; TANGUY, S.; MOREL, S.; DE LEIRIS, J.G. Cardiac toxicity of singlet oxygen: implication in reperfusion injury. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 3, n. 1, p.63–69, 2001.

TRABER, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 23, n. 3/6, p.135-139, 1997.

TRACEY, K.J.; FONG, Y.; HESSE, D.G.; MANOGUE, K.R.; LEE, A.T.; KUO, G.C.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. **Nature**. v. 330, p.662–664, 1987.

TRIVEDI, C.J.; BALARAMAN, R.; MAJITHIVA, J.B.; BOTHARA, S.B. Effect of atorvastatin treatment on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Pharmacology**, v. 77, n. 1, p.25-32, 2006.

TRNOVSKY, J.; LETOURENEAU, R.; HAGGOG, E.; BOUCHER, W.; THEOHARIDES, T.C. Quercetin-induced expression of rat mast cell protease and accumulation of secretory granules in rat basophilic leukaemia cell. **Biochem. Pharmacol.**, v. 46, p.2315–2316. 1993.

TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K.; CHANG, S.H.; PHELPS, P.C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol. Pathol.**, v. 25, n. 1, p.82–88, 1997.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. **Cardiovasc. Res.**, v. 81, p.449–456, 2009.

UPAGANLAWAR, A.; GANDHI, C.; BALARAMAN, R. Effect of green tea and vitamin E combination in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Plant. Foods. Hum. Nutr.**, v. 64, n. 1, p.75-80, 2009.

URSINI, M.V.; PARELLA, A.; ROSA, G.; SALZANO, S.; MARTINI, G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochem. J.** v. 323, p.801-806, 1997.

VALEN, G.; KAWAKAMI, T.; TÄHEPÖLD, P.; DUMITRESCU, A.; LÖWBEER, C.; VAAGE, J.; Glucocorticoid pretreatment protects cardiac function and induces cardiac heat shock protein 72. **Am J Physiol.**, v. 279, n. H, p.836–843, 2000.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J.T. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p.44–84, 2007.

VANHOUTTE, P.M.; MOMBOULI, J.V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 39, p.229–238, 1996.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, M.S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VENNILA, L.; PUGALENDI, K.V. Protective effect of sesamol against myocardial infarction caused by isoproterenol in Wistar rats. **Redox. Report.**, v. 15, n. 1, p.36-42, 2010.

VERMA, S.; FEDAK, P.W.M.; WEISEL, R.D.; BUTANY, J.; RAO, V.; MAITLAND, A.; LI, R.K.; DHILLON, B.; YAU, T.M. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. **Circulation**, v. 105, p.2332–2336, 2002.

VIMAL, V.; DEVAKI, T. Linear furanocoumarin protects rat myocardium against lipidperoxidation and membrane damage during experimental myocardial injury. **Biomed. Pharmacother.**, v. 58, p.393–400, 2004.

WANG, T.; YU, X.; QU, S.; XU, H.; HAN, B.; SUI, D. Effect of ginsenoside Rb3 on myocardial injury and heart function impairment induced by isoproterenol in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 636, p.121–125, 2010.

WAGNER, D.R.; COMBES, A.; McTIERNAN, C.; SANDERS, V.J.; LEMSTER, B.; FELDMAN, A.M. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor- α . **Circ Res.**, v. 82, p.47–56, 1998.

WESTFALL, T.C.; WESTFALL, D.P. Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Agonistas e antagonistas adrenérgicos**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. cap. 10, p.215-264.

WEXLER, B.C. Myocardial infarction in young vs. old male rats: pathophysiologic changes. **Am. Heart. J.**, v. 96, p.70-80, 1978.

WHELTON, P.K.; BRANCATI, F.L.; APPEL, L.J.; KLAG, M.J. The challenge of hypertension and atherosclerotic cardiovascular disease in economically developing countries. **High Blood Press.**, v. 4, p.36-45, 1995.

WINTERS, G. Jardinagem - Zingiberáceas. **Revista Natureza**, v. 91, n. 7, p.14-23, 1995.

WITTMANN, M.; PETRO, W.; KASPAR, P.; REPGES, R.; DETHLEFSEN, U. Therapy with expectorants: a double-blind randomised study comparing ambroxol and cineol (in German). **Atemw-Lungenkrkh**, v. 24, p.67–74, 1998.

YATES, J.C.; DHALLA, N.S. Induction of necrosis and failure in the isolated perfused rat heart with oxidized isoproterenol. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 7, p.807–816, 1975.

YEAGER, J.C.; WHITEHURST, M.E. Verapamil prevents isoproterenol induced cardiac failure in the rat. **Life Sci.**, v. 30, p.299–306, 1982.

YEAGER, J.C.; IAMS, S.G. The hemodynamics of isoproterenol-induced cardiac failure in rats. **Circ. Shock.**, v. 8, p.151–163, 1998.

YILDIZOGLE-ARI, N.; ALTAN, V.M.; ALTINKURT, O.; OZTURK, Y. Pharmacological effects of rutin. **Phytother. Res.**, v. 5, p.19–23, 1991.

ZANDI, E.; ROTHWARF, D.M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The I-kappa-B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK-alpha and IKK-beta, necessary for I-kappa-B phosphorylation and NF-kappa-B activation. **Cell.**, v. 91, p.243–252, 1997.

ZWEIER, J.L.; TALUKDER, M.A.H. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.**, v. 70, p.181–190, 2006.