



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

**THAIS MURATORI HOLANDA**

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *ALPINIA ZERUMBET* NA FUNÇÃO  
CARDIOVASCULAR E AUTONÔMICA DE RATOS COM INFARTO AGUDO DO  
MIOCÁRDIO INDUZIDO POR ISOPROTERENOL**

**FORTALEZA**

**2015**

**THAIS MURATORI HOLANDA**

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *ALPINIA ZERUMBET* NA FUNÇÃO  
CARDIOVASCULAR E AUTONÔMICA DE RATOS COM INFARTO AGUDO DO  
MIOCÁRDIO INDUZIDO POR ISOPROTERENOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine

**FORTALEZA**

**2015**

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

- 
- H669e Holanda, Thais Muratori.  
Efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na função cardiovascular e autonômica de ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol/ Thais Muratori Holanda. – Fortaleza, 2015.  
93 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.  
Área de concentração: Farmacologia  
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes filho.
1. Plantas Mediciniais. 2. Infarto do Miocárdio. 3. Ratos. 4. Sistema Cardiovascular. I. Título.
- 
- CDD 615.1

THAIS MURATORI HOLANDA

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *ALPINIA ZERUMBET* NA FUNÇÃO  
CARDIOVASCULAR E AUTONÔMICA DE RATOS COM INFARTO AGUDO DO  
MIOCÁRDIO INDUZIDO POR ISOPROTERENOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mirizana Alves de Almeida  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

*À minha família que tanto me apoia e torce por mim.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por traçar e iluminar meus caminhos, por me permitir oportunidades engrandecedoras e conhecer pessoas extraordinárias, pela minha saúde e capacidade de agregar e repassar conhecimento.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Faculdade de Medicina pela oportunidade da realização do trabalho e pelo suporte docente, físico e administrativo.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro no custeio da bolsa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, pelo meu acolhimento como orientanda, por todos os conhecimentos compartilhados e confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e pelo incessante estímulo ao conhecimento científico.

Aos Professores integrantes das bancas de qualificação (Profs. Drs. Rodrigo José Bezerra de Siqueira e Gilmara Holanda da Cunha) e defesa (Profs. Drs. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e Mirizana Alves de Almeida), pelas ideias e sugestões no aprimoramento do trabalho.

Aos meus colegas de pós graduação (Andréa Felinto Moura) e parceiros nesse trabalho (João Alison Moraes Silveira e Paula Priscila Costa), principalmente ao aluno de Iniciação Científica (Danilo Galvão Rocha) do Laboratório de Farmacologia Pré Clínica – LFPC- UFC, pela intensa colaboração na realização desse estudo.

Aos meus professores de graduação, especialmente às professoras Mirizana e Jaqueline, pelo incentivo ao conhecimento e à pesquisa.

À Adelânia Roque e Flávia Aguiar por estarem sempre disponíveis e de portas abertas.

À toda a minha família, meu pai (José Nilson), meus irmãos (Débora e Guilherme) e especialmente à minha mãe (Maria Kátia) por estar sempre ao meu lado incentivando e torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu noivo (Pedro), meus sogros (Cristiany e Erisvaldo) e à toda a família pelo apoio e suporte incondicional. Aos meus amigos pela positividade e torcida. Às minhas sobrinhas (Luma, Isadora, Maria Clara e Elisa) por me estimularem a ver um mundo melhor no futuro.

Aos animais experimentais, verdadeiros heróis da ciência, que entregaram suas vidas para a realização deste trabalho e progresso do conhecimento científico.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”  
(José de Alencar)

## RESUMO

A *Alpinia zerumbet* é uma planta popularmente utilizada no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e ansiedade. Estudos, principalmente com o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz), demonstraram ações hipotensoras, vasodilatadoras, antioxidantes, entre outras. Assim, o objetivo deste estudo é analisar o efeito do OEAz na função cardiovascular e autonômica em ratos com infarto agudo do miocárdio(IAM) induzido por isoproterenol. Utilizaram-se ratos Wistar machos, pesando entre 250-350 gramas distribuídos em quatro grupos: Controle, água por gavagem durante 7 dias e salina subcutânea nos dias 6 e 7; ISO, água por gavagem 7 dias e isoproterenol 150mg/kg nos dias 6 e 7; OEAz, OEAz 100mg/kg por gavagem 7 dias e salina subcutânea nos dias 6 e 7; ISO+OEAz, OEAz 100mg/kg por gavagem 7 dias e isoproterenol subcutâneo dias 6 e 7. A pressão arterial(PA) e frequência cardíaca(FC) foram medidas por catéter de pressão na aorta abdominal. O Eletrocardiograma foi registrado utilizando-se derivação DII. Inseriu-se uma cânula de polietileno na veia cava, para administração dos fármacos fenilefrina(0,5; 1 e 2ug/kg) e nitroprussiato de sódio(5, 10 e 20ug/kg) para avaliar os barorreflexos, serotonina(2, 4 e 16ug/kg) para avaliar os receptores cardiopulmonares e atropina(3mg/kg) e propranolol(4mg/kg) para avaliar os sistemas simpático e parassimpático. A Variabilidade da Frequência Cardíaca(VFC) foi derivada do intervalo de pulso e a Variabilidade da PA(VPA) da PAS. O coração dos animais foram fatiados e corados com TTC para avaliação da área de infarto. Em relação aos parâmetros cardiovasculares foi significativamente maior a FC e o trabalho cardíaco do grupo OEAz quando comparado ao ISO. Quanto ao eletrocardiograma o intervalo RR foi menor no grupo OEAz comparado ao ISO, a duração do complexo QRS foi maior nos grupos ISO e OEAz+ISO comparadas ao Controle e no grupo ISO comparado com o OEAz, o intervalo QT foi maior nos grupos ISO e OEAz+ISO comparados com o Controle e com o OEAz assim como no intervalo QTc, a onda Q foi mais profunda no grupo OEAz+ISO comparados com o Controle e OEAz, a onda R foi maior no grupo Controle comparado com os demais, a onda T e o segmento ST foram maiores nos grupos ISO e OEAz+ISO comparados com o Controle e OEAz. A média VFC no domínio do tempo foi maior no grupo ISO comparado ao OEAz e OEAz+ISO, o mesmo ocorreu na VFC no domínio da frequência na banda de baixa frequência. A VPA na banda de alta frequência foi maior no grupo OEAz comparado com o ISO. O reflexo cardiopulmonar mostrou significância na variação da PA da dose intermediária de serotonina comparada com as demais, e na variação da FC do grupo Controle comparado com OEAz+ISO. A FC intrínseca foi menor no grupo ISO comparado com o Controle e o índice simpático-vagal maior no grupo ISO que no Controle. Não houve diferença significativa na extensão do infarto nos grupos ISO e OEAz+ISO. Conclui-se que o pré tratamento com o OEAz não foi capaz de reverter os danos hemodinâmicos e eletrocardiográficos mas reverteu o aumento da modulação simpática causados pelo IAM.

**Palavras-chave:** Plantas Medicinais. Infarto do Miocárdio. Ratos. Sistema Cardiovascular.

## ABSTRACT

### EFFECT OF ALPINIA ZERUMBET'S ESSENTIAL OIL IN CARDIOVASCULAR AND AUTONOMIC FUNCTION WITH ISOPROTERENOL INDUCED ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION IN RATS

The *Alpinia zerumbet* is a plant popularly used to treat hypertension and anxiety. Studies, particularly with the essential oil from the leaves of *Alpinia zerumbet* (OEAz) demonstrated hypotensive, vasodilator, antioxidant actions, among others. The objective of this study was to analyze the effect of OEAz in cardiovascular and autonomic function in rats with isoproterenol-induced myocardial infarction (MI). Male Wistar rats were used weighing between 250 and 350 grams and divided into four groups: control, water by gavage for 7 days and subcutaneous saline on days 6 and 7; ISO water by gavage 7 days and isoproterenol 150mg/kg on days 6 and 7; OEAz, OEAz 100mg/kg by gavage 7 days and subcutaneous saline on days 6 and 7; ISO+OEAz, OEAz 100mg/kg by gavage 7 days and subcutaneous isoproterenol on days 6 and 7. The blood pressure (BP) and heart rate (HR) were measured by pressure catheter in the abdominal aorta. The electrocardiogram was recorded using derivation DII. It was inserted a polyethylene cannula in the cava vein to administrate the drugs phenylephrine (0.5, 1 and 2ug / kg) and sodium nitroprusside (5, 10 and 20 ug / kg) to assess the baroreflex, serotonin (2, 4, and 16ug / kg) to evaluate cardiopulmonary receptors and atropine (3 mg / kg) and propranolol (4mg / kg) to evaluate the sympathetic and parasympathetic systems. The Heart Rate Variability (HRV) was derived from the pulse interval and the variability of BP (VBP) from the BP data. With regard to cardiovascular parameters was significantly higher the HR and cardiac work of OEAz group compared to the ISO. The RR interval was shorter in OEAz group compared to ISO, the duration of the QRS complex was higher in ISO and ISO+OEAz groups compared to the control and the ISO group compared with the OEAz, the QT interval was higher in groups ISO and OEAz+ISO compared to the control and the OEAz as long as in the corrected QT interval, Q wave was deeper in OEAz+ISO group compared with the control and OEAz, the R wave was higher in the control group compared with others groups, the T wave and ST segment were higher in ISO group and ISO+OEAz compared with the control and OEAz. The average HRV in the time domain was higher in the ISO group compared to OEAz and OEAz+ISO, the same occurred in HRV in the frequency domain in the low frequency band. The VPA in the high frequency band was greatest in the group OEAz compared to ISO. The cardiopulmonary reflex showed significant variation in the BP intermediate dose of serotonin compared with the other, and the variation of the group's control FC compared to OEAz ISO. The intrinsic FC was lower in the ISO group compared with the control and the sympathetic vagal index was higher in ISO group than in control. The essential oil didn't reduce the infarct area comparing ISO and OEAz+ISO groups. The conclusion is that pretreatment with OEAz was not able to reverse the hemodynamic and electrocardiographic but reduced the sympathetic modulation damage caused by MI.

**Key-word:** Medicinal Plants. Myocardial Infarction. Rats. Cardiovascular System.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Alta Frequência
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BF	Baixa Frequência
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos
<i>Dcam</i>	NOAEL em camundongos
DER	Dose Equivalente em Ratos
DOCA	<i>Deoxycorticosterone Acetate</i>
DPT	Duplo Produto
ECG	Eletrocardiograma
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FC	Frequência Cardíaca
FCI	Frequência Cardíaca Intrínseca
FMOEAz	Fração Metanólica do Óleo Essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IK	Índice de Kovats
IP	Intervalo de Pulso
ISO	Isoproterenol
ISV	Índice Simpático-Vagal
KCl	Cloreto de Potássio
<i>Kmcam</i>	Fator para conversão da dose em camundongos
<i>Kmrato</i>	Fator para conversão da dose em ratos
LFPC	Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica
MBF	Muito Baixa Frequência
Na <sup>+</sup>	Sódio

NOAEL	<i>No Observable Adverse Effects Level</i>
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OEAz	Óleo Essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>
PA	Pressão Arterial
PAC	Potencial de Ação Composto
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PF	Peso em gramas no oitavo dia
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Peso em gramas no primeiro dia
RMSSD	<i>Root-Mean of Square Successive NN Interval Difference</i>
SC	Subcutânea
SF	Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio 0,9%
SNC	Sistema Nervoso Central
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio
tR	Tempo de Retenção
UFC	Universidade Federal do Ceará
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VPA	Variabilidade da Pressão Arterial
VPAS	Variabilidade da Pressão Arterial Sistólica

## LISTA DE FIGURAS

1. Linha do tempo, protocolo de avaliação autonômica.....	34
2. Pressão arterial sistólica, em mmHg.....	39
3. Pressão arterial diastólica, em mmHg.....	40
4. Pressão arterial média, em mmHg.....	40
5. Frequência cardíaca, em batimentos por minuto.....	41
6. Avaliação do trabalho cardíaco, por meio da determinação do duplo produto.....	42
7. Traçado eletrocardiográfico obtido nos grupos Controle, ISO, OEAz, OEAz +ISO...44	
8. Duração do intervalo RR, em segundos.....	44
9. Duração da onda P, em segundos.....	45
10. Duração do complexo QRS, em segundos.....	46
11. Duração do intervalo QT, em segundos.....	47
12. Intervalo QT corrigido, em segundos.....	48
13. Amplitude da onda P, em milivolts.....	48
14. Amplitude da onda Q, em milivolts.....	49
15. Amplitude da onda R, em milivolts.....	50
16. Amplitude da onda T, em milivolts.....	51
17. Amplitude do segmento ST, em milivolts.....	52
18. Efeito da fenilefrina.....	59
19. Avaliação da bradicardia barorreflexa.....	60
20. Efeito do nitroprussiato.....	60
21. Avaliação da taquicardia barorreflexa.....	61
22. Efeito da serotonina.....	62
23. Efeito da atropina.....	64
24. Efeito do propanolol.....	65
25. Frequência cardíaca intrínseca, em batimentos por minutos.....	65
26. Avaliação do balanço autonômico simpático-vagal.....	66
27. Extensão do infarto.....	67
28. Avaliação da extensão do infarto, expressa em termos percentuais.....	68
29. Variação da massa corporal, em termos percentuais.....	69
30. Peso seco do coração, em gramas.....	69

## LISTA DE TABELAS

1. Constituintes químicos do OEAZ identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.....	13
2. Parâmetros cardiovasculares.....	43
3. Parâmetros eletrocardiográficos.....	53
4. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo.....	54
5. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência.....	55
6. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em percentual.....	56
7. Parâmetros da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo.....	57
8. Parâmetros da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio da frequência....	58
9. Parâmetros da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio da frequência em percentual.....	59
10. Avaliação da sensibilidade barorreflexa.....	61
11. Variação da pressão arterial, expressa em mmHg, do reflexo cardiopulmonar.....	63
12. Variação da frequência cardíaca, expressa em bpm, do reflexo cardiopulmonar.....	64
13. Parâmetros da avaliação do controle autonômico.....	66

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Os fitoterápicos .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 <i>Alpinia zerumbet</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz).....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Estudos toxicológicos referentes à <i>Alpinia zerumbet</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Propriedades farmacológicas da <i>Alpinia zerumbet</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Lesão Celular Isquêmica.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7 Infarto Agudo do Miocárdio: Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos .....</b>	<b>20</b>
<b>1.8 Controle Cardiovascular pelo Sistema Nervoso Autônomo .....</b>	<b>22</b>
<b>1.9 Justificativa .....</b>	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>27</b>
<b>3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Aspectos éticos .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Animais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Local de realização do estudo .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Coleta do material vegetal .....</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz).....</b>	<b>29</b>
<b>3.6 Indução do Infarto Agudo do Miocárdio .....</b>	<b>30</b>
<b>3.7 Grupos experimentais .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8 Procedimento Cirúrgico.....</b>	<b>32</b>
<b>3.9 Parâmetros Cardiovasculares .....</b>	<b>32</b>
<b>3.10 Protocolo para avaliação do sistema autonômico.....</b>	<b>33</b>
<b>3.11 Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial.....</b>	<b>35</b>

<b>3.12 Duplo produto.....</b>	<b>36</b>
<b>3.13 Avaliação da Extensão do Infarto .....</b>	<b>36</b>
<b>3.14 Análise estatística.....</b>	<b>37</b>
<b>3. 15 Fármacos e Reagentes .....</b>	<b>38</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Parâmetros Cardiovasculares .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Parâmetros Eletrocardiográficos .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Variabilidade da frequência cardíaca .....</b>	<b>54</b>
4.3.1 Domínio do tempo .....	54
4.3.2 Domínio da frequência .....	55
<b>4.4 Variabilidade da pressão arterial sistólica .....</b>	<b>56</b>
4.4.1 Domínio do tempo.....	56
4.4.2 Domínio da frequência .....	57
<b>4.5 Parâmetros Autonômicos.....</b>	<b>59</b>
<b>4.6 Área Cardíaca Infartada.....</b>	<b>67</b>
<b>4.7 Massa Corporal e Cardíaca .....</b>	<b>68</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>5.1 Parâmetros Cardiovasculares .....</b>	<b>71</b>
<b>5.2 Parâmetros Eletrocardiográficos .....</b>	<b>72</b>
<b>5.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial Sistólica .....</b>	<b>75</b>
<b>5.4 Parâmetros Autonômicos.....</b>	<b>77</b>
<b>5.5 Massa Corporal .....</b>	<b>79</b>
<b>5.6 Avaliação da Extensão do Infarto .....</b>	<b>80</b>
<b>5.7 Considerações Finais .....</b>	<b>81</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Os fitoterápicos

Desde a idade antiga são utilizadas plantas como forma de medicamentos. Hoje a vasta gama de fármacos disponíveis para o tratamento dos mais diversos tipos de doenças, principalmente, os derivados de plantas superiores, é grandemente devido ao auxílio dos produtos naturais. Vários desses medicamentos são usados atualmente em diversas disfunções como as estatinas nas dislipidemias, os imunossupressores, antibióticos e medicamentos no combate do câncer (vimblastina, vincristina, taxol) (YUNES; CALIXTO, 2001; TIRAPELLI *et al.*, 2010).

Atualmente, notou-se um aumento no interesse científico e industrial na pesquisa de novas substâncias fitoterápicas que possam vir a ser empregadas no tratamento das mais diversas disfunções. Paralelamente, houve um acréscimo no consumo e comercialização dessas substâncias, estimulando ainda mais o desenvolvimento dos fitoterápicos (TIRAPELLI *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2011).

Por se tratar de uma mistura de constituintes acredita-se que os medicamentos fitoterápicos apresentem uma vantagem terapêutica, pois os componentes agiriam de forma sinérgica e aditiva potencializando o efeito desejado e diminuindo possíveis efeitos tóxicos. Dessa forma, é de grande importância o aprimoramento de tecnologias que desenvolvam as técnicas de plantio, extração, processamento, controle de qualidade e entrega de matéria prima que acumule, estabilize e aumente a biodisponibilidade dos princípios ativos (BRASIL, 2008).

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, e, conseqüentemente, um grande potencial desenvolvedor de medicamentos fitoterápicos. No Nordeste a *Alpinia zerumbet*, também conhecida como “colônia”, “jardineira” e “vindicá” é largamente utilizada pela população para o tratamento de ansiedade e depressão na forma de chá das folhas (MATOS, 2002). Por esse motivo a *Alpinia zerumbet* foi amplamente estudada para verificar suas propriedades farmacológicas.

## 1.2 *Alpinia zerumbet*

A *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith é uma planta pertencente à família Zingiberaceae, a maior da ordem Zingiberales, constituída de 53 gêneros e mais de 1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e sudeste da Ásia (KRESS; PRINCE; WILLIAMS, 2002). É classificada como uma planta herbácea, rizomatosa, com 2 a 3 metros de altura, hastes numerosas, recurvadas, folhas coriáceas e espessas. O caule é aéreo, curto, com folhas lanceoladas em disposição dística, de base aguda e ápice cuspidado. As folhas são curto-pecioladas, com longa bainha aberta e língula desenvolvida (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004).

A beleza das suas flores faz com que ela seja largamente cultivada. Neste gênero há uma estratégia reprodutiva chamada flexistilia, um mecanismo que favorece a polinização cruzada, evitando assim a autopolinização (BARRET, 2002).

## 1.3 Óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz)

Os óleos essenciais geralmente tem sabor ácido e picante e quando extraídos são incolores ou amarelados. Não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor e umidade. As composições desses óleos apresentam diferentes concentrações, basicamente com um composto majoritário, outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Tomlinson (1956) registrou para as Zingiberaceae a presença de células oleíferas de forma isodiamétrica, paredes suberificadas, distribuídas no parênquima fundamental de todos os órgãos estudados e na epiderme da lâmina. Segundo Fahn (1979), as essências ou óleos essenciais contidas nessas células possuem grande quantidade de terpenos.

Estudos afirmam que o OEAz possui grande quantidade de mono e sesquiterpenos, com maior concentração de cineol e terpineol (MATOS, 2002). Lahlou *et al.* (2003) relataram que o óleo essencial representa 0,3% do peso da planta, e que sua composição química contém quantidades significativas de terpinen-4-ol (28,09%) e 1,8-cineol (15,02%).

A maioria das estruturas químicas dos óleos voláteis são constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, com dominância dos terpenóides. Os compostos terpênicos mais frequentemente presentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Os monoterpenos podem, ser agrupados em três subgrupos: acíclicos (mirceno-10, linalol-11, geraniol-12), monocíclicos (alfa-terpineol 13 e terpinoleno 14) e bicíclicos (alfa-pineno 15, tujona 16, cânfora 17, fenchona 18) (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Grande parte dos estudos que utilizam o OEAz, o terpinen-4-ol é um terpeno volátil de baixa toxicidade, encontrado no óleo essencial de diversas plantas aromáticas, enquanto o 1,8-cineol é um monoterpeno cíclico, sendo um dos componentes do OEAz, conjuntamente eles são os denominados como responsáveis pelos efeitos farmacológicos desse óleo (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Em relação às propriedades físico-químicas do OEAz o valor da densidade foi definido em 0,88 g/mL e o índice de refração em 1,471. A tabela 1 mostra os valores do tempo de retenção (tR), logaritmo do tempo de retenção (log tR), índice de Kovats (IK), índice aritmético e valores percentuais obtidos através de estudo cromatográfico com o OEAz realizado pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química da UFC (CUNHA, 2012).

**Tabela 1** – Constituintes químicos do OEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.

Constituintes do OEAz	tR	log tR	IK	IA	%
$\alpha$ -tujeno	8,052	7,992	930	924	4,49
$\alpha$ -pineno	8,268	8,108	939	932	1,72
sabineno	9,607	9,525	975	969	10,99
$\beta$ -pineno	9,711	9,658	979	974	2,82
$\alpha$ -terpineno	11,128	11,058	1017	1014	2,89
<i>p</i> -cimeno	11,381	11,300	1032	1013	5,88
<b>1,8-cineol</b>	<b>11,667</b>	<b>11,500</b>	<b>1031</b>	<b>1026</b>	<b>24,61</b>
$\gamma$ -terpineno	12,713	12,608	1059	1054	14,28
terpinoleno	13,781	13,725	1088	1086	1,50
linalol	14,172	14,142	1096	1095	1,05
<b>terpinen-4-ol</b>	<b>17,147</b>	<b>16,992</b>	<b>1177</b>	<b>1174</b>	<b>25,70</b>
$\alpha$ -terpineol	17,544	17,492	1188	1186	1,21
<i>trans</i> -cariofileno	25,755	25,692	1419	1417	1,71
óxido de cariofileno	30,898	30,833	1583	1582	1,14

#### 1.4 Estudos toxicológicos referentes à *Alpinia zerumbet*

Testes de citotoxicidade *in vitro* do OEAz e do extrato aquoso das folhas foram realizados com células tumorais de várias linhagens, variando entre as mais resistentes às mais sensíveis, como em linfócitos normais humanos. Os resultados não demonstraram atividade hemolítica mostrando que apresentam baixo poder tóxico e não desestabilizam a membrana plasmática (OLIVEIRA, 2008).

O extrato aquoso foi testado em cinco doses diferentes, 2.000, 2.750, 3.500, 4.250 e 5.000 mg/kg com o objetivo de analisar a toxicidade aguda. Nenhuma delas mostrou toxicidade exceto o extrato aquoso liofilizado das folhas da *Alpinia zerumbet* acima de 5.000 mg/kg, que obteve uma mortalidade de 50%. Os camundongos machos e fêmeas tratados apresentaram piloereção, fotofobia e redução de atividade. No ensaio do cometa e do micronúcleo, o extrato aquoso nas doses de 2.000, 3.500 e 5.000 mg/kg e o OEAz na dose de 400mg/kg não apresentaram atividade genotóxica (OLIVEIRA, 2008).

O OEAz nas doses de 30 a 100 mg/kg não obteve letalidade durante uma pesquisa de toxicidade aguda. Uma mortalidade em 60% e 90% dos camundongos machos e fêmeas respectivamente, tratados com a dose de 5.000 mg/kg. Alterações comportamentais sugestivas de toxicidade aguda não foram observadas durante os 14 dias de estudo nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, exceto na dose de 5.000 mg/kg. Animais tratados apresentaram sinais de toxicidade como resposta ao toque, segurar a cauda, reflexo corneal, tônus corporal e aumento da frequência respiratória e cardíaca quando comparados com o controle. O OEAz não causou alteração macroscópica importante no aspecto, cor e tamanho do coração, testículo, ovário, tubas uterinas, glândulas salivares e timo quando comparado ao grupo controle. Alterações significantes não foram observadas no peso do pulmão, nódulos linfáticos, rim, fígado, glândulas adrenais, estômago, baço e encéfalo nos camundongos machos e fêmeas, quando comparado com o grupo controle (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2008).

Camundongos machos apresentaram aumento significativo no peso do coração (em doses de 400 mg/kg), pulmão (em doses de 800 mg/kg) e fígado (em doses de 800 mg/kg) e redução do peso do estômago (em doses de 100 mg/kg) e rim (em doses de 100 e 400 mg/kg), quando comparado com o grupo controle. Já nos camundongos fêmeas tratadas com OEAz

(100-800 mg/kg) apresentaram diminuição significativa no peso do encéfalo e fígado (em doses de 100 mg/kg) e aumento do peso do coração e fígado (em doses de 800 mg/kg). Quanto aos padrões histopatológicos em camundongos machos houve alteração do baço (hiperplasia linfonoidal), pulmão (hemorragia alveolar) e rim (inflamação crônica). Nas fêmeas ocorreram alterações no pulmão (hiperplasia linfonoidal) e rim (inflamação crônica) (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2008).

Dentre os resultados encontrados o OEAz na dose de 200-800 mg/kg provocou aumento significativo dos níveis de albumina em todas as doses utilizadas, creatinina (em doses de 400 e 800 mg/kg), sódio (em doses de 100 mg/kg), potássio (em doses de 100 mg/kg), aspartato aminotransferase (em doses de 100 mg/kg), colesterol HDL (em doses de 100, 400 e 800 mg/kg) e colesterol total (em doses de 400 mg/kg) quando comparado ao grupo controle. Observou-se nos camundongos machos tratados com OEAz diminuição nos níveis de leucócitos com a dose de 200 mg/kg quando comparado ao grupo controle. Os camundongos fêmeas, por outro lado, tiveram aumento de leucócitos (em doses de 200, 400 e 800 mg/kg) e plaquetas (em doses de 800 mg/kg) quando comparado ao grupo controle. Concluiu-se com esse estudo, portanto, que a NOAEL (*no observable adverse effect level*) está entre as doses de 100 e 200 mg/kg de OEAz (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2008).

Santana (2009) em um ensaio clínico avaliando os efeitos toxicológicos do chá da folha da *Alpinia zerumbet* concluiu que não houve efeitos tóxicos na ingestão de 540ml diários do chá por 28 dias nos parâmetros hematológicos, hepáticos, renais e metabólicos quando comparado com o grupo placebo.

### **1.5 Propriedades farmacológicas da *Alpinia zerumbet***

As folhas da *Alpinia zerumbet* contém óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos, sendo seus componentes majoritários o cineol e o terpineol. Dentre outras substâncias que compõem o óleo essencial, os mais importantes são alguns flavonóides de ação anti-hipertensiva e kavapironas com princípios de ação ansiolítica. Dessa forma, estudos farmacológicos do extrato aquoso das folhas e do óleo essencial mostraram atividade anti-hipertensiva e levemente tranquilizante ou sedativa. As folhas podem ser utilizadas em forma

de chá, na proporção de uma folha para um litro de água fervente, devendo esse litro de chá ser refrigerado e consumido ao longo do dia. A pressão arterial deve ser monitorizada para controlar o número de folhas utilizadas para fazer o chá, podendo-se utilizar até três folhas (MATOS, 2002).

Mendonça *et al.* (1991) verificaram os efeitos do chá e do extrato hidroalcoólico da *Alpinia zerumbet* em ratos e observaram o efeito de excitação do sistema nervoso central, seguida de depressão e hipocinesia. Houve também um aumento no tempo de sono e efeito hipotensor que não era bloqueado por atropina, propranolol e hexametônio. O extrato causou ainda diminuição do cronotropismo e do inotropismo. Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica, onde observou-se aumento da TGO, TGP, HDL e da contagem de linfócitos, mas de forma geral, não houve toxicidade significativa.

Foi realizado um estudo com dez indivíduos saudáveis com o objetivo de avaliar a função diurética de três plantas utilizadas popularmente: *Elephantopus scaber*, *Alpinia zerumbet* e *Tradescandia diurética*. Foram administrados agudamente os chás dessas substâncias naturais e comparados com o placebo (água com baunilha). A dose utilizada foi cinco vezes maior que a utilizada popularmente, 7,5 g/100mL, 0,8 g/100mL, 25 g/100mL. Foram analisadas as concentrações de sódio, potássio, ácido úrico, cálcio, fósforo, uréia, creatinina e volume urinário sendo esse o único parâmetro em que ocorreu diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) após a administração do chá de *Alpinia zerumbet*, que também causou decréscimo na pressão diastólica ( $p < 0,05$ ) e pressão sistólica ( $p < 0,05$ ). Porém, não foram observadas alterações hidroeletrólítica e de parâmetros de função renal com os chás das três plantas, excluindo portanto o efeito tubular ou glomerular destas substâncias (LARANJA; BERGAMASCHI; SCHOR, 1992).

Bezerra *et al.* (2000) observaram o OEAz inibiam contrações induzidas por KCl e acetilcolina no íleo de ratos, o qual proporcionava ação antiespasmótica.

Em um estudo de Lahlou *et al.* (2002a) comparando os efeitos cardiovasculares da administração intravenosa do OEAz e do terpinen-4-ol ocorreu a hipotensão independentemente da presença operacional do sistema nervoso simpático, sugerindo que o OEAz pode ser um agente vasodilatador direto.

Lahlou *et al.* (2002b) em outro estudo analisaram os efeitos cardiovasculares do 1,8-cineol em ratos, e concluíram que o tratamento intravenoso como o OEAz em ratos

anestesiados com pentobarbital e conscientes, geravam hipotensão muito mais relacionada com o relaxamento vascular ativo do que a ausência do tônus simpático.

Leal-Cardoso *et al.* (2003), verificaram a ação do OEAz no potencial de ação composto (PAC) do nervo ciático de ratos Wistar e observaram que o OEAz induz um bloqueio do PAC de forma dose-dependente, sendo a velocidade de condução diminuída significativamente por 300, 600 e 2000 µg/mL de OEAz, quando comparado aos valores controle.

Lahlou *et al.* (2003) utilizando o modelo de hipertensão o DOCA-Sal em ratos, investigaram a resposta hipotensiva ao tratamento intravenoso com OEAz e seu principal constituinte, o terpinen-4-ol (1-10 mg/kg) e observaram uma diminuição da pressão aórtica média de forma dose-dependente, provavelmente, devido a um relaxamento do músculo liso. Diante desses achados, os autores atribuíram tal efeito ao maior constituinte do OEAz, o terpinen-4-ol. Na análise da constituição química do OEAz deste estudo, duas substâncias foram observadas quantidade superior: o terpinen-4ol (28,09%) e o 1,8-cineol (15,02%).

A administração do OEAz por via oral nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg para camundongos, foi detectado um efeito antinociceptivo de forma dose-dependente, o que denota que o mecanismo de ação pode envolver a participação de receptores opióides (ARAÚJO *et al.*, 2005)

Lin *et al.* (2008) objetivou em seu estudo, observar a atividade antioxidante e hipolipidêmica da *Alpinia zerumbet* em hamsters, com foco na elevação das proteínas de alta densidade (HDL), concluindo que o pó das sementes e o óleo essencial possuem efeitos hipolipidêmicos com capacidade de elevar o HDL. Em um experimento com aorta isolada de rato, Pinto *et al.* (2009) sugere que o OEAz induz um potente efeito relaxante diretamente dependente da integridade funcional do endotélio vascular, sugerindo então o envolvimento do óxido nítrico nesse mecanismo.

Em um estudo com camundongos utilizou-se doses de 50 e 100 mg/kg por via intraperitoneal do OEAz. Foi realizado então modelos comportamentais para verificar a atividade locomotora (campo aberto), catalepsia, ansiedade (teste do campo aberto), atividade de catatonia, ansiedade (labirinto em cruz elevado), depressão (teste do nado forçado e suspensão da cauda) e avaliação da estereotipia induzida por apomorfina, e os resultados

foram comparáveis aos obtidos no grupo controle tratado com haloperidol (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Em preparações de átrio isolado, Santos *et al.* (2011) constataram a redução da força de contração e da frequência cardíaca provocada pelo OEAz, provavelmente por um bloqueio na entrada de cálcio nos canais de cálcio tipo L.

Um estudo realizado por Cunha *et al.* (2013), visando verificar o efeito anti-hipertensivo da fração metanólica do OEAz (FMOEAz), constatou a redução da hipertensão arterial sistêmica induzida pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico em ratos. Além disso, o FMOEAz causou vasodilatação de forma dose-dependente em anéis de aorta isolados contraídos com fenilefrina e KCl. Os autores concluíram que a atenuação da contração parece se dar pela inibição do influxo de íon cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes e pela redução da mobilização do cálcio intracelular.

Lobo Filho (2011) avaliando o efeito do OEAz no infarto em ratos induzido por isopreterenol mostrou que o pré tratamento com o óleo 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 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.

## **1.6 Lesão Celular Isquêmica**

A isquemia é o tipo mais comum de lesão celular onde o suprimento de oxigênio e nutrientes é insuficiente para suprir as necessidades teciduais, normalmente devido à diminuição do fluxo sanguíneo, devido uma obstrução no sistema arterial ou aumento da demanda energética do tecido (KUMAR; ABUL, 2000).

Grande parte da energia utilizada pelos mamíferos é derivada, principalmente, do metabolismo celular aeróbico, por meio da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, gera moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Em situações com baixo suprimento de oxigênio, como no infarto agudo do miocárdio (IAM), a fosforilação oxidativa pára rapidamente e o ATP passa a ser sintetizado primordismente por meio da glicólise anaeróbica. Essa via de

produção energética, não gera ATP suficiente para atender à demanda celular, culminando no consumo dos estoques de ATP e de creatina-fosfato. Quando essa via de produção de ATP continua, pela insistente depleção de oxigênio, ocorre a produção de grandes quantidade de lactato e íons  $H^+$ , com conseqüente redução do pH intracelular. Com o consumo progressivo de glicogênio, a velocidade da glicólise diminui, aumentando a depleção de ATP (JENNINGS; REIMER, 1981).

Inúmeras alterações intracelulares ocorrem devido ao déficit energético como os distúrbios da homeostase iônica celular (GROOT; RAUEN, 2007). A redução da atividade da bomba de  $Na^+/K^+$  ATPase também se dá pela depleção contínua dos níveis de ATP, conseqüentemente ocorre um aumento da concentração intracelular de  $Na^+$  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  $Na^+/Ca^{2+}$  que, ao invés de propiciar influxo de  $Na^+$  e efluxo de  $Ca^{2+}$ , passa a agir de forma inversa, aumentando a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular (DONG *et al.*, 2006; FIOLET; BAARTSCHEER, 2000).

A redução das atividades de bombas de  $Ca^{2+}$  presentes na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático contribui para o desequilíbrio iônico. O  $Ca^{2+}$  exerce importantes funções na lesão celular, como ativação de fosfolipases, principalmente fosfolipase A2, proteases, endonucleases, ATPases e dano mitocondrial, além da liberação de proteínas pró-apoptóticas aprisionadas entre as membranas mitocôndriais externa e interna (GROOT; RAUEN, 2007; FIOLET; BAARTSCHEER, 2000; DONG *et al.*, 2006).

Alterações morfológicas e metabólicas podem ser revertidas caso o fluxo sanguíneo seja restaurado após os primeiros minutos de esquia. Contudo, quando a isquemia é contínua por cerca de vinte a trinta minutos, as células desenvolvem lesões irreversíveis que culminam na morte celular (FERDINANDY; SCHULZ; BAXTER, 2007). A determinação 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 morta deve apresentar pelo menos um dos critérios morfológicos e moleculares: perda da integridade da membrana celular; fragmentação celular em discretos fragmentos, comumente 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).

Apesar da morte celular no IAM ser predominantemente por necrose, estudos indicam que a apoptose celular ocorre, principalmente durante os primeiros minutos da lesão ou quando há reperfusão (BUJA; ENTMAN, 1998). A dos níveis de ATP tem sido considerado um importante fator, já que para haver apoptose é necessário estoque de ATP, pois envolve complexas sequências de reações enzimáticas (LEIST *et al.*, 1997; BUJA, 2005; EDINGER; THOMPSON, 2004).

A restauração do fluxo sanguíneo é fundamental para garantir a sua viabilidade e função, assim como para prevenir lesões celulares irreversíveis, principalmente quando a reperfusão ocorre logo após o início da isquemia (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004). Contudo, a reperfusão pode provocar danos adicionais àqueles causados pela isquemia.

Quando se inicia a reperfusão, novos mecanismos lesivos ocorrem, provavelmente o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, uma reação inflamatória aguda e disfunção endotelial e microvascular (KUMAR; ABUL, 2000; ELTZSCHIG; COLLARD, 2004; VERMA *et al.*, 2002; DIRKSEN *et al.*, 2007).

Após a reperfusão, uma resposta inflamatória é desencadeada devido à liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios produzidos durante a isquemia. Esta resposta pode ser tão intensa, que pode resultar no aparecimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica ou na síndrome da disfunção múltipla dos órgãos, que chegam a representar cerca de 30 a 40% das causas de mortalidade em unidades de terapia intensiva (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004).

### **1.7 Infarto Agudo do Miocárdio: Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos**

O termo infarto do miocárdio significa basicamente a morte de cardiomiócitos causada por isquemia prolongada ocasionada por uma oclusão arterial coronariana. Esta obstrução bloqueia o suprimento sanguíneo adequado ao miocárdio, levando-o a profundas consequências funcionais, bioquímicas e morfológicas. Após segundos de obstrução vascular,

a glicólise aeróbica dos cardiomiócitos se interrompe, prejudicando a produção de ATP. A isquemia do miocárdio também contribui para o aparecimento de arritmias, possivelmente devido a instauração da instabilidade elétrica das regiões onde o suprimento sanguíneo foi crucialmente prejudicado. Tais alterações podem levar a perda irreversível miocárdica culminando no aparecimento de disfunção mecânica do coração. A evolução para insuficiência cardíaca depende da intensidade desta disfunção (UMAR; FAUSTO, 2004).

Os efeitos da isquemia sobre o miocárdio são bem conhecidos e além de resultar em uma oferta inadequada de oxigênio, ocasionam acúmulo de metabólitos que, agindo diretamente ou através de mediadores, causam lesão miocárdica, podendo culminar em necrose. Se por um lado a isquemia é capaz de gerar lesões celulares importantes, a reperfusão pode acentuá-las, piorando o processo e tornando-o irreversível (HEARSE,1978; HOBSON 1996). No miocárdio, a reperfusão de áreas isquêmicas pode gerar: redução da força contrátil, arritmias de reperfusão, infarto e necrose de miócitos (BOLLIR.1990; ZHAO, 2006).

A terapêutica atual utilizada no infarto se faz no sentido de minimizar a área de necrose miocárdica, quanto ao aumento da sobrevida e qualidade de vida do paciente. Entretanto, ainda existem poucos fármacos e técnicas que realmente exerçam esse benefício sem trazer efeitos adversos a longo prazo para esses mesmos pacientes, como diminuição do débito cardíaco e o aparecimento de arritmias, aumentando os casos de reinternações hospitalares. O desenvolvimento de uma nova terapêutica que atue na manutenção da qualidade de vida desses pacientes sem haver um prejuízo da sobrevida ou sintomatologia, representa uma necessidade médica importante (ZHAO, 2006).

As doenças cardiovasculares são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo ocidental (LEVY *et.al.*,2002). Mesmo com a grande evolução do diagnóstico e do tratamento da insuficiência das artérias coronárias, o IAM continua a ser a principal causa de morte nas populações ocidentais (ANTMAN, 2001). Segundo dados da American Heart Association (ROGER *et al.*, 2011), a prevalência de infarto do miocárdio nos Estados Unidos situa-se em 3,1% na população com mais de 20 anos. No Brasil, as doenças cardiovasculares ainda permanecem como a primeira causa de mortalidade proporcional, responsáveis por 29% dos óbitos em 2010 e se mantém persistentemente elevada: em média, 16,2%, em 2000, 16,1%, em 2005, e 15,3%, em 2010. Apesar das doenças cardiovasculares estarem diminuindo ao longo do tempo, ainda assim, é a enfermidade com a maior taxa de mortalidade quando comparada a outras doenças crônicas não transmissíveis. Assim, as doenças

coronarianas têm um grande impacto financeiro sobre o sistema de saúde, constituindo-se em cerca de 5% dos gastos com internação (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde [Datasus]).

Existe o conceito que o IAM é um evento pouco freqüente em pacientes com menos de 45 anos (KANNEL; ABBOTT, 1994; CHEN; CHESTER, KASKI, 1995). No estudo de Garoufales *et al.*, 1998, durante um período de dez anos, a incidência de IAM entre 30 e 44 anos foi de 5.11 % em 2282 homens e de 0.74% em 2845 mulheres. Por sua vez, diversos estudos demonstram que 4 a 8% dos IAM ocorrem em pacientes com até 45 anos (ZIMERMANN *et al.*, 2008), sendo que, no Brasil, 11,08 % dos IAM internados nos hospitais credenciados ao Sistema Único de Saúde ocorreram em pacientes entre 25 e 44 anos (DATASUS, 2010). Há algumas décadas, admitia-se que a doença coronária era uma doença quase exclusiva dos homens, raramente acometendo as mulheres; assim, sintomas sugestivos do diagnóstico de insuficiência coronária no homem eram subestimados quando apresentados por uma mulher. Essa visão errônea da doença coronária no sexo feminino não mais se justifica, pois atualmente ela é a principal causa de mortalidade entre as mulheres ocidentais, superando o câncer de útero, o de mama e as mortes durante o parto . Apesar destes fatos serem há muito conhecidos, são recentes os estudos mais aprofundados sobre a doença cardiovascular na mulher (DA LUZ; SOLIMENE, 1999; HOCHMAN *et al.*, 2001; WEXLER, 2008).

Desta forma, é notória como a trajetória da epidemiologia do infarto tem mudado significativamente durante anos. Novos públicos estão sendo melhor estudados e a prevalência do infarto tem se mostrado maior que o previamente esperado. Estes dados trazem consigo mudanças nas perspectivas de diagnóstico, tratamento e prognóstico para estes pacientes, assim como, também, nos métodos de prevenção do mesmo (WOODFIELD *et al.*, 2004).

## **1.8 Controle Cardiovascular pelo Sistema Nervoso Autônomo**

O estudo dos mecanismos de controle da pressão arterial tem indicado grande número de substâncias e sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e com redundância para garantir a pressão arterial (PA) em níveis adequados nas mais diversas situações.

Admite-se, portanto, que alterações da PA, como as encontradas na hipertensão ou em outras afecções, resultariam da disfunção dos sistemas de controle de pressão arterial. Com esse enfoque, os mecanismos neuro-humorais de ajuste instantâneo que definem as alterações apropriadas do débito cardíaco, da resistência periférica e do retorno venoso adaptadas ao ponto de operação (ou a pressão arterial do indivíduo, seja ele hiper, hipo ou normotenso) dependem da modulação do sistema cardiovascular, feita pela interação de mecanismos complexos. Entre eles, destacam-se o sistema nervoso autônomo e as diferentes alças hormonais acionados por informações codificadas pelos diferentes sensores periféricos (DE ANGELIS; SANTOS; IRIGOYEN, 2004).

Os pressorreceptores arteriais são o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, à curto prazo. São mecanorreceptores compostos por terminações nervosas livres situados na parede adventícia de grandes vasos (aorta e carótida) que são estimulados por deformações das paredes desses vasos, provocadas pela onda de pressão pelas características mecano-elásticas da parede. (KRIEGER; IRIGOYEN; KRIEGER, 1999; MICHELINI, 2000)

Durante elevações da PA, há um aumento na deformação da parede e ativação dos pressorreceptores que geram os potenciais de ação. Os sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), especificamente para o núcleo do trato solitário (NTS) via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e vago (fibras aórticas). Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que se projetam (eferentes vagais) para os neurônios pós ganglionares intramurais situados no coração, determinando aumento da atividade vagal e consequentemente queda da frequência cardíaca (FC). O tônus simpático para o coração e vasos, é reduzido já que outros neurônios do NTS, quando estimulados por aumento da PA, excitam o bulbo ventrolateral caudal que inibe os neurônios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral. Ocorre, assim, redução do inotropismo e bradicardia e a queda da resistência vascular periférica que levam à redução da PA (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; SANCHES *et al.*, 2009; MOSTARDA *et al.*, 2014).

O sistema nervoso autonômico influencia de forma tônica e reflexamente o sistema cardiovascular, já que, tanto a noradrenalina como a acetilcolina liberadas no coração, modificam o débito cardíaco por alterar o inotropismo e o cronotropismo. Nos vasos de resistência da circulação sistêmica, a liberação de noradrenalina modifica a contratilidade do

músculo liso vascular e, conseqüentemente, a resistência vascular periférica (FRANCHINI; COWLEY, 1996; COWLEY; FRANCHINI, 1996).

Apesar de os efeitos do sistema nervoso sobre o sistema cardiovascular sejam prioritariamente devidos à ação dos neurotransmissores noradrenalina e acetilcolina, a liberação de outros neurotransmissores nas terminações pós-ganglionares simpáticas e parassimpáticas pode modificar a ação da noradrenalina e da acetilcolina, aumentando as oportunidades de controle cardiovascular por aumentar ou diminuir a sensibilidade do músculo cardíaco e do músculo liso vascular à estimulação simpática e parassimpática (VICTOR; MARK, 1996; FRANCHINI, 1998).

Além disso, respostas reflexas do simpático e do parassimpático possibilitam ajustes do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, contribuindo para a estabilização e manutenção da PA sistêmica durante diferentes situações (COWLEY; FRANCHINI, 1996). Diante disso, sabe-se que ao menos três dos maiores arcos reflexos estão envolvidos na modulação da atividade parassimpática e simpática para coração e vasos, ligados aos pressorreceptores arteriais (alta pressão), aos receptores cardiopulmonares (baixa pressão) e aos quimorreceptores arteriais (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001).

Na lesão aguda do miocárdio, a ativação do sistema nervoso simpático ocorre como resposta adaptativa afim de restaurar ou manter os níveis de pressão e do débito cardíaco. Em modelos experimentais de insuficiência cardíaca, a atividade nervosa simpática está presente no início da disfunção ventricular esquerda (STEVENS *et al.*, 1995). Todavia, o mecanismo essencial responsável pela hiperatividade simpática nesta disfunção permanece desconhecido e pode estar relacionado a diversos sistemas, tais como: atenuação da sensibilidade dos mecanorreceptores arteriais e cardíacos; alteração pressórica na artéria e no capilar pulmonar; exacerbação do quimiorreflexo periférico e central; ativação das aferências simpáticas cardíacas que estão relacionadas à sensação de dor cardíaca durante a isquemia coronariana; ativação dos aferentes renais sensíveis a estímulos mecânicos ou químicos e ativação do sistema renina-angiotensina, entre outros (DE ANGELIS; SANTOS; IRIGOYEN, 2004).

O sistema nervoso parassimpático, também se encontra alterado no IAM. Eckberg, Nerhed e Vallin (1971) por meio da infusão de fenilefrina para aumentar a PA, observaram que a resposta bradicárdica mediada pelo parassimpático estava atenuada em pacientes com insuficiência cardíaca, demonstrando que o controle barorreflexo arterial da FC estava atenuado. De fato, existe consenso de que a função vagal preservada é benéfica na

manutenção da variabilidade da pressão arterial (SU; MIAO, 2001; BERNI; FIORINO; IRIGOYEN, 2004), em especial nos casos de isquemia do miocárdio (SCHULTZ, 2001). A administração de drogas parassimpatomiméticas e  $\beta$ -bloqueadoras após IAM e na insuficiência cardíaca tem revelado aumento da variabilidade da frequência cardíaca, indicando efeito protetor sobre o sistema cardiovascular (VYBIRAL *et al.*, 1993, LA ROVERE *et al.*, 1994). A busca por drogas com ação cardioprotetora, capazes de inibir a ocorrência de eventos cardíacos em situações de estresse ou esforço físico, para a utilização em pacientes portadores de cardiopatias isquêmicas, é portanto de grande relevância (DE ANGELIS; SANTOS; IRIGOYEN, 2004).

## 1.9 Justificativa

Vários estudos pré clínicos demonstraram a ausência de toxicidade e as ações farmacológicas, tanto do OEAz quanto do extrato e do chá da folha (inclusive em seres humanos) da *Alpinia zerumbet*. Dentre os principais efeitos podemos citar hipotensão, relaxamento vascular, efeito inotrópico e cronotrópico negativo, efeito antioxidante, hipolipidêmico, antinociceptivo, antihipertensivo e antiespasmótico, e o prolongamento de tempo de sono.

A importância da realização de um estudo pré clínico analisando os efeitos do OEAz nos parâmetros hemodinâmicos, eletrocardiográficos e autonômicos, se dá pelo grande impacto causado pelas doenças cardiovasculares na população e pelas evidências científicas que mostram atividade farmacológica promissora da *Alpinia zerumbet* nesse sistema.

Torna-se importante também evidenciar a magnitude de se estudar lesões cardíacas isquêmicas como o IAM devido à larga incidência na população brasileira e mundial. Ademais, a carência de estudos avaliando o efeito do OEAz nos parâmetros cardiovasculares isolados e associados ao IAM.

Portanto, esse trabalho oferece grande contribuição científica por ser o primeiro estudo a abordar o efeito do OEAz nos parâmetros cardiovasculares, autonômicos e eletrocardiográficos de ratos infartados. Pode-se enfatizar ainda a importância econômica-

social da utilização de substâncias fitoterápicas no tratamento de indivíduos com alterações cardiovasculares, desde que esse uso seja adequado, controlado e de eficácia comprovada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Analisar o efeito do pré tratamento com o OEAz na função cardiovascular e autonômica em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.

### 2.2 Específicos

- Analisar o efeito do pré-tratamento com OEAz na frequência cardíaca em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.
- Verificar o efeito do pré-tratamento com OEAz na pressão arterial em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.
- Avaliar o efeito do pré tratamento com OEAz nos parâmetros eletrocardiográficos em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.
- Estudar o efeito do pré tratamento com OEAz na variabilidade da frequência cardíaca em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.
- Estudar o efeito do pré tratamento com OEAz na variabilidade da pressão arterial sistólica em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.
- Analisar a influência do pré tratamento com OEAz no balanço simpático e parassimpático, na sensibilidade barorreceptora e no reflexo cardiopulmonar em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.
- Quantificar a extensão do infarto por meio de coloração específica para tecido isquêmico.

### **3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa intitulado de “Efeito do Óleo Essencial de *Alpinia zerumbet* na função cardiovascular e autonômica em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol” foi submetido a avaliação de um Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) e executado após aprovação de número 24/15. Neste estudo foram seguidas as normas de boas práticas indicadas para a realização de pesquisas que envolvem o uso de animais experimentais de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com a Lei nº 11794 da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA).

#### **3.2 Animais**

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) da linhagem Wistar, machos e sadios, pesando de 250 a 300 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os ratos foram previamente avaliados para exclusão de doenças e ficaram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, mantidos em ciclo claro/escuro (12/12h), a uma temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas convencionais de polipropileno com tampa de metal, com divisórias para ração e água. Cada gaiola abrigou quatro ratos, aos quais foram fornecidos ração e água *ad libitum*.

#### **3.3 Local de realização do estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia Pré-clínica (LFPC) integrante do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) – Faculdade de Medicina

– Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-Ceará, o qual possui infra-estrutura necessária para realização dos experimentos.

### **3.4 Coleta do material vegetal**

O óleo essencial foi produzido a partir das folhas da *Alpinia zerumbet*. As folhas foram coletadas no sítio Vila Nova, localizado no distrito de Ladeira Grande, no município de Maranguape, Ceará. A localização exata é 3°59'26,49" de latitude sul e 38°42'59,10" de longitude oeste. Uma amostra da planta foi identificada no Herbário Prisco Bezerra, da Escola de Agronomia da Universidade Federal do Ceará, estando depositada sob exsicata de número 50312.

### **3.5 Óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz)**

O OEAz foi obtido a partir da técnica de destilação de arraste por vapor d'água que é comumente utilizada para se obter óleos a partir de folhas. É o tipo de destilação usada para isolar substâncias que se decompõem nas proximidades de seu ponto de ebulição e que são insolúveis em água ou em seus vapores de arraste. No processo de destilação por arraste a vapor, um ou mais líquidos imiscíveis em água são destilados conjuntamente. Muitas substâncias orgânicas se decompõem quando em temperatura próxima ao seu ponto de ebulição, portanto a co-destilação em água previne a decomposição, uma vez que a mistura a ser destilada entra em ebulição a uma temperatura inferior ao ponto de ebulição da água. Esse tipo de destilação depende da imiscibilidade entre as substâncias orgânicas e a água. Desta maneira, a temperatura de destilação por arraste a vapor de uma substância razoavelmente volátil será sempre inferior a 100°. A destilação da maioria das substâncias nesse processo ocorre entre 80-100° (SIMÕES; SPITZER, 1999).

### 3.6 Indução do Infarto Agudo do Miocárdio

Foi utilizado o isoproterenol para indução do IAM nos animais na dose de 150mg/kg por via subcutânea em dois dias consecutivos, com intervalo de 24h entre as administrações (LOBO FILHO, 2011). O isoproterenol foi obtido da empresa Sigma Alderich em embalagens de um grama cada, este foi pesado em balança de precisão e solubilizado em água destilada para obter uma solução com concentração de 150mg/ml. Desta solução era aspirado o volume adequado para cada animal, individualmente, de acordo com o peso corporal e aplicado na região dorsal inferior direita do animal (WESTFALL; WESTFALL, 2006).

O isoproterenol é um potente agonista não seletivo de todos os receptores  $\beta$ , com afinidade muito baixa pelos receptores  $\alpha$ . É considerado, então, uma catecolamina agonista  $\beta$ -adrenérgica que causa dano severo no miocárdio gerando necrose semelhante à produzida no IAM (WEXLER, 1978).

### 3.7 Grupos experimentais

Delineou-se um ensaio constituído de 32 animais distribuídos em 4 grupo experimentais. Cada grupo recebeu OEAz ou água por gavagem, durante 7 dias, e isoproterenol ou solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (SF) por via subcutânea (SC) durante os dias D6 e D7 do tratamento.

- Grupo Controle: Receberam água por gavagem durante 7 dias e, nos dois últimos dias, receberam SF por via SC (0,2ml).
- Grupo ISO: Tratados com água por gavagem durante 7 dias e, nos dois últimos dias, receberam isoproterenol 150mg/kg por via SC.
- Grupo OEAz: Administrado OEAz por gavagem durante 7 dias e, nos dois últimos dias, receberam SF por via SC (0,2ml).
- Grupo ISO+OEAz: Receberam OEAz por gavagem durante 7 dias e, nos dois últimos dias, receberam isoproterenol 150mg/kg por via SC.

A gavagem foi realizada as 10 horas da manhã durante sete dias consecutivos onde o volume administrado era fixado em 0,5ml/rato/dia. Este volume era composto por OEAz na

dose de 100mg/kg (nos animais dos grupos OEAz e ISO+OEAz), completado com água até atingir 0,5ml e homogeneizado por agitação. Nos grupos controle e ISO todo o volume era composto por água. A dose utilizada de OEAz neste estudo (100mg/kg) foi baseada em estudo toxicológico que definiu a NOAEL para camundongos em 200mg/kg, esta quando aplicada para ratos, foi calculada a partir da fórmula (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2008):

$$DER = D_{cam} * \frac{K_{mcam}}{K_{mrato}}$$

Sendo:

DER: Dose equivalente em ratos;

*D<sub>cam</sub>*: corresponde à NOAEL, ou seja, a dose do fármaco em que não foram observados efeitos adversos no animal em mg/kg;

*K<sub>mcam</sub>*: Fator para conversão da dose em camundongos, sendo igual a 3;

*K<sub>mrato</sub>*: Fator para conversão da dose em ratos, sendo igual a 6.

Assim,

$$DER = 200 * \frac{2}{6}$$

$$DER = 100\text{mg/kg}$$

O peso dos animais foi verificado no primeiro dia do protocolo de tratamento dos animais, imediatamente antes do início da gavagem, e no oitavo dia imediatamente antes da realização dos experimentos. Os resultados referentes à pesagem dos animais foram expostos em percentual de variação de peso, segundo o seguinte cálculo:

$$\Delta P = [(PF - PI) / PI] \times 100$$

Sendo:

PF: peso em gramas no oitavo dia.

PI: peso em gramas no primeiro dia.

### 3.8 Procedimento Cirúrgico

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de xilazina (8mg/kg) e cloridrato de cetamina (90mg/kg) por via intraperitoneal. Após a perda dos reflexos de dor profunda, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica com os membros anteriores e posteriores fixados à mesa cirúrgica. O procedimento cirúrgico se inicia com incisão na linha interna da região da pata esquerda até a exposição da artéria e veia femoral. Após o acesso realizou-se a separação da artéria, veia e nervo e foi introduzido o catéter Mikro-Tip de pressão (modelo SPR-671, Millar Instruments, Houston TX), com auxílio do microscópio, na artéria femoral e foi progredido até alcançar a artéria aorta abdominal para medição da pressão arterial (PA). O catéter esteve conectado ao sistema PowerLab (AdInstruments, Austrália) para aquisição e processamento do sinal de PA. Para a administração *in bolus* dos agentes farmacológicos, foi realizada a exteriorização da veia femoral seguida de canulação (PE 10).

Em seguida foram colocados os eletrodos para captura do sinal eletrocardiográfico em que o eletrodo positivo foi posicionado próximo ao membro posterior esquerdo, o eletrodo negativo foi posicionado próximo ao membro anterior direito e o eletrodo neutro foi posicionado próximo ao membro posterior direito.

Foi respeitado um período de estabilização de 10 minutos antes da coleta dos dados iniciais. Foram então adquiridos 15 minutos de dados basais antes de iniciar o protocolo de avaliação do sistema autônomo (DE ANGELIS, SANTOS, IRIGOYEN, 2004).

### 3.9 Parâmetros Cardiovasculares

Antes de iniciar o procedimento cirúrgico, todos os equipamentos são preparados e inicializados, que inclui sistema PowerLab (AdInstruments, Austrália), computador, microscópio (modelo MC-M2222, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo), e o catéter Mikro-Tip de pressão (modelo SPR-671, Millar Instruments, Houston TX) calibrado.

Para a realização do eletrocardiograma (ECG) foi utilizado o sistema de aquisição Animal Bio Amp (AdInstruments, Austrália) conectado ao Sistema PowerLab, que registrou o ECG pela derivação DII, utilizando agulhas subcutâneas ligadas a eletrodos jacaré. Na análise dos dados, foram utilizados apenas 2 minutos de registro pois o software identifica os ciclos cardíacos no ECG a partir do QRS máximo e, em alguns pontos, principalmente nos animais infartados, o software não identificava corretamente, então, após verificar tais registros com problemas na identificação, padronizou-se um período de 2 minutos, para que fossem colhidos os dados em um intervalo de tempo que, mesmo que pequeno, não tivessem erros. Todos os registros foram verificados manualmente para se ter certeza da exatidão dos achados do software e exclusão dos erros.

A frequência cardíaca (FC) foi obtida pelo software LabChart v7.3.7 (AdInstruments, Austrália), que calculou-a a partir do ECG e da PA. Os parâmetros hemodinâmicos e eletrocardiográficos foram determinados no sistema LabChart v7.3.7 (AdInstruments, Austrália) utilizando os módulos *Blood pressure* v1.4 e *ECG Analysis* v2.4, respectivamente. Para cálculo dos parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca (VFC), utilizou-se o software Cardioseries versão 2.4.

### **3.10 Protocolo para avaliação do sistema autonômico**

Na avaliação dos barorreflexos, utilizaram-se doses crescentes e alternadas de fenilefrina (0,5; 1 e 2ug/kg) e o nitroprussiato de sódio (5, 10 e 20ug/kg). Em estudos com animais, a sensibilidade barorreflexa pode ser avaliada pela infusão de drogas como a fenilefrina e o nitroprussiato de sódio que induzem aumentos e quedas da PA e promovem bradicardia e taquicardia, respectivamente. Pelo menos três métodos de avaliação dessas respostas de FC à alterações da PA estão padronizados e são muito utilizados na literatura: a) o índice de sensibilidade, b) a regressão linear e, c) a curva sigmoíde (FARAH *et al.*, 1999; DE ANGELIS, SANTOS, IRIGOYEN, 2004).

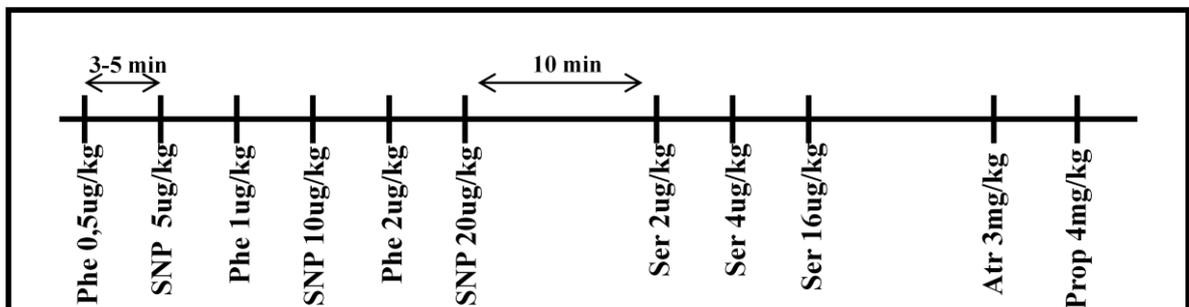
Em seguida, foi avaliado os receptores cardiopulmonares através do reflexo de Bezold-Jarisch com infusão de serotonina (2, 4 e 16ug/kg) com intervalos de até cinco minutos entre as doses. Os reflexos cardiopulmonares podem ser testados em animais pela injeção endovenosa de substâncias químicas (reflexo Bezold-Jarisch) como a serotonina,

provocando uma resposta bradicárdica e hipotensão, em decorrência da inibição reflexa da atividade simpática (bradicardia e vasodilatação) e parassimpática (bradicardia) (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; SANCHES *et al.*, 2009; MOSTARDA *et al.*, 2014).

Por último, foi avaliada a função do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático através do índice simpático-vagal (ISV) com uma dose de atropina (3mg/kg) seguida de uma dose de propranolol (4mg/kg), para obter a frequência cardíaca intrínseca (FCI) (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; DE ANGELIS, SANTOS, IRIGOYEN, 2004; SANCHES *et al.*, 2009; MOSTARDA *et al.*, 2014). O bloqueio farmacológico com atropina e propranolol pode ser utilizado tanto na experimentação animal quanto na clínica, para quantificar as influências desse sistema na frequência cardíaca e no débito cardíaco. O duplo bloqueio farmacológico permite a determinação da FCI e do ISV, que é calculado através da razão da FC basal e FCI. Um ISV > 1 significa um predomínio do tônus simpático sobre o parassimpático, e um ISV < 1 reflete um tônus vagal preponderante sobre o simpático. (GOLDBERGER, 1997; DE ANGELIS, SANTOS, IRIGOYEN, 2004).

Entre uma dose e outra foi respeitado o tempo de três a cinco minutos para estabilização da PA e FC. O volume máximo de infusão dos fármacos durante o protocolo foi de 0,1ml, de acordo com o peso corporal de cada animal. Entre os três protocolos autonômicos (barorreflexos, receptores cardiopulmonares e sistema nervoso autônomo) foi estabelecido um intervalo de 10 minutos para normalização dos parâmetros (Figura 01) (SANCHES *et al.*, 2009; MOSTARDA *et al.*, 2014).

**Figura 1** – Linha do tempo, protocolo de avaliação autonômica.



Fonte: LFPC – NPDM – UFC

### 3.11 Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial

A variabilidade da frequência cardíaca foi obtida a partir da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca registrada no Labchart v8.0.8, sendo utilizado 10 minutos de registro após os 10 minutos de estabilização para o cálculo das variabilidades. Os dados referentes ao tempo em segundos, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca foram transferidos para o Microsoft Excel 2013.

No Microsoft Excel 2013 foram realizados cálculos para filtrar a pressão arterial e a frequência cardíaca, para exclusão de valores discrepantes, que são os valores maiores ou menores do que a média acrescido ou diminuído, respectivamente, de dois desvios padrões. Para tal foi utilizada a seguinte fórmula no Microsoft Excel 2013:

$$\text{VARIÁVEL} = \text{SE}(\text{OU}(\text{VARIÁVEL} < (\text{MÉDIA} - \text{DP} * 2); \text{VARIÁVEL} > (\text{MÉDIA} + \text{DP} * 2)); \text{MÉDIA}; \text{VARIÁVEL})$$

Após a exclusão dos valores espúrios, foram utilizados os valores da FC para cálculo dos intervalos de pulso, utilizando-se a seguinte fórmula (MOURA, 2014).

$$\text{IP} = \frac{60}{\text{FC}} * 1000$$

Sendo:

IP: Intervalo de Pulso (ms)

FC: Frequência cardíaca (bpm)

Os dados da PAS, IP e tempo foram transferidos para um arquivo de texto (.txt), para, então, ser analisado pelo software CardioSeries v2.4, que calcula, a partir dos dados contidos no arquivo de texto, a VFC e VPA no domínio do tempo, fornecendo os parâmetros média, desvio padrão e variância para VPA, e média, desvio padrão, variância e RMSSD (*Root-Mean of square sucessive NN interval difference*) para a VFC.

No domínio da frequência os componentes de onda foram divididos em muito baixa frequência (MBF), com largura de banda variando entre 0,02 a 0,2Hz, baixa frequência (BF), que vai de 0,2 a 0,8Hz e alta frequência (AF), que vai de 0,8 a 3Hz, sendo esses valores de

largura de banda já descritos previamente (FAZAN *et al.*, 2008; STAUSS *et al.*, 2009). Os parâmetros obtidos no domínio da frequência foram os valores absolutos e percentuais das bandas MBF, BF e AF, para a VPA e VFC, além da razão BF/AF para a VFC.

A densidade espectral foi obtida por meio da transformada rápida de Fourier e o tamanho do segmento foi fixado em 512 pontos com 50% de sobreposição (FAZAN *et al.*, 2008).

### 3.12 Duplo produto

Para avaliação do trabalho do miocárdio foi utilizado o duplo produto (DPT), que é obtido a partir da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca na seguinte fórmula (WHITE, 1999; FORNITANDO; GODOY, 2006; MOURA, 2014).

$$DPT = PAS * FC$$

Sendo: DPT: Duplo produto (mmHg.bpm)

PAS: Pressão arterial sistólica (mmHg)

FC: Frequência Cardíaca (bpm)

O DPT vem sendo reconhecido como um relevante parâmetro para avaliar a função ventricular (FORNITANO; GODOY, 2006) e o consumo miocárdico de oxigênio (WHITE, 1999; GOBEL *et al.*, 1978), sendo um alto DPT relacionado com uma boa função ventricular e baixa chance de coronariopatia obstrutiva (FORNITANO; GODOY, 2006).

### 3.13 Avaliação da Extensão do Infarto

O coração foi retirado logo após a coleta dos dados de avaliação do sistema autônomo, e lavado duas vezes em solução salina 0,9% à 37°C para retirar o sangue das câmaras cardíacas. Em seguida o órgão foi congelado por 30 minutos para permitir um corte mais preciso da

peça, que era realizado transversalmente com lâmina. As fatias de dois milímetros de espessura então eram colocados em 3ml de Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC), numa concentração de 1%, previamente aquecido à 37°C durante 20 minutos. Após a coloração os cortes eram retirados da solução e colocados em 10ml de formol 10% tamponado para aumentar o contraste da área infartada (CHRASTINA *et al.*, 2014).

Para fotografar os cortes, utilizou-se o microscópio (modelo MC-M2222, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo) com um aumento de 10 vezes, acoplado à uma câmera digital, onde os cortes foram mantidos com a face apical voltada para baixo, em fundo preto e submersos em água para evitar reflexos luminosos. Foi padronizado o posicionamento das peças com o ventrículo direito voltado para direita (CHRASTINA *et al.*, 2014).

As imagens foram armazenadas no formato BMP com um tamanho de 1024x768 pixels. Nas imagens, com o auxílio do software ImageJ, foram marcadas então a área cardíaca total e a área infartada e analisadas sequencialmente. Para expressar o valor final a área infartada foi dividida pelo valor da área cardíaca total e multiplicada pelo peso da fatia, em seguida esse valor foi somado ao valor das demais fatias do coração (CHRASTINA *et al.*, 2014).

### **3.14 Análise estatística**

As variáveis quantitativas (contínuas e discretas) foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana e o intervalo interquartil (dados não paramétricos). Comparações entre os quatro grupos (Controle, ISO, OEAz e EOAz+ISO) foram realizadas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre grupos aos pares (dados paramétricos), ou pelo teste Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas). Na análise da variação da frequência cardíaca e da pressão arterial média induzida pela estimulação do reflexo cardiopulmonar pela serotonina, comparações entre as diferentes doses de serotonina dentro do mesmo grupo foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre as doses aos pares (dados

paramétricos), ou o teste de Friedman, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas). Para comparar os grupos ISO e OEAZ+ISO em relação à extensão do infarto, utilizou-se o teste *t* para dados não emparelhados.

Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor *P* menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.00 para Windows<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

### 3. 15 Fármacos e Reagentes

Todos os fármacos e reagentes utilizados, neste estudo, foram provenientes da Sigma Aldrich (fenilefrina, nitroprussiato de sódio, serotonina, propanolol, atropina, isoproterenol, cloreto de trifeniltetrazolium). Os anestésicos utilizados na pesquisa (cetamina e xilazina) eram da marca Syntec.

Para avaliação autonômica foram preparadas soluções dos seguintes fármacos para administração intravenosa:

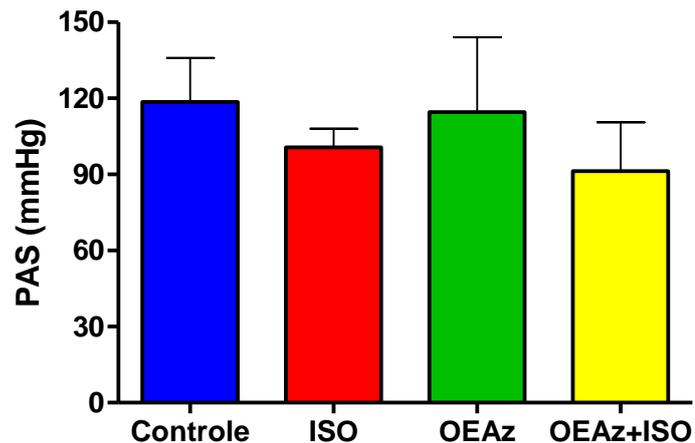
- Fenilefrina: 3 soluções de 1,45ug/ml, 2,9ug/ml e 5,8ug/ml cada.
- Nitroprussiato de sódio: 3 soluções de 14,5ug/ml, 29ug/ml e 58ug/ml cada.
- Serotonina: 3 soluções de 5,8ug/ml, 11,6ug/ml e 46,4ug/ml cada.
- Atropina: 1 solução de 3,75mg/ml.
- Propanolol: 1 solução de 5mg/ml.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros Cardiovasculares

A figura 2 mostra os valores da pressão arterial sistólica (PAS) nos quatro grupos. Embora a análise de variância tenha evidenciado diferenças significantes entre os quatro grupos ( $F = 3,1651$ ;  $P = 0,0399$ ), ao se compararem os grupos aos pares, por meio do teste de comparações múltiplas de Tukey, tais diferenças não foram confirmadas ( $P > 0,05$ ).

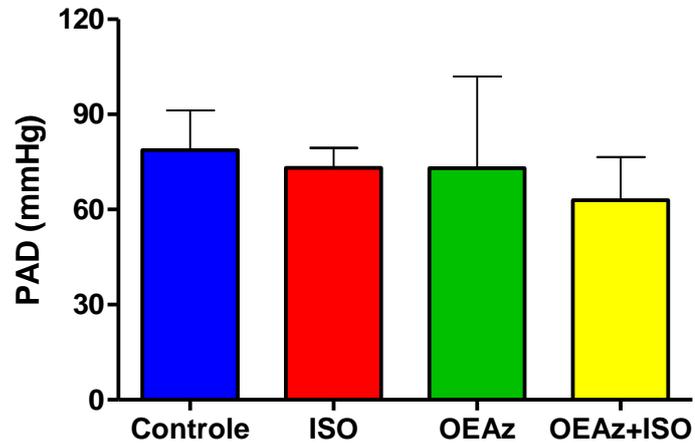
**Figura 2** – Pressão arterial sistólica (PAS), em mmHg, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo.



Fonte: LFPC – NPDM – UFC

Os dados referentes à pressão arterial diastólica (PAD) estão evidenciados na figura 3. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA:  $F = 1,1318$ ;  $P = 0,3532$ ).

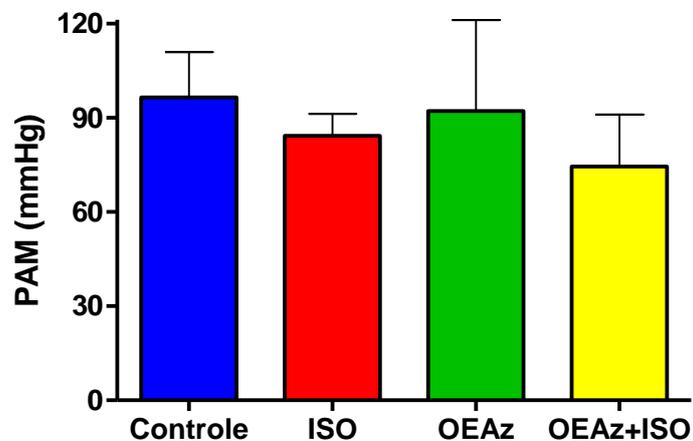
**Figura 3** – Pressão arterial diastólica (PAD), em mmHg, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A pressão arterial média (PAM) dos grupos estudados está relatada na figura 4. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA:  $F = 2,1773$ ;  $P = 0,1130$ ).

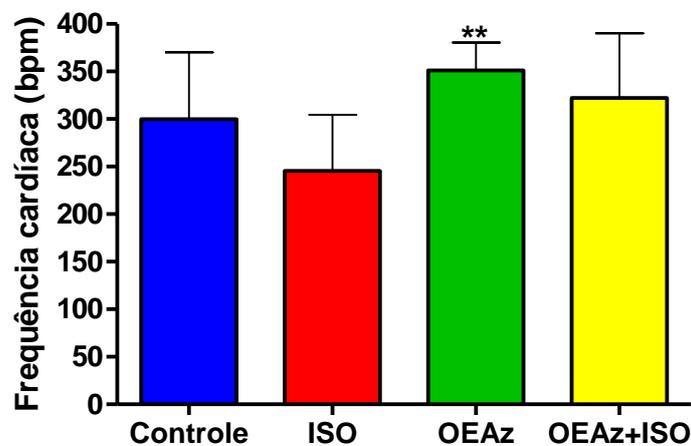
**Figura 4** – Pressão arterial média (PAM), em mmHg, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Os dados relativos aos valores da frequência cardíaca (FC) estão dispostos na figura 5. Constatou-se que a FC verificada no grupo OEAz foi significativamente maior ( $P < 0,01$ ) que a FC observada no grupo ISO.

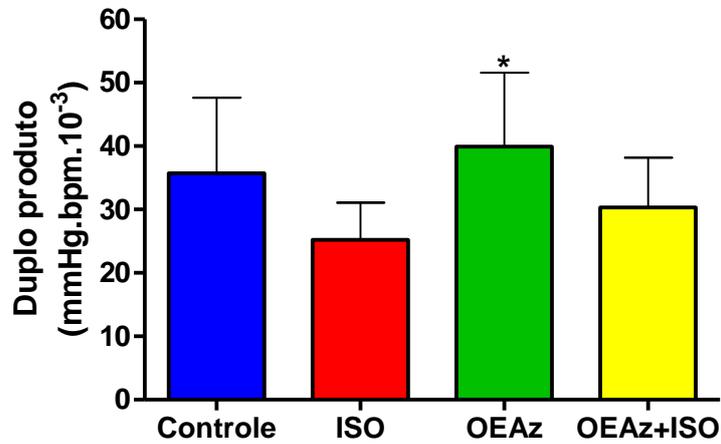
**Figura 5** – Frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm), mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo. (\*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo ISO).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Os valores obtidos do duplo produto (DP), que mostram o trabalho cardíaco, estão expressos na figura 6. Constatou-se que o DP verificado no grupo OEAz foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que o DP observado no grupo ISO.

**Figura 6** – Avaliação do trabalho cardíaco, por meio da determinação do duplo produto (DP - mmHg.bpm. $10^{-3}$ ), nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo. (\* $P < 0,05$  comparado com o grupo ISO).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Uma tabela foi criada para exibição em conjunto dos dados da avaliação cardiovascular (tabela 2). Houve diferença estatisticamente significativa nos valores de FC e DP do grupo OEAz comparados ao ISO ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente). Em relação à PAS, embora a ANOVA tenha evidenciado diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos ( $P = 0,0399$ ), quando os grupos foram comparados aos pares, por meio do teste de comparações múltiplas de Tukey, tais diferenças não foram confirmadas ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 2** – Parâmetros cardiovasculares pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), frequência cardíaca (FC) e duplo produto (DP) mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados correspondem às medições efetuadas em 8 ratos em cada grupo.

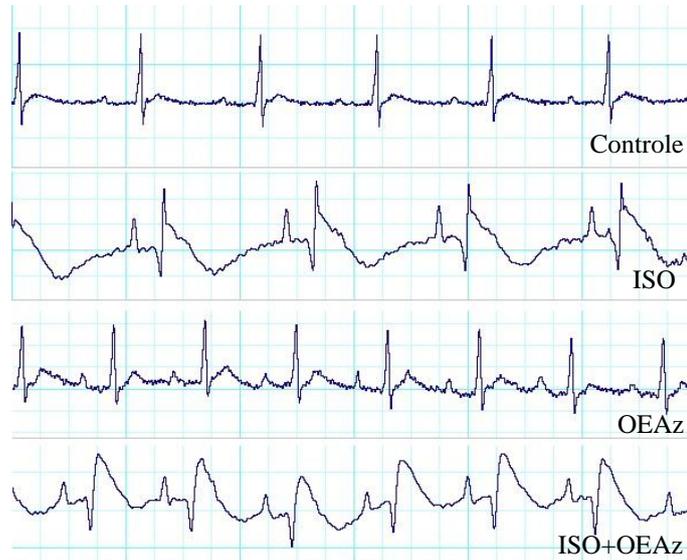
Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância (ANOVA)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
PAS (mmHg)	118,51 ± 17,39	100,65 ± 7,36	114,58 ± 29,52	91,33 ± 19,20	<b>P = 0,0399*</b>
PAD (mmHg)	78,75 ± 12,49	73,12 ± 6,36	73,05 ± 28,94	62,98 ± 13,61	P = 0,3532
PAM (mmHg)	96,49 ± 14,42	84,33 ± 6,89	92,12 ± 29,02	74,50 ± 16,51	P = 0,1130
FC (bpm)	299,84 ± 70,22	245,42 ± 59,04	351,07 ± 29,29 <sup>a</sup>	322,10 ± 68,19	<b>P = 0,0098</b>
DP (mmHg.bpm.10 <sup>-3</sup> )	35,72 ± 11,89	25,20 ± 5,89	39,93 ± 11,63 <sup>b</sup>	30,32 ± 7,88	<b>P = 0,0278</b>

<sup>a</sup>(P < 0,01) e <sup>b</sup>(P < 0,05) em relação ao grupo ISO (teste de Tukey). \*Diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos ANOVA (P = 0,0399), tais diferenças não foram confirmadas no teste Tukey (P > 0,05).

#### 4.2 Parâmetros Eletrocardiográficos

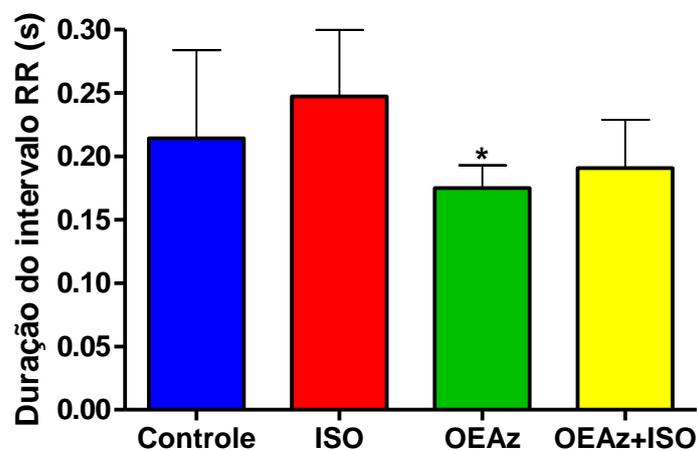
A figura 7 mostra os traçados eletrocardiográficos obtidos nos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO, respectivamente. Podemos observar que os grupos infartados (ISO e OEAz+ISO) apresentam supradesnivelamento de ST, além de onda T invertida e onda Q profunda.

**Figura 7** – Traçado eletrocardiográfico obtido nos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO.



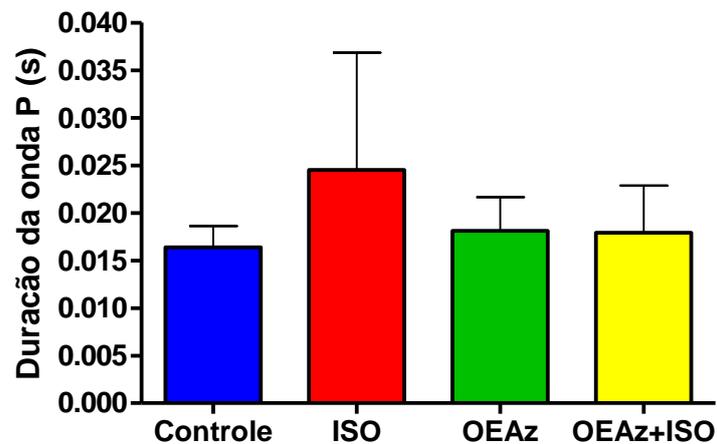
Na figura 8 estão apresentados os dados relativos ao intervalo RR. Constatou-se que a duração do intervalo RR verificada no grupo OEAz ( $P < 0,05$ ) foi significativamente menor que a observada no grupo ISO.

**Figura 8** – Duração do intervalo RR, em segundos, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 8, 6, 8 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\* $P < 0,05$  comparado ao grupo ISO).



A figura 9 mostra os dados referentes à duração da onda P. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA:  $F = 2,0744$ ;  $P = 0,1281$ ).

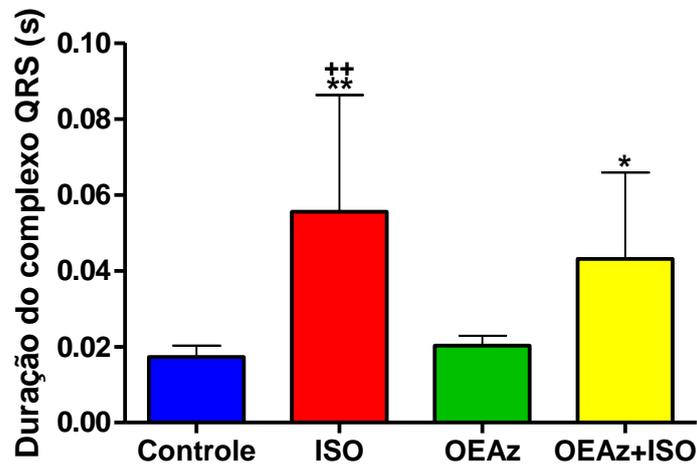
**Figura 9** – Duração da onda P, em segundos, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 8, 6, 8 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Os valores da duração do complexo QRS estão dispostos na figura 10. Constatou-se que a duração do complexo QRS verificada nos grupos ISO ( $P < 0,01$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,05$ ) foi significativamente maiores que a observada no grupo Controle. Igualmente, a duração do complexo QRS referente ao grupo ISO ( $P < 0,01$ ) foi significativamente maior que a relativa ao grupo OEAz.

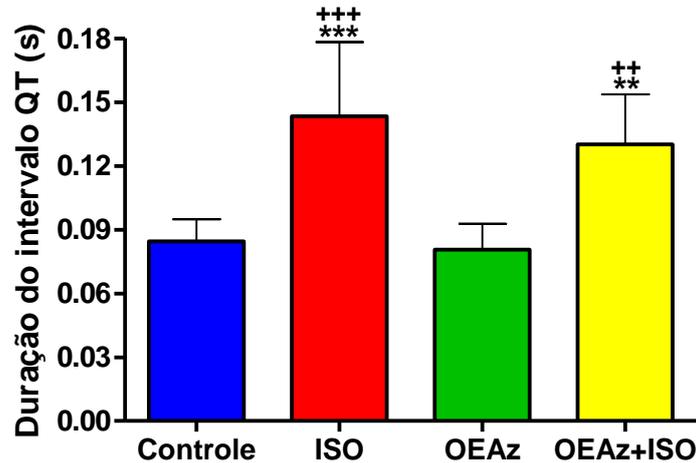
**Figura 10** – Duração do complexo QRS, em segundos, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 8, 6, 8 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\*\*P < 0,01 ISO comparado com Controle, \*P < 0,05 OEAz+ISO comparado com Controle e ++P < 0,01 ISO comparado com OEAz).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A figura 11 mostra a duração do intervalo QT. Constatou-se que a duração do intervalo QT verificada nos grupos ISO ( $P < 0,001$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,01$ ) foi significativamente maior que a observada no grupo Controle. Igualmente, a duração do intervalo QT referente aos grupos ISO ( $P < 0,01$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,01$ ) foi significativamente maior que a relativa ao grupo OEAz.

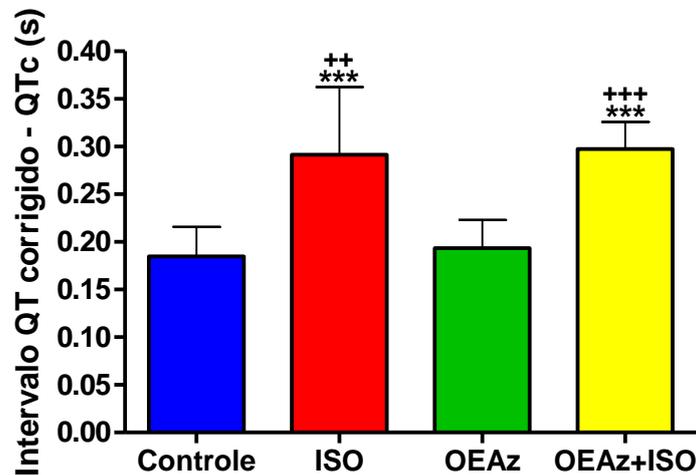
**Figura 11** – Duração do intervalo QT, em segundos, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 7, 6, 7 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\*\*P < 0,001 ISO comparada com Controle, \*\*P < 0,01 OEAz+ISO comparada com Controle, +++P < 0,01 grupo ISO comparado com OEAz, ++P < 0,01 OEAz+ISO comparada com OEAz.)



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

O intervalo QT corrigido está representado na figura 12. Constatou-se que a duração do intervalo QTc verificada nos grupos ISO ( $P < 0,001$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,001$ ) foi significativamente maior que a observada no grupo Controle. Igualmente, a duração do intervalo QTc referente aos grupos ISO ( $P < 0,01$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,001$ ) foi significativamente maior que a relativa ao grupo OEAz.

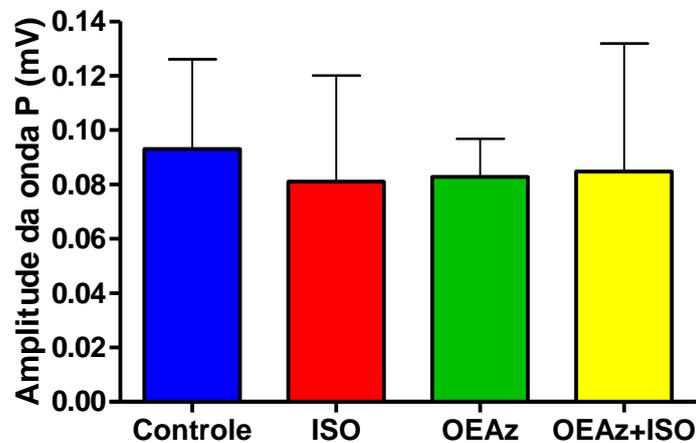
**Figura 12** – Intervalo QT corrigido (QTc), em segundos, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 7, 6, 7 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\*\*P < 0,001 ISO comparado com Controle, ++P < 0,01 ISO comparado com OEAz, +++P < 0,001 OEAz+ISO comparado com OEAz).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A amplitude da onda P é evidenciada na figura 13. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA:  $F = 0,1717$ ;  $P = 0,9146$ ).

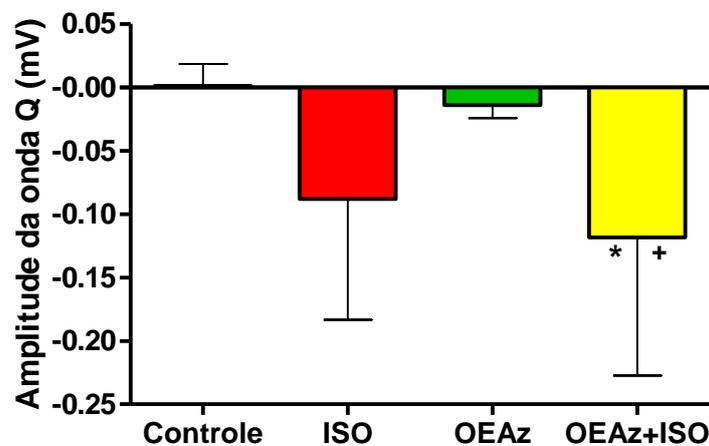
**Figura 13** – Amplitude da onda P, em milivolts, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão, respectivamente, em 8, 6, 8 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Na figura 14 pode-se observar a amplitude da onda Q. Constatou-se que a onda Q verificada no grupo OEAz+ISO foi significativamente mais profunda que as observadas nos grupos Controle ( $P < 0,05$ ) e OEAz ( $P < 0,05$ ).

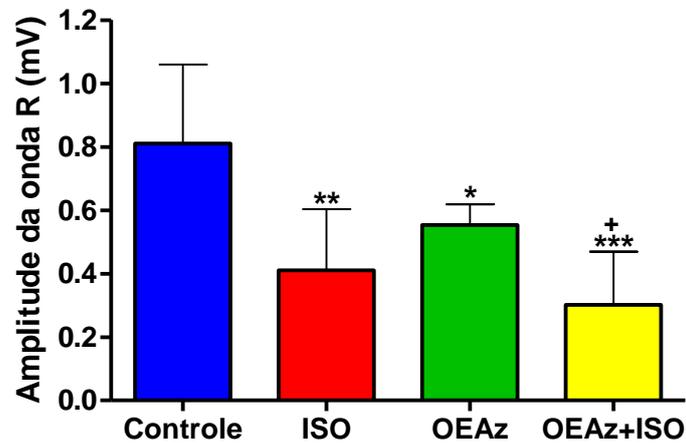
**Figura 14** – Amplitude da onda Q, em milivolts, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 8, 6, 8 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\* $P < 0,05$  em relação ao Controle e + $P < 0,05$  em relação ao OEAz).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A amplitude da onda R está representada na figura 15. Constatou-se que a amplitude da onda R verificada nos grupos ISO ( $P < 0,01$ ), OEAz ( $P < 0,05$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,001$ ) foi significativamente menor que a observada no grupo Controle. Igualmente, a amplitude da onda R referente ao grupo OEAz+ISO ( $P < 0,05$ ) foi significativamente maior que a relativa ao grupo OEAz.

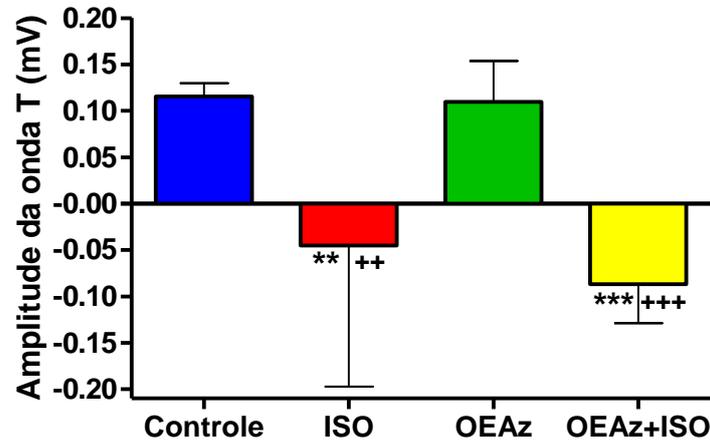
**Figura 15** – Amplitude da onda R, em milivolts, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 8, 6, 8 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\*\*P < 0,01), (\*P < 0,05) e (\*\*P < 0,001) em relação ao Controle e (+P < 0,05) em relação ao OEAz.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A figura 16 mostra a amplitude da onda T. Constatou-se que a onda T verificada nos grupos ISO ( $P < 0,01$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,001$ ) foi invertida e com amplitude significativamente menor que a observada no grupo Controle. Igualmente, a onda T referente aos grupos ISO ( $P < 0,01$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,05$ ) foi invertida e com amplitude significativamente menor que a relativa ao grupo OEAz.

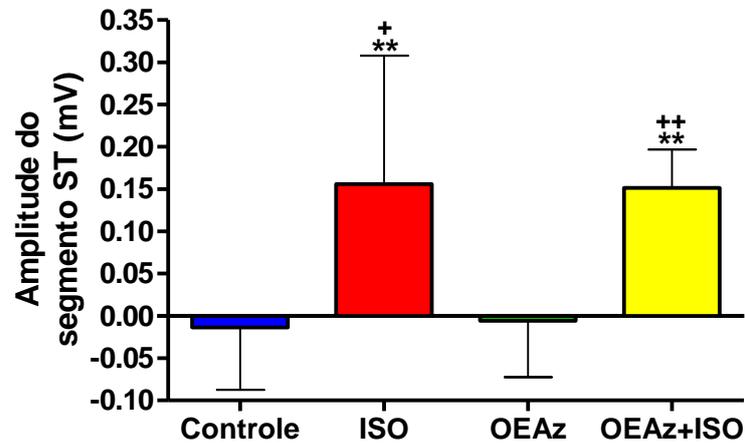
**Figura 16** – Amplitude da onda T, em milivolts, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 7, 6, 7 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\*\*P < 0,01) e OEAz+ISO (\*\*P < 0,001) quando comparados com Controle e ISO (++P < 0,01) e OEAz+ISO (+++P < 0,05) quando comparados com OEAz.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A amplitude do segmento ST está exposta na figura 17. Constatou-se um supradesnivelamento significativo do segmento ST nos grupos ISO ( $P < 0,01$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo Controle. Igualmente, houve um supradesnivelamento significativo do segmento ST nos grupos ISO ( $P < 0,05$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo OEAz.

**Figura 17** – Amplitude do segmento ST, em milivolts, mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas, respectivamente, em 8, 6, 8 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. ISO (\*\*P < 0,01) e OEAz+ISO (\*\*P < 0,01) quando comparados com o Controle e ISO (+P < 0,05) e OEAz+ISO (++P < 0,01) quando comparados com OEAz.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Em relação aos dados eletrocardiográficos, foram dispostos separadamente nas figuras 6 a 15 e agrupadas na tabela 3. Na tabela podemos verificar que apenas não houve significância estatística entre os grupos nas variáveis Duração da onda P e Amplitude da onda P. O intervalo RR também não mostrou valor de  $P < 0,05$ , mas o valor foi marginalmente significativo ( $P = 0,0524$ ).

**Tabela 3** – Parâmetros eletrocardiográficos mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO.

Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	(ANOVA)
Intervalo RR (s)	0,214 ± 0,070 (n = 8)	0,247 ± 0,053 <sup>f</sup> (n = 6)	0,175 ± 0,018 (n = 8)	0,191 ± 0,038 (n = 8)	<b>P = 0,0524</b>
Duração da onda P (s)	0,016 ± 0,002 (n = 8)	0,025 ± 0,012 (n = 6)	0,018 ± 0,004 (n = 8)	0,018 ± 0,005 (n = 8)	P = 0,1281
Complexo QRS (s)	0,017 ± 0,003 (n = 8)	0,056 ± 0,031 <sup>b,e</sup> (n = 8)	0,020 ± 0,003 (n = 8)	0,043 ± 0,023 <sup>c</sup> (n = 8)	<b>P = 0,0011</b>
Intervalo QT (s)	0,084 ± 0,010 (n = 7)	0,143 ± 0,035 <sup>a,d</sup> (n = 6)	0,081 ± 0,012 (n = 7)	0,130 ± 0,024 <sup>b,e</sup> (n = 8)	<b>P &lt; 0,0001</b>
QTc (s)	0,185 ± 0,031 (n = 7)	0,291 ± 0,071 <sup>a,e</sup> (n = 6)	0,194 ± 0,030 (n = 7)	0,298 ± 0,028 <sup>a,d</sup> (n = 8)	<b>P &lt; 0,0001</b>
Amplitude da onda P (mV)	0,093 ± 0,033 (n = 8)	0,081 ± 0,039 (n = 6)	0,083 ± 0,014 (n = 8)	0,085 ± 0,047 (n = 8)	P = 0,9146
Amplitude da onda Q (mV)	0,001 ± 0,017 (n = 8)	-0,088 ± 0,095 (n = 6)	-0,014 ± 0,010 (n = 8)	-0,118 ± 0,109 <sup>c,f</sup> (n = 8)	<b>P = 0,0068</b>
Amplitude da onda R (mV)	0,810 ± 0,249 (n = 8)	0,411 ± 0,193 <sup>b</sup> (n = 6)	0,554 ± 0,065 <sup>c</sup> (n = 8)	0,302 ± 0,168 <sup>a,f</sup> (n = 8)	<b>P &lt; 0,0001</b>
Amplitude da onda T (mV)	0,115 ± 0,014 (n = 7)	-0,045 ± 0,152 <sup>b,e</sup> (n = 6)	0,110 ± 0,044 (n = 7)	-0,087 ± 0,042 <sup>a,d</sup> (n = 8)	<b>P &lt; 0,0001</b>
Amplitude segmento ST (mV)	-0,013 ± 0,074 (n = 8)	0,156 ± 0,152 <sup>b,f</sup> (n = 6)	-0,006 ± 0,067 (n = 8)	0,151 ± 0,045 <sup>b,e</sup> (n = 8)	<b>P = 0,0004</b>

<sup>a</sup>(P<0,001), <sup>b</sup>(P<0,01) e <sup>c</sup>(P<0,05) em relação ao grupo Controle. <sup>d</sup>(P<0,001), <sup>e</sup>(P<0,01) e <sup>f</sup>(P<0,05 em relação ao grupo OEAz).

### 4.3 Variabilidade da frequência cardíaca

#### 4.3.1 Domínio do tempo

Analisando os parâmetros da VFC no domínio do tempo observou-se uma diferença significativa na média, quando se comparam os quatro grupos por ANOVA, tal diferença foi confirmada, pelo teste de Tukey, nos grupos OEAz ( $P < 0,01$ ) e OEAz+ISO ( $P < 0,05$ ), sendo, ambos, significativamente menores que a média observada no grupo ISO. Não foram observadas diferenças significantes no desvio padrão, variância e RMSSD, conforme pode-se verificar na tabela 4.

**Tabela 4:** Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados correspondem às medições efetuadas em 8 ratos em cada grupo.

Parâmetro*	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância
Média (ms)	209,21 ± 55,28	249,31 ± 51,14	172,75 ± 13,10 <sup>a</sup>	183,25 ± 29,18 <sup>b</sup>	<b>P = 0,0040</b>
Desvio padrão (ms)	4,94 ± 3,32	4,50 ± 3,50	4,89 ± 5,33	4,16 ± 2,85	P = 0,9741
Variância (ms <sup>2</sup> )	34,08 ± 40,64	31,01 ± 40,74	48,78 ± 85,40	24,34 ± 30,26	P = 0,8282
RMSSD (ms)	4,02 ± 2,85	5,12 ± 4,04	2,38 ± 1,33	3,62 ± 3,17	P = 0,3537

DP: desvio padrão. ANOVA: Análise de variância. \*Média, desvio padrão e variância do intervalo de pulso. RMSSD (root mean square of the successive differences): raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos de pulso sucessivos. As letras <sup>a</sup>( $P < 0,01$ ) e <sup>b</sup>( $P < 0,05$ ) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo ISO (teste de Tukey).

#### 4.3.2 Domínio da frequência

Com relação ao domínio da frequência, observou-se uma diferença estatisticamente significativa no componente de BF tanto em valor absoluto (tabela 5), quanto em valor percentual (tabela 6), quando comparados os quatro grupos, porém tal diferença só foi confirmada comparando-se os grupos aos pares no componente de BF em valor percentual, o qual os grupos OEAz e OEAz+ISO apresentaram percentual do componente de BF significativamente menor que o do grupo ISO ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 5:** Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (FC) no domínio da frequência, expressos em valores absolutos, mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados correspondem às medições efetuadas em 8 ratos em cada grupo.

Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância Kruskal-Wallis
	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	
Muito baixa frequência ( $\text{ms}^2$ )	0,55 (0,14 – 4,14)	0,26 (0,06 – 3,91)	0,11 (0,05 – 2,80)	0,29 (0,06 – 3,76)	$P = 0,7070$
Baixa frequência (BF) ( $\text{ms}^2$ )	0,74 (0,23 – 8,85)	1,23 (0,44 – 5,41)	0,19 (0,10 – 0,37)	0,24 (0,10 – 1,86)	<b><math>P = 0,0395^*</math></b>
Alta frequência (AF) ( $\text{ms}^2$ )	4,49 (1,34 – 7,74)	5,48 (0,71 – 11,5)	1,33 (1,03 – 2,43)	1,38 (0,95 – 6,43)	$P = 0,3834$
Razão BF/AF	0,22 (0,13 – 0,96)	0,44 (0,25 – 1,08)	0,14 (0,10 – 0,23)	0,19 (0,11 – 0,25)	$P = 0,0542$

IQ: intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75). \*Embora o teste de Kruskal-Wallis tenha evidenciado diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos ( $P = 0,0395$ ), quando os grupos foram comparados aos pares, por meio do teste de comparações múltiplas de Dunn, tais diferenças não foram confirmadas ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 6:** Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (FC) no domínio da frequência, expressos em termos percentuais, mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados correspondem às medições efetuadas em 8 ratos em cada grupo.

Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	(ANOVA)
Muito baixa frequência (%)	16,13 ± 15,72	7,375 ± 7,170	13,25 ± 13,30	15,13 ± 11,32	P = 0,4977
Baixa frequência (%)	19,00 ± 13,97	30,75 ± 18,53	10,88 ± 4,55 <sup>a</sup>	10,88 ± 4,19 <sup>a</sup>	<b>P = 0,0073</b>
Alta frequência (%)	65,00 ± 25,52	61,38 ± 18,61	75,38 ± 17,34	74,13 ± 13,78	P = 0,4026

<sup>a</sup>(P<0,05) denota diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo ISO (teste de Tukey).

#### 4.4 Variabilidade da pressão arterial sistólica

##### 4.4.1 Domínio do tempo

Avaliando a tabela 7, pode-se observar que os parâmetros no domínio do tempo não tiveram uma diferença estatisticamente significativa quando comparados por ANOVA.

**Tabela 7:** Parâmetros da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) no domínio do tempo mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados correspondem às medições efetuadas em 8 ratos em cada grupo.

Parâmetro*	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	(ANOVA)
Média (mmHg)	117,46 ± 15,67	101,07 ± 7,20	113,64 ± 29,12	92,52 ± 19,17	P = 0,0590
Desvio padrão (mmHg)	3,73 ± 2,58	2,31 ± 0,70	3,73 ± 2,22	2,25 ± 0,95	P = 0,1818
Variância (mmHg <sup>2</sup> )	19,74 ± 29,68	5,758 ± 3,41	18,22 ± 22,66	5,83 ± 4,92	P = 0,2921

DP: desvio padrão. ANOVA: Análise de variância. \*Média, desvio padrão e variância da PAS.

#### 4.4.2 Domínio da frequência

Analisando os parâmetros do domínio da frequência em valores absolutos (Tabela 8), pode-se uma diferença estatisticamente significativa com relação a banda de AF quando comparados pelo teste de Kruskal Wallis (P=0,0378), porém tal diferença só se confirmou no grupo OEAz, que é significativamente maior que a observada no grupo ISO.

**Tabela 8:** Parâmetros da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) no domínio da frequência, expressos em valores absolutos, mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados correspondem às medições efetuadas em 8 ratos em cada grupo.

Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância
	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Kruskal-Wallis
Muito baixa frequência (mmHg <sup>2</sup> )	0,92 (0,54 – 1,10)	0,16 (0,08 – 0,77)	0,58 (0,33 – 0,80)	0,57 (0,42 – 1,40)	P = 0,1370
Baixa frequência (mmHg <sup>2</sup> )	0,33 (0,20 – 1,77)	0,63 (0,31 – 1,53)	0,25 (0,11 – 0,69)	0,21 (0,13 – 0,42)	P = 0,3302
Alta frequência (mmHg <sup>2</sup> )	3,13 (0,66 – 6,36)	0,80 (0,58 – 1,35)	3,70 (2,50 – 5,19) <sup>a</sup>	1,41 (1,09 – 3,85)	<b>P = 0,0378</b>

IQ: intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75). <sup>a</sup>(P < 0,05) denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ISO (teste de Dunn).

Quando se analisou os dados no domínio da frequência em valores percentuais (Tabela 9), observou-se uma diferença estatisticamente significativa no percentual das bandas BF (P=0,0282) e AF (0,0407), quando comparados os quatro grupos por ANOVA. Quando foi realizado as comparações entre pares pelo teste de Tukey, observou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas no grupo OEAz, que foi significativamente menor que o grupo ISO, com relação ao percentual de BF, e foi significativamente maior que o grupo ISO, com relação ao percentual de AF.

**Tabela 9:** Parâmetros da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) no domínio da frequência, expressos em termos percentuais, mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados correspondem às medições efetuadas em 8 ratos em cada grupo.

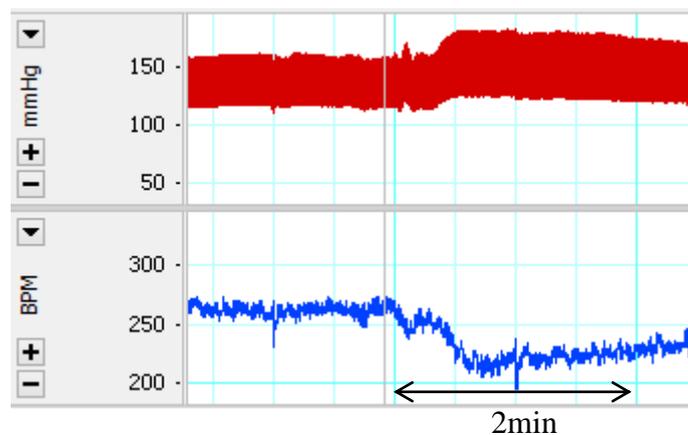
Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância (ANOVA)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Muito baixa frequência (%)	21,63 ± 16,52	12,38 ± 11,07	13,25 ± 7,686	24,38 ± 13,64	P = 0,1705
Baixa frequência (%)	18,00 ± 15,00	35,50 ± 29,30	7,75 ± 5,47 <sup>a</sup>	13,38 ± 14,06	<b>P = 0,0282</b>
Alta frequência (%)	60,38 ± 27,07	44,63 ± 25,29	79,25 ± 9,74 <sup>a</sup>	62,25 ± 23,94	<b>P = 0,0407</b>

DP: desvio padrão; ANOVA: Análise de variância. <sup>a</sup>(P < 0,05) denota diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo ISO (teste de Tukey).

#### 4.5 Parâmetros Autonômicos

A figura 18 mostra o efeito bradicárdico e de aumento da PA causado pela administração intravenosa de fenilefrina (2ug/kg) na PA e FC.

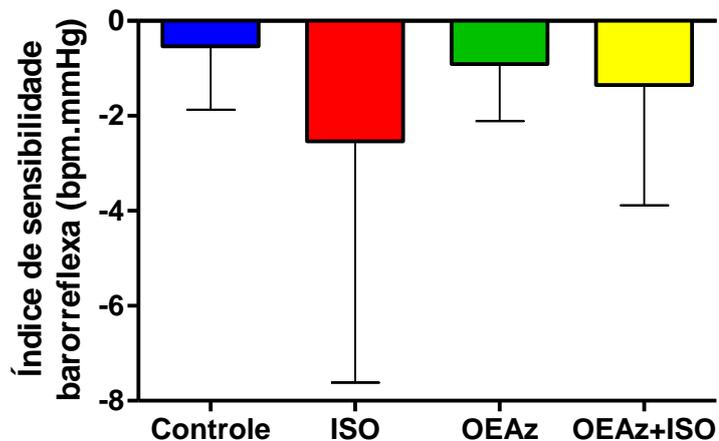
**Figura 18** – Efeito da fenilefrina 2ug/kg (escala de tempo 30 segundos o quadrado pequeno).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A figura 19 mostra a bradicardia relativas à sensibilidade do barorreflexo com administração de fenilefrina. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA:  $F = 0,6808$ ;  $P = 0,5712$ ).

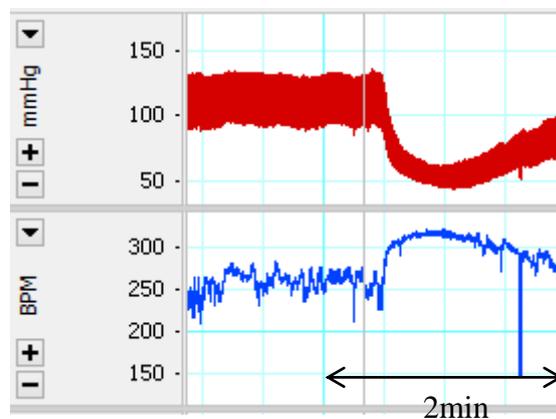
**Figura 19** – Avaliação da bradicardia barorreflexa nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO, conforme o índice de sensibilidade barorreflexa, expresso em bpm/mmHg. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas 8 ratos de cada grupo.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A figura 20 mostra o efeito taquicárdico e hipotensor da infusão intravenosa de nitroprussiato na dose de 20ug/kg.

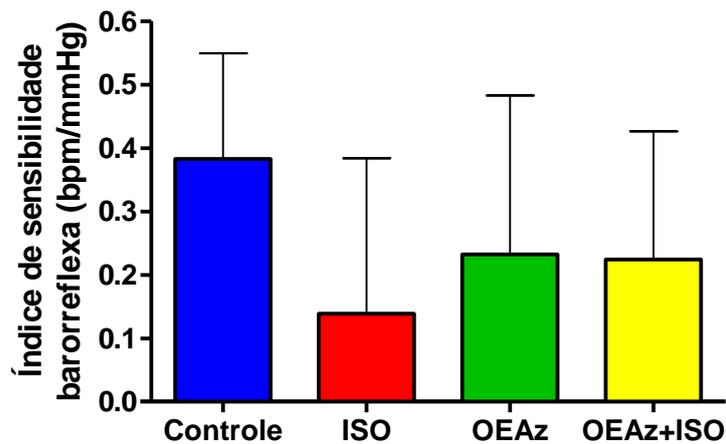
**Figura 20** – Efeito do nitroprussiato 20ug/kg.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A figura 21 mostra a taquicardia relativas à sensibilidade do barorreflexo com administração de nitroprussiato. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA:  $F = 1,7215$ ;  $P = 0,1853$ ).

**Figura 21** – Avaliação da taquicardia barorreflexa nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO, conforme o índice de sensibilidade barorreflexa, expresso em bpm/mmHg. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas 8 ratos de cada grupo.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A tabela 10 agrupa os dados referentes à taquicardia e bradicardia barorreflexa. Não houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos.

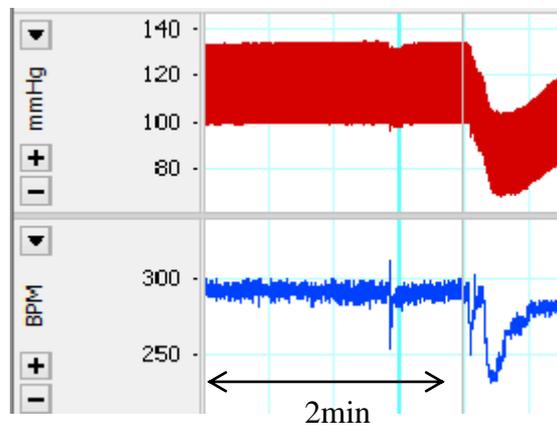
**Tabela 10** – Avaliação da sensibilidade barorreflexa (bradicardia e taquicardia reflexas) nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO conforme o índice de sensibilidade barorreflexa, expresso em bpm/mmHg.

Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	(ANOVA)
Bradicardia barorreflexa (bpm/mmHg)	-0,54 ± 1,34	-2,54 ± 5,08	-0,911 ± 1,20	-1,35 ± 2,53	P = 0,5712
Taquicardia barorreflexa (bpm/mmHg)	-0,38 ± 0,17	-0,14 ± 0,24	-0,23 ± 0,25	-0,22 ± 0,20	P = 0,1853

DP: desvio padrão; ANOVA: Análise de variância.

A figura 22 mostra o efeito bradicárdico e hipotensor da serotonina (16ug/kg) administrada por via intravenosa.

**Figura 22** – Efeito da serotonina 16ug/kg.



**Fonte:** LFPC – NPDM - UFC

Os dados descritos na tabela 11 mostram os valores da variação PAM do reflexo cardiopulmonar (Bezold-Jarisch) estimulados por serotonina em doses sequenciais e crescentes. Embora a ANOVA tenha evidenciado diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos ( $P = 0,0439$ ), quando os grupos foram comparados aos pares, por meio do teste de comparações múltiplas de Tukey, tais diferenças não foram confirmadas ( $P > 0,05$ ). Observa-se diferença estatística significativa na segunda dose de serotonina (4ug/kg) quando comparada às demais doses dentro do mesmo grupo (Grupo OEAz <sup>a</sup> $P < 0,05$  e Grupo OEAz+ISO <sup>b</sup> $P < 0,001$ ).

**Tabela 11** – Variação da pressão arterial média, expressa em mmHg, induzida pela estimulação do reflexo cardiopulmonar (Bezold-Jarisch) pela serotonina nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO.

Dose de serotonina	Controle Média ± DP (n = 7)	ISO Média ± DP (n = 8)	OEAz Média ± DP (n = 8)	OEAz+ISO Média ± DP (n = 8)	Significância (ANOVA1)
2 µg/kg	-33,08 ± 16,06 (n = 7)	-20,24 ± 12,49 (n = 8)	-37,34 ± 22,03 (n = 8)	-34,39 ± 13,16 (n = 8)	P = 0,1906
4 µg/kg	-21,25 ± 21,09 (n = 7)	-6,47 ± 3,74 (n = 8)	-16,65 ± 9,65 <sup>a</sup> (n = 7)	-13,15 ± 8,91 <sup>b</sup> (n = 8)	P = 0,1452
16 µg/kg	-24,71 ± 14,96 (n = 7)	-9,09 ± 11,52 (n = 8)	-16,49 ± 11,23 <sup>a</sup> (n = 7)	-9,66 ± 6,16 <sup>b</sup> (n = 8)	<b>P = 0,0439*</b>
Significância (ANOVA2)	P = 0,2641	P = 0,0626	<b>P = 0,0076</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>	

<sup>a</sup>(P < 0,05) e <sup>b</sup>(P < 0,001) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação à dose de 2 µg/kg no mesmo grupo (teste de Tukey).

A tabela 12 mostra os valores da variação FC no reflexo cardiopulmonar (Bezold-Jarisch) estimulados por serotonina em doses sequenciais e crescentes. As letras <sup>a</sup>(P < 0,05) e <sup>b</sup>(P < 0,05) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos Controle e OEAz, respectivamente (teste de Tukey). As letras <sup>c</sup>(P < 0,05) e <sup>d</sup>(P < 0,01) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação à dose de 2 µg/kg do mesmo grupo, enquanto a letra <sup>e</sup>(P < 0,01) corresponde a diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 4 µg/kg do mesmo grupo (teste de Tukey).

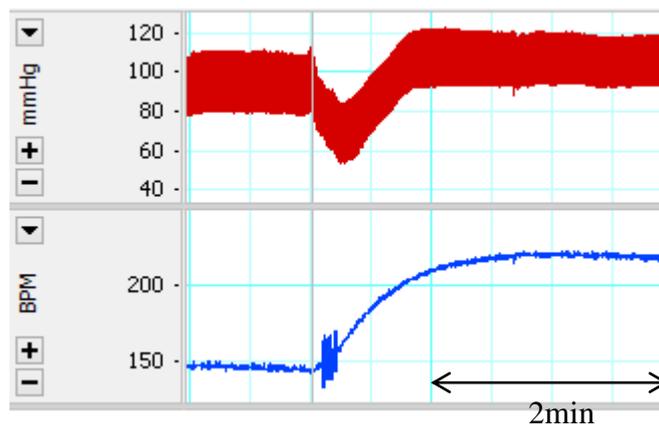
**Tabela 12** – Variação da frequência cardíaca, expressa em bpm, do reflexo cardiopulmonar (Bezold-Jarisch) nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO.

Dose de serotonina	Controle Média ± DP (n = 7)	ISO Média ± DP (n = 8)	OEAz Média ± DP (n = 8)	OEAz+ISO Média ± DP (n = 8)	Significância (ANOVA1)
2 µg/kg	-9,32 ± 25,46 (n = 7)	-0,10 ± 4,64 (n = 8)	0,81 ± 17,58 (n = 8)	-6,37 ± 21,90 <sup>a,b</sup> (n = 8)	P = 0,6775
4 µg/kg	-6,18 ± 19,49 (n = 7)	-8,67 ± 15,41 (n = 8)	-15,89 ± 11,80 (n = 7)	1,27 ± 4,03 (n = 8)	P = 0,1393
16 µg/kg	-44,29 ± 28,86 <sup>c,e</sup> (n = 7)	-18,45 ± 21,83 <sup>c</sup> (n = 8)	-48,34 ± 28,29 <sup>d</sup> (n = 7)	-9,49 ± 8,78 (n = 8)	<b>P = 0,0061</b>
Significância (ANOVA2)	<b>P = 0,0047</b>	<b>P = 0,0379</b>	<b>P = 0,0063</b>	P = 0,3101	

<sup>c</sup>(P < 0,05) e <sup>d</sup>(P < 0,01) estatisticamente significantes em relação à dose de 2 µg/kg do mesmo grupo, <sup>e</sup>(P < 0,01) estatisticamente significativa em relação à dose de 4 µg/kg do mesmo grupo (teste de Tukey).

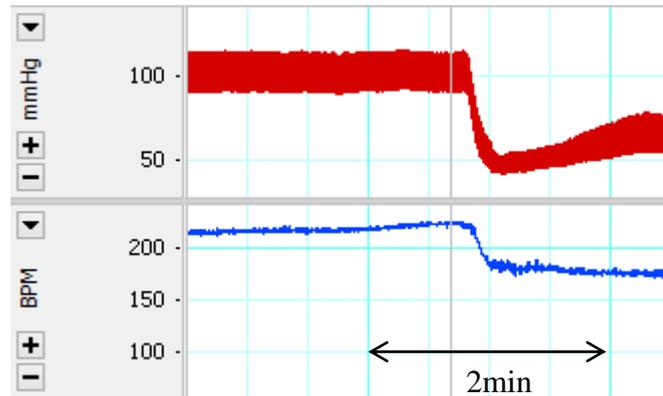
As figuras 23 e 24 mostram o efeito da administração intravenosa de atropina (3mg/kg) e propranolol (4mg/kg), respectivamente, na PA e FC.

**Figura 23** – Efeito da atropina 3mg/kg.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

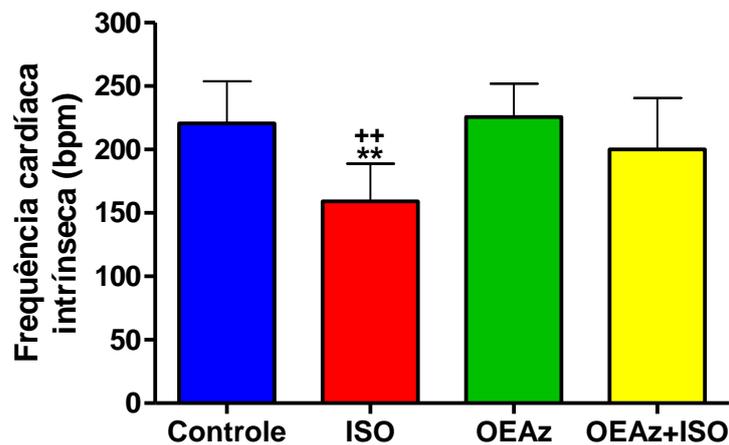
**Figura 24** – Efeito do propranolol 4mg/kg.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Os resultados da FCI estão dispostos na figura 25. Constatou-se que a FCI verificada no grupo ISO foi significativamente menor que a mensurada no grupo Controle ( $P < 0,01$ ) e no grupo OEAz ( $P < 0,01$ ).

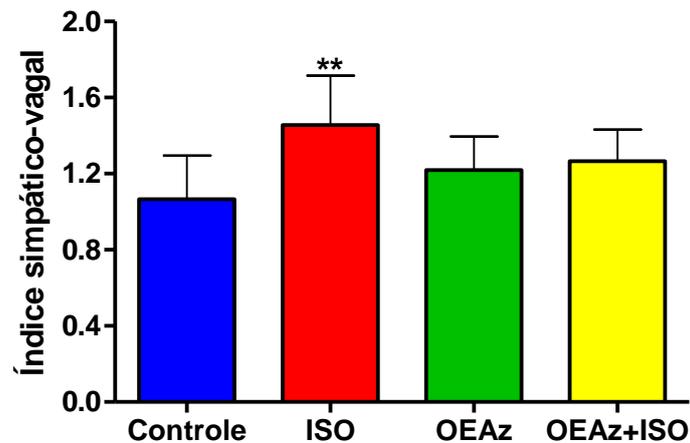
**Figura 25** – Frequência cardíaca intrínseca (FCI), em batimentos por minuto (bpm), mensurada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão, respectivamente, em 7, 8, 6 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\*\* $P < 0,01$  comparado com o Controle e ++ $P < 0,01$  no grupo OEAz).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

A figura 26 mostra os dados relacionados com o ISV. Constatou-se que o índice simpático-vagal verificado no grupo ISO foi significativamente maior que o mensurado no grupo Controle ( $P < 0,01$ ).

**Figura 26** – Avaliação do balanço autonômico simpático-vagal nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO conforme o índice simpático-vagal cardíaco. Dados expressos como média e desvio padrão, respectivamente, em 7, 8, 6 e 8 ratos dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. (\*\* $P < 0,01$  comparado com o Controle).



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

Os dados referentes à FCI e ISV foram agrupados na tabela 13. As letras <sup>a</sup>( $P < 0,05$ ) e <sup>b</sup>( $P < 0,01$ ) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle enquanto a letra <sup>c</sup>( $P < 0,01$ ) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ISO.

**Tabela 13** – Parâmetros da avaliação do controle autonômico mensurados nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO.

Parâmetro	Controle	ISO	OEAz	OEAz+ISO	Significância (ANOVA)
	Média ± DP (n = 7)	Média ± DP (n = 8)	Média ± DP (n = 6)	Média ± DP (n = 8)	
Frequência cardíaca intrínseca (bpm)	220,55 ± 33,44 (n = 7)	159,24 ± 29,68 <sup>a</sup> (n = 8)	225,52 ± 26,44 <sup>c</sup> (n = 6)	200,13 ± 40,60 (n = 8)	<b>P = 0,0031</b>
Índice simpático-vagal	1,07 ± 0,23 (n = 7)	1,46 ± 0,26 <sup>b</sup> (n = 8)	1,22 ± 0,18 (n = 6)	1,27 ± 0,17 (n = 8)	<b>P = 0,0150</b>

<sup>a</sup>( $P < 0,05$ ) e <sup>b</sup>( $P < 0,01$ ) diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, <sup>c</sup>( $P < 0,01$ ) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ISO (teste de Tukey).

#### 4.6 Área Cardíaca Infartada

A figura 27 mostra as fotos dos cortes dos corações dos animais dos quatro grupos coradas com TTC, evidenciando as áreas de infarto (hipocrômicas) nos grupos ISO e OEAz+ISO. Nos grupos Controle e OEAz não foi observada área hipocrômica, evidenciando ausência de áreas isquêmicas. As áreas mais claras no grupo ISO foram mais localizadas do que no grupo OEAz+ISO onde essas áreas se mostraram difusas no corte do tecido.

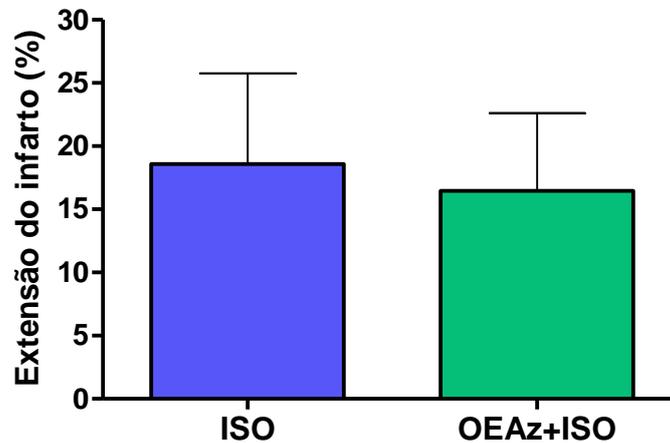
**Figura 27** –Extensão do infarto.



**Fonte:** LFPC – NPDM - UFC

Em relação à extensão do IAM a figura 28 mostra que não houve significância ( $P = 0,5344$ ) entre os grupos ISO ( $18,58 \pm 7,17\%$ ) e OEAz+ISO ( $16,45 \pm 6,15\%$ ).

**Figura 28** – Avaliação da extensão do infarto, expressa em termos percentuais, nos animais dos grupos ISO e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo. Comparações entre os dois grupos foram feitas por meio do teste *t* para dados não emparelhados. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



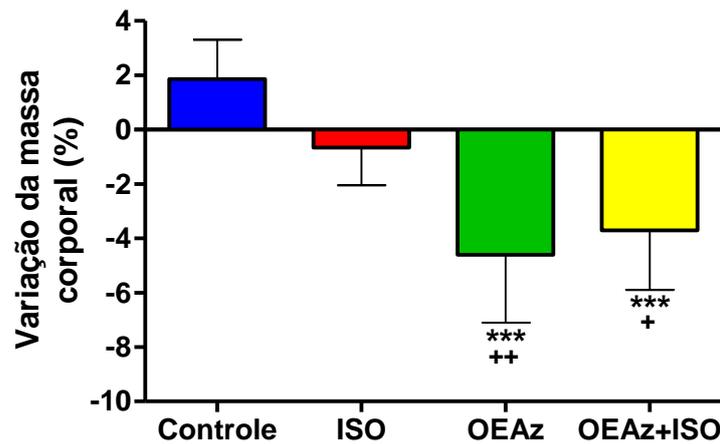
Fonte: LFPC – NPDM - UFC

#### 4.7 Massa Corporal e Cardíaca

Em relação à variação da massa corporal durante o período de tratamento (figura29) constatou-se uma perda de peso significativa (\*\*P < 0,001) nos animais dos grupos OEAz (-4,61 ± 2,49%) e OEAz+ISO (-3,71 ± 2,19%) em relação ao grupo Controle (1,86 ± 1,45%). Igualmente, houve uma redução significativa da massa corporal nos grupos OEAz (-4,61 ± 2,49%; \*\*P < 0,01) e OEAz+ISO (-3,71 ± 2,19%; \*P < 0,05) em relação ao grupo ISO (-0,66 ± 1,39%). \*\*\* (P < 0,001) em relação ao Grupo Controle. + (P < 0,05) e ++ (P < 0,01) em relação ao grupo ISO.

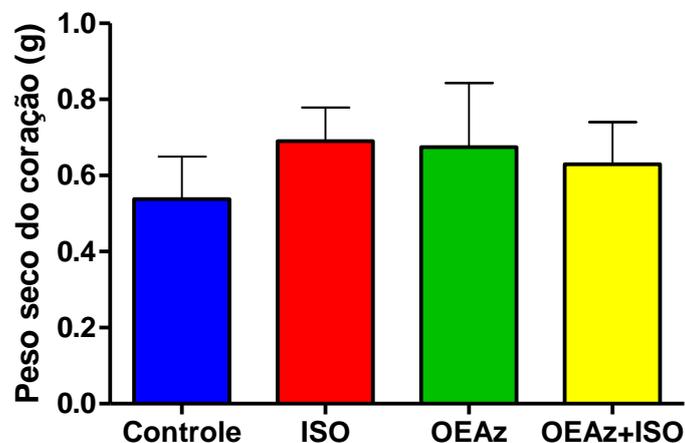
Na figura 20 não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle (0,54 ± 0,11 g), ISO (0,69 ± 0,09 g), OEAz (0,67 ± 0,17 g) e OEAz+ISO (0,63 ± 0,11 g) em relação ao peso seco do coração (ANOVA: F = 2,2773; P = 0,1032).

**Figura 29** – Variação da massa corporal, em termos percentuais, verificada nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo. Comparações entre os quatro grupos foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. (\*\*\*) $P < 0,001$  em relação ao grupo Controle. +(P < 0,05) e ++(P < 0,01) em relação ao grupo ISO.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

**Figura 30** – Peso seco do coração, em gramas, verificado nos animais dos grupos Controle, ISO, OEAz e OEAz+ISO. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos de cada grupo. Comparações entre os quatro grupos foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.



Fonte: LFPC – NPDM - UFC

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisados os efeitos do OEAz na função cardiovascular e autonômica em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol. A *Alpinia zerumbet* é uma planta da família *Zingiberaceae*, popularmente conhecida como colônia, utilizada no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e da ansiedade. Tal planta tem sido largamente estudada em relação as suas propriedades farmacológicas. Estudos pré-clínicos, principalmente com o OEAz, demonstraram ações hipotensoras, vasodilatadoras, antioxidantes, diuréticas, antinociceptivas, antiespasmódicas, entre outras, representando, uma planta com grande potencial farmacológico a ser explorado (CUNHA *et al.*, 2013).

A composição dos óleos essenciais geralmente se trata de uma série de compostos com uma ou duas substâncias majoritárias. Acredita-se que haja uma vantagem terapêutica no tratamento com fitoterápicos, pois as diferentes substâncias que o compõem podem agir de maneira sinérgica e potencializar o efeito desejado (SIMÕES; SPITZER, 1999; BRASIL, 2008).

Nesta pesquisa, não houve pré tratamento com nenhuma substância isolada, pois objetivou-se verificar o efeito da substância fitoterápica em sua totalidade, visando uma possível futura inserção dessa substância no tratamento de pacientes. Estudos apontam que a procura por agentes naturais que exerçam seus efeitos sobre o sistema cardiovascular é uma área em expansão com grande potencial para o descobrimento de novas moléculas (MAHMOOD *et al.*, 2010; TIRAPELLI *et al.*, 2010).

O modelo de indução do IAM utilizado no presente estudo foi através da administração de isoproterenol subcutâneo em ratos. Esse é um modelo bastante utilizado no meio científico, pois causa uma lesão no miocárdio semelhante à que ocorre em seres humanos (ITHAYARASI; DEVI, 1997). Um dos mecanismos causadores da lesão é a autooxidação de catecolaminas que produzem uma série de radicais livres altamente citotóxicos, além do aumento da atividade de enzimas lisossômicas. Vários estudos utilizam esse modelo para avaliar o efeito de diversas substâncias nos padrões bioquímicos, funcionais e histopatológicos decorrentes do IAM (ENGLE *et al.*, 2009; GEORGE; LINER; HOIT, 2010). A mortalidade do modelo experimental de infarto nos animais no presente estudo foi baixa comparada ao estudo de Lobo Filho (2011) que foi de 11% no grupo ISO e 20% no grupo OEAz+ISO.

## 5.1 Parâmetros Cardiovasculares

Avaliando as pressões arteriais sistólica, diastólica e média, podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparados os quatro grupos, como podemos observar nas figuras 2, 3 e 4, respectivamente. Entretanto, analisando a tabela 1, podemos observar que houve uma diferença estatisticamente significante entre a PAS dos quatro grupos, além de apresentar uma queda não significante nos grupos ISO e OEAZ+ISO. Tal resultado não era esperado, pois já havia sido comprovado anteriormente o efeito hipotensivo do OEAZ (LAHLOU *et al.*, 2002a; LAHLOU *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2013), entretanto, tais estudos foram realizados utilizando modelos de hipertensão (LAHLOU *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2013), ou em ratos normotensos com OEAZ administrado por via intravenosa (LAHLOU *et al.*, 2002a), portanto este foi primeiro estudo a verificar o efeito do OEAZ, administrado por gavagem, na pressão arterial de ratos normais ou com IAM.

Alguns estudos demonstram que o IAM está relacionado à hipotensão, tanto em humanos (GRASSI; MANCIA, 1994) quanto em animais. Mill *et al.* (1997) observaram hipotensão em ratos avaliados com 30 dias de infarto, assim como Koike *et al.* (1996) com 8 dias pós infarto. Outros autores também observaram taquicardia e hipotensão nos animais com 1 e 10 dias após IAM (MILL *et al.*, 1991; MEYRELLES; CABRAL; VASQUEZ, 1994a; LACERDA, 2000). De Angelis *et al.* (2001) demonstraram reduzida PA e FC em animais com 8 semanas de IM. Essa hipotensão arterial poderia ser atribuída a algum grau de comprometimento do coração isquêmico, e conseqüentemente redução do débito cardíaco e/ou a redução da atividade simpática periférica sobre os vasos de resistência.

Na análise da frequência cardíaca (Figura 5) observamos uma diminuição no grupo ISO, quando comparado com o grupo OEAZ. Por um lado, tal resultado não era esperado, pois, em estudos anteriores, já foram observados efeito cronotrópico negativo do OEAZ em átrio isolado (SANTOS *et al.*, 2011) e em ratos normotensos anestesiados, quando administrado OEAZ *in bolus* (LAHLOU *et al.*, 2002a), no entanto não foram encontrados estudos avaliando o efeito do OEAZ, administrado por gavagem na FC de ratos normais ou com IAM. Por outro, estudos com modelo de IAM mostram que nesse tipo de lesão há uma diminuição na FC desses animais quando comparados ao controle (MILL *et al.*, 1991; MEYRELLES; CABRAL; VASQUEZ, 1994a).

Avaliando o duplo produto (Figura 6), observou-se uma diferença estatisticamente significativa quando se comparam os quatro grupos, porém tal diferença só foi confirmada no grupo OEAz, que é significativamente maior que o DPT observado no grupo ISO. Tal diferença se deve, provavelmente, principalmente a frequência cardíaca, pois a FC esteve aumentada nos animais do grupo OEAz e não houve diferenças significantes na PAS. O DPT é um parâmetro não invasivo que reflete o consumo de oxigênio pelo miocárdio (GOBEL *et al.*, 1978; WHITE *et al.*, 1999; FORNITANO; GODOY, 2006), e uma diminuição deste parâmetro em repouso está relacionado a um menor risco de problemas cardiovasculares (FORJAZ, 1998; TERRA, 2008), pois, como já visto anteriormente, o infarto agudo do miocárdio está ligado à oferta e ao consumo de oxigênio pelo coração, se tal consumo está aumentado, existe um risco maior acidentes isquêmicos cardíacos.

## 5.2 Parâmetros Eletrocardiográficos

O eletrocardiograma (ECG) é um exame que se baseia no registro da diferença de potencial na pele resultante da despolarização e repolarização do músculo cardíaco (LEVICK, 1995) sendo um dos principais dados clínicos no diagnóstico e prognóstico do IAM (TIMERMAN; FEITOSA, 2003; AMAN; VAIBHAV; BALARAMAN, 2012), além de ser amplamente utilizado em pesquisa para avaliar o efeito de drogas em modelos animais de IAM (PATEL *et al.*, 2010; SORAYA, 2012; AMAN; VAIBHAV; BALARAMAN, 2012; LI *et al.*, 2012; YOUSEFI, 2013; DERBALI *et al.*, 2015).

Analisando a figura 8, pode-se observar que o intervalo RR foi significativamente menor no grupo OEAz que o grupo ISO, tal resultado reflete diretamente na FC, que, como já discutido anteriormente, foi significativamente maior no grupo OEAz quando comparada com o grupo ISO.

Quando se avaliou a duração e amplitude da onda P (Figuras 9 e 13, respectivamente) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando comparados os quatro grupos. A onda P é decorrente da despolarização do átrio (LEVICK, 1995). Clinicamente, alterações na onda P não são comumente utilizadas no diagnóstico de IAM, no entanto, já foi observado diminuição na duração da onda P em ratos com IAM induzido por isoproterenol (PATEL *et al.*, 2012; AMAN; VAIBHAV; BALARAMAN, 2012).

A duração do complexo QRS (Figura 10) foi significativamente maior no grupo ISO, quando comparado com os grupos Controle e OEAz, e significativamente maior no grupo OEAz+ISO, quando comparado com o grupo Controle. Comparando-se o grupo OEAz+ISO com o grupo ISO, observa-se que o primeiro teve uma média da duração do QRS um pouco menor que o segundo, porém tal diferença não foi significativa. O complexo QRS indica a despolarização dos ventrículos, portanto um alargamento do complexo QRS indica algum distúrbio na condução do impulso pelos ventrículos, isso ocorre geralmente quando os ventrículos estão dilatados ou hipertrofiados (GUYTON; HALL, 2006). Tal resultado do grupo ISO foi contraditório com resultados encontrados em outros trabalhos, que mostram uma diminuição do complexo QRS nos animais com IAM induzido por isoproterenol (PATEL *et al.*, 2012; AMAN; VAIBHAV; BALARAMAN, 2012). Portanto, a administração subcutânea de isoproterenol (150 mg/kg), provavelmente devido a um edema ventricular, aumentou a duração do complexo QRS e o pré-tratamento com o OEAz (100mg/kg) não foi capaz de prevenir tal dano cardíaco de maneira significativa.

O intervalo QT varia de acordo com a frequência cardíaca, portanto, deve-se corrigir o intervalo QT (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2004), existem diversos meios para realizar tal correção, sendo a fórmula de Bazett o método utilizado para correção do QT neste trabalho. Assim, será utilizado apenas o QT corrigido (QTc) para discussão. Analisado a figura 12, podemos observar uma diferença estatisticamente significantes no intervalo QTc nos grupos ISO e OEAz+ISO, sendo ambos maiores que os observados nos grupos Controle e OEAz. O intervalo QT representa o tempo gasto na despolarização e repolarização ventricular (SILVA, 2009), e pode estar aumentado em uso de algumas drogas antiarrítmicas, alguns distúrbios eletrolíticos (hipopotassemia, hipomagnesemia e hipocalcemia), algumas doenças neurológicas e o infarto agudo do miocárdio (MARTINELLI FILHO *et al.*, 1994). Estudos anteriores mostraram um aumento do intervalo QT e QTc em animais infartados com isoproterenol (PATEL *et al.*, 2012; AMAN; VAIBHAV; BALARAMAN, 2012). Com isso, pode-se afirmar que o pré-tratamento com OEAz não foi capaz de prevenir o aumento do intervalo QT em ratos infartados.

Com relação a amplitude da onda Q (Figura 14), observamos uma onda Q profunda nos grupos ISO e OEAz+ISO, porém tal diferença só foi significativa no grupo OEAz+ISO, que teve onda Q significativamente mais profunda que os grupos Controle e OEAz. A onda Q patológica significa um ponto não elétrico no ventrículo, o que geralmente ocorre devido à uma necrose após um infarto agudo do miocárdio (MANSUR *et al.*, 2006; TIMERMAN;

FEITOSA, 2003). O resultado encontrado foi diferenciado, pois o grupo OEAz+ISO apresentou uma onda Q significativamente mais profunda que os grupos Controle e OEAz, enquanto o grupo ISO, apesar de ter apresentado uma onda Q profunda, tal resultado não estatisticamente significativo. Tal fato pode ter sido observado devido a um aumento na área de infarto no grupo OEAz+ISO, pois, visto que a onda Q é profunda devido a uma área eletricamente inativa no músculo cardíaco, quanto mais profunda a onda Q, maior pode ser a área infartada.

Analisando a amplitude da onda R (figura 15), observa-se uma redução significativa nos grupos ISO e OEAz, quando comparados com o grupo Controle, e no grupo OEAz+ISO, quando comparado com os grupos Controle e OEAz. A diminuição da onda R pode significar um edema do miocárdio causado pelo isoproterenol (SORAYA *et al.*, 2012; YOUSEFI *et al.*, 2013). Observa-se, então, que além dos grupos ISO e OEAz+ISO, o grupo OEAz também apresentou uma diminuição da amplitude da onda R. Verifica-se também, que o grupo OEAz+ISO apresentou a menor amplitude, apesar de a diferença, quando comparado com o grupo ISO, não seja significativa. A redução da amplitude da onda R no grupo ISO já era esperada, pois já foi observada em estudos anteriores (PATEL *et al.*, 2012; YOUSEFI *et al.*, 2013) A diminuição da onda R no grupo OEAz pode ter sido observada devido a um efeito inotrópico negativo já observado anteriormente em átrio isolado (SANTOS, 2011). Com isso observa-se que o OEAz, por si só, já diminui a amplitude da onda R, portanto a ação conjunta do OEAz com o dano causado pelo IAM leva a uma redução mais significativa da amplitude da onda R no grupo OEAz+ISO.

Em relação a onda T (figura 16), pode-se observar que os grupos infartados (ISO e OEAz+ISO) apresentaram inversão de onda T, sendo essa significativamente menor nesses grupos que nos grupos Controle e OEAz. Alterações na onda T podem ocorrer inicialmente, onda T amplas, positivas, pontiagudas, ou tardiamente, ocorrendo a inversão da onda T, que pode ocorrer até após a normalização do segmento ST (MANSUR *et al.*, 2006). Sendo assim, pode-se afirmar que o pré-tratamento com OEAz não foi capaz de prevenir tal alteração eletrocardiográfica.

Com relação a amplitude do segmento ST (figura 17), observa-se um supradesnivelamento de ST nos grupos ISO e OEAz+ISO, quando comparados com os grupos Controle e OEAz. O supradesnivelamento de ST é um dos sinais iniciais no infarto agudo do miocárdio, e um dos achados eletrocardiográficos mais consistentes na fase aguda do infarto

(BRAUNWALD *et al.*, 2012; MANSUR *et al.*, 2006). Diversos trabalhos associam o aumento do segmento ST a IAM induzido por isoproterenol em ratos (DERBALI *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2010; YOUSEFI *et al.*, 2013; SORAYA *et al.*, 2012; AMAN; VAIBHAV; BALARAMAN, 2012). Sendo esse um dos principais sinais de IAM encontrados no eletrocardiograma, e tendo em vista que o pré-tratamento com OEAz não foi capaz de revertê-lo, pode-se afirmar que o pré-tratamento com a droga avaliada não foi capaz de prevenir o IAM no modelo estudado.

### 5.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial Sistólica

O estudo da variabilidade cardiovascular em seres humanos com insuficiência cardíaca, tem revelado o enorme potencial dos parâmetros de variabilidade como preditores de morbidade mortalidade, assim como do prognóstico desses pacientes (KLEIGER *et al.*, 1987; MORTARA *et al.*, 1994; VAN DE BORNE *et al.*, 1997; SZABO *et al.*, 1997; GALINIER *et al.*, 2000; LA ROVERE *et al.*, 2003; KUCH *et al.*, 2009). Porém, as razões que explicam como essas variáveis influenciam as alterações causadas pelo infarto, são muito pouco entendidas. Assim sendo, a caracterização das alterações da variabilidade cardiovascular no modelo de IAM em ratos, seria de grande valor.

Quanto à VFC no domínio do tempo (Tabela 4), observou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas na média. Uma alta VFC, medida pela variância e pelo desvio padrão do IP, significa uma boa adaptação, caracterizando indivíduos com um SNA eficiente, enquanto uma baixa VFC significa uma adaptação anormal ou insuficiente, sendo considerada um fator preditivo de mortalidade em pacientes com IAM (LOMBARDI *et al.*, 1987; LA ROVERE *et al.*, 1998; VANDERLEI *et al.*, 2009). Não foram observadas, neste trabalho, diferenças significativas entre as variâncias e desvios padrões do IP dos grupos estudados.

Com relação ao domínio da frequência (Tabela 5 e 6), observou-se uma redução significativa do percentual dos componentes de BF dos grupos OEAz e OEAz+ISO quando comparados com o grupo ISO. Observa-se ainda que os percentuais em tais grupos foram menores que o grupo Controle e que o grupo ISO apresentou um percentual de BF maior que o grupo Controle, apesar de tais resultados não serem significantes. A banda de AF

corresponde a um indicador de ativação vagal, enquanto o componente de BF é decorrente de uma ação conjunta simpática e parassimpática (ASKELROD, 1981; PAGANI, 1986; MALLIANI, 1991; PAGANI, 1997; LOPES, 2013), porém, com predomínio do sistema simpático, dessa forma, a diminuição do componente de BF, associado a uma tendência à diminuição da razão BF/AF nos grupos OEAz e OEAz+ISO sugerem uma diminuição da ação do sistema nervoso simpático sobre o coração nos grupos tratados com o OEAz. Sinais de ativação simpática exacerbada são frequentemente observados em pacientes com IAM (LOMBARDI *et al.*, 1987). Já foi observado que um aumento da ação simpática sobre o coração aumenta a mortalidade em pacientes com IAM (KLEIGER *et al.*, 1987; LA ROVERE *et al.*, 1998; SHEN *et al.*, 2014). Portanto, o pré-tratamento com OEAz, possivelmente, diminui o risco pós IAM, pois causa uma diminuição da modulação simpática sobre o coração.

Com relação a VPAS no domínio do tempo (Tabela 7) não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas, apesar de ter-se detectado uma tendência na diminuição da variância dos grupos ISO e OEAz+ISO. Foi observado anteriormente que um aumento do desvio padrão da PAS aumenta a mortalidade cardiovascular (KIKUYA *et al.*, 2000).

Quanto a VPAS no domínio da frequência observou-se uma diferença significativa no grupo OEAz, que teve uma diminuição do percentual do componente de BF, além de um aumento do valor percentual e absoluto do componente de AF, quando comparado com o grupo ISO. Além disso, nota-se uma diminuição do percentual da banda de BF e um aumento da de AF do grupo OEAz+ISO quando comparado com o grupo ISO, porém tal diferença não foi significativa pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. É conhecido que o componente de AF na VPAS reflete oscilações na pressão causadas por movimentos respiratórios (JULIEN *et al.*, 1995), e o componente de BF da VPAS coincide com as ondas de Mayer, as ondas lentas da pressão arterial, sendo considerado um marcador da atividade simpática vasomotora periférica modulada pelos barorreceptores (JANUÁRIO, 2009; DANTAS *et al.*, 2013; JULIEN *et al.*, 1995). Já foi previamente observado o predomínio do componente de BF em animais infartados (MOSTARDA *et al.*, 2010; DANTAS *et al.*, 2013). Entretanto, tendo em vista que a diminuição da banda de BF observada no grupo OEAz+ISO não foi significativa, quando comparada com o grupo ISO, não podemos afirmar que o OEAz diminui a atividade simpática vasomotora periférica em animais infartados.

#### 5.4 Parâmetros Autonômicos

O reflexo barorreceptor ou barorreflexo, um dos mais importantes mecanismos para o controle batimento-a-batimento da pressão arterial, atua ajustando a frequência cardíaca e o tônus simpático vascular momento-a-momento (HAIBARA; SANTOS, 2000). Isso é demonstrado clinicamente em estudos que mostraram que o prejuízo da função barorreflexa é um fator de risco independente para morte súbita em pacientes pós IAM (LA ROVERE et al., 1998).

Elevações súbitas da pressão arterial aumentam a atividade dos barorreceptores, os quais reflexamente inibem a atividade tônica simpática para os vasos e coração. À redução da atividade simpática associa-se um aumento da atividade vagal, a qual produz bradicardia. Nos experimentos realizados, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quando estudada a bradicardia relativa à sensibilidade do barorreflexo através da administração de fenilefrina. Portanto, em todos os grupos este reflexo permaneceu mantido. O componente de taquicardia reflexa não diferiu entre os grupos e apresentou-se com diferenças estatísticas não significantes. Entretanto, como a sensibilidade barorreflexa foi medida apenas após alterações rápidas da pressão arterial (provocadas por administração em bolo de fenilefrina e nitroprussiato de sódio) e não após uma infusão em rampa prolongada das drogas vasoativas, portanto, a influência simpática sobre a sensibilidade barorreflexa pode ter sido apenas parcialmente avaliada. (COLEMAN, 1980). Tais dados denotam que o OEAz apesar de não apresentar um efeito cardioprotetor esperado, não apresenta toxicidade, causando aumento ou diminuição excessivas de ambos reflexos. Estudos em humanos e em modelos experimentais têm mostrado que o controle reflexo da circulação não depende somente dos barorreceptores arteriais, mas também, com certa importância, dos receptores cardiopulmonares (MEYRELLES; CABRAL; VASQUEZ, 1994a; MEYRELLES; CABRAL; VASQUEZ, 1994b; VASQUEZ, 1994; MEYRELLES; MILL; VASQUEZ, 1995; VASQUEZ et al., 1997).

Em relação ao reflexo cardiopulmonar, o presente estudo demonstrou uma queda maior da PA do grupo OEAz+ISO comparado com o grupo ISO e um aumento da FC nesses mesmos grupos, quando as doses de serotonina eram administradas. Situações que provoquem mudanças no volume de sangue central ou pressões sub atmosféricas na parte inferior do corpo humano, ativam os reflexos cardiopulmonares (MEYRELLES; CABRAL; VASQUEZ,

1994a). Os efeitos reflexos da estimulação dos receptores cardiopulmonares, localizados em átrios e ventrículos, vasos pulmonares e parênquima pulmonar resultam no reflexo de hipotensão e bradicardia simultâneas. Este reflexo cardiopulmonar ficou conhecido como reflexo de Bezold-Jarisch que apresenta como resultados o aumento da atividade vagal e redução da atividade simpática (STRANDGAARD; PAULSON, 1992; MEYRELLES; CABRAL; VASQUEZ, 1994a; VASQUEZ, 1994; VASQUEZ *et al.*, 1997).

Em estudos pioneiros que avaliaram o reflexo cardiopulmonar em ratos machos submetidos ao IAM observaram redução da sensibilidade do reflexo cardiopulmonar provocada pela ligadura da artéria coronária esquerda (VASQUEZ, 1994; MEYRELLES; MILL; VASQUEZ, 1995). Esta disfunção cardioinibitória reflexa representa as consequências das progressivas alterações morfofuncionais do músculo cardíaco após o IAM, provavelmente associado à inativação dos receptores na área do IAM e hipertrofia da área restante do ventrículo esquerdo (MEYRELLES; CABRAL; VASQUEZ, 1994a; VASQUEZ, 1994).

Segundo Rocha *et al.* (2003) estes resultados de redução do reflexo cardiopulmonar em animais infartados não são consenso, pois em estudo com coelhos infartados foram encontradas aumento das respostas hipotensoras e bradicárdicas. Em outro estudo do grupo de Meyrelles, Cabral e Vasquez. (1994a) foi verificada a redução do reflexo cardiopulmonar em ratos tratados durante 15 dias com isoproterenol, droga que induziu hipertrofia cardíaca, alteração que também ocorre após o IAM induzido pela ligadura da artéria coronária.

A FCI é observada após o duplo bloqueio com atropina e propanolol, excluindo assim qualquer atividade simpática e parassimpática sobre o coração. Dessa forma a atividade eletrofisiológica cardíaca do automatismo natural do nodo sinusal pode ser avaliada. Os dados referentes à FCI foram significativamente menores no grupo ISO quando comparados com os grupos Controle e OEAz, o que não ocorreu no grupo OEAz+ISO, evidenciando uma diminuição do automatismo intrínseco do coração no IAM (KRUEGER *et al.*, 1997, 2000).

Vários estudos demonstram que no IAM ocorre uma diminuição da modulação parassimpática e aumento da modulação simpática (LA ROVERE *et al.*, 1998; PANIKOWSKI *et al.*, 2001; GRAHAM *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2012; BARBOZA *et al.*, 2013; DE LA FUENTE *et al.*, 2013). Em indivíduos saudáveis, situações de aumento da atividade simpática normalmente são concomitantes com aumento da banda de BF. Em estudos, clínicos e experimentais com insuficiência cardíaca foram observados aumentos na

banda de BF da VFC estão ligados ao grau de excitação simpática, avaliado por medidas diretas da atividade nervosa simpática ou de norepinefrina plasmática (KIENZLE *et al.*, 1992; ISHISE *et al.*, 1998).

Neste estudo, observou-se uma diferença significativa no aumento do ISV no grupo ISO quando comparado com o Controle e, apesar de não mostrar diferença estatística, os valores médios desse índice também foram maiores no grupo ISO comparados com os grupos OEAz e ISO+OEAz ( $ISV > 1$  = predomínio simpático,  $ISV < 1$  = predomínio parassimpático). Esses valores sugerem que o pré tratamento com o OEAz foi capaz de diminuir a modulação simpática sobre o coração, contribuindo dessa forma para um prognóstico positivo após o IAM. Estes resultados são similares a estudos anteriores (KRÜGER *et al.*, 1997, 2000) e indicam que no modelo de insuficiência cardíaca moderada após infarto do miocárdio em rato, ocorre uma perda do tônus parassimpático vagal sobre o coração, permanecendo intacta a ação tônica simpática dirigida ao nó sinusal. Há vários relatos na literatura afirmando que o aumento da atividade simpática cardíaca pós IAM é um dos fatores intimamente ligados à morbidade e mortalidade, além de gerar disfunção barorreflexa nos pacientes com IAM (ECKEBERG *et al.*, 1971; FRANCIS *et al.*, 1989; FERGUSON *et al.*, 1992; KINGWELL *et al.*, 1994; KRUEGER *et al.*, 1997, 2000).

## 5.5 Massa Corporal

Em relação à massa corporal dos animais observou-se nesse estudo uma perda de peso significativa nos grupos ISO, OEAz e OEAz+ISO quando comparados com o controle e dos grupos OEAz e OEAz+ISO quando comparados com o grupo ISO. Cunha (2012) também em um estudo durante 30 dias de administração do OEAz e suas frações, em modelo de hipertensão com L-NAME, identificou uma perda de peso nesses animais quando comparados ao controle com nifedipina. Porém no estudo de Lobo Filho (2011), o pré tratamento com o OEAz, em modelo de IAM por isoproterenol, não alterou significativamente o peso dos animais em 12 dias. Bezerra *et al.* (2000) constatou em sua pesquisa um efeito antiespasmótico do OEAz em íleo de rato. Uma menor motilidade intestinal pode dificultar o trânsito do bolo intestinal e consequentemente a absorção de nutrientes.

De acordo com Faria *et al.* (2011), animais apresentam redução do peso corporal e menor ingestão de ração e água sete dias após o infarto. Baldo (2011) confirmou tais achados,

mostrando menor consumo de ração já no terceiro dia, e redução do peso corporal que permaneceu menor ao longo das 4 semanas de acompanhamento. Redução de peso semelhante foi observada por Sartório *et al.* (2005) no terceiro dia após o infarto. Da mesma forma, vários estudos mostram menor peso corporal 4 semanas após o infarto (NAGAYA *et al.*, 2001; PALUS *et al.*, 2009). A explicação para essa perda de peso pode estar relacionada a uma atividade inflamatória excessiva. Estudos mostram os efeitos do TNF- $\alpha$  como um fator anorexígeno, estando envolvido diretamente na perda do apetite e caquexia em diversas condições (LING *et al.*, 1997; RAINA; JEEJEEBHOY, 1998; STEFFEN *et al.*, 2008). O TNF- $\alpha$  está precocemente elevado após o infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca. Isso poderia ativar o sistema de ubiquitinação levando a proteólise (BALDO, 2011).

## 5.6 Avaliação da Extensão do Infarto

Quando coradas com TTC, as fatias de 2mm do coração dos animais dos grupos Controle e OEAz não mostraram áreas isquêmicas (hipocrômicas). No grupo ISO a área infartada mostrou-se bem definida e localizada ao contrário do grupo OEAz+ISO onde tais áreas se mostraram difusas pelo tecido cardíaco. A coloração com TTC mostrou que apesar dos valores médios do peso do infarto nos animais do grupo OEAz+ISO serem menores, não houve significância quando comparados ao grupo ISO. Utilizando essa mesma técnica para quantificação da área infartada, mas em modelo de IAM por ligadura da artéria coronária descendente anterior, o estudo de Almeida *et al.* (2009) não mostrou alteração significativa na redução da área de infarto em animais tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina. Do mesmo modo Mesquita Filho (2014), em modelo de infarto por isoproterenol, não observou redução na área de infarto em animais submetidos ao pré tratamento com óleo essencial do *Citrus aurantium L.* Asanuma *et al.* (2004) mostraram que a infusão de carvedilol reduz a área de infarto em cães submetidos a isquemia seguida por reperfusão, mas Baldo (2011) não detectou essa redução com infusão aguda e crônica de carvedilol no modelo de IAM por ligadura da artéria coronária esquerda. As diferentes metodologias e técnicas de estudos, juntamente com as diversas substâncias testadas dificultam uma padronização em relação ao mecanismo de cardioproteção na extensão da área de infarto.

## 5.7 Considerações Finais

Nesse estudo o OEAz não foi capaz de reverter as alterações causadas pelo IAM em relação aos parâmetros cardiovasculares, como a PA, FC e DPT., assim como os parâmetros eletrocardiográficos. Porém em relação aos parâmetros autonômicos o OEAz diminuiu a modulação simpática cardíaca causada pelo IAM, evidenciado na análise do ISV e na banda de BF da VFC no domínio da frequência . Ainda, não foram identificadas alterações significantes na área de infarto entre os grupos ISO e OEAz+ISO, assim como no peso dos corações desses animais. Mas, foi constatado que os animais dos grupos ISO, OEAz e OEAZ+ISO tiveram uma perda de peso durante o protocolo de tratamento quando comparado com o grupo controle que ganhou peso.

A análise dos efeitos do pré tratamento com o OEAz no modelo de indução de infarto por isoproterenol analisando as variáveis cardiovasculares, eletrocardiográficas e autonômicas foi realizada pela primeira vez no presente estudo. Assim, a realização de futuras pesquisas abordando metodologias que somem à esta, como por exemplo outras formas de insuficiência cardíaca, torna-se de grande relevância objetivando o aprofundamento do conhecimento já obtido e esclarecimento quanto ao mecanismo de ação do OEAz nos parâmetros analisados.

Para o engradecimento deste e realização de futuros trabalhos consideramos que outros métodos podem ser empregados para obtenção de dados mais completos e esclarecedores. A análise dos efeitos do OEAz sobre o sistema autonômicos em animais anestesiados e acordados, assim como o efeitos protetor do óleo em animais infartados submetidos ao estresse físico podem ser modelos que venham a somar aos dados já obtidos.

## 6 CONCLUSÃO

O pré tratamento com o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* não foi capaz de reverter as alterações nos parâmetros hemodinâmicos e eletrocardiográficos causados pelo infarto agudo do miocárdio. Porém, uma redução na modulação simpática cardíaca, sugerindo que o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* possivelmente atua de forma cardioprotetora nesse aspecto.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- AKSELROD S.; GORDON, D.; UBEL, F.A.; SHANNON, D.C.; BERGER, A.C.; COHEN, R.J. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. **Science**, v. 213, p. 220-222, 1981.
- AMAN, U.; VAIBHAV, P.; BALARAMAN, R. Tomato lycopene attenuates myocardial infarction induced by isoproterenol: Eletrocardiographic, biochemical and anti-apoptotic study. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 2, n. 5, p. 345-351, 2012.
- 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**. 16th ed. New York: McGraw- Hill, 2001. cap. 228, p.1448-1459.
- ARAÚJO, F.Y.R.; SILVA, M.I.G.; MOURA, B.A.; OLIVEIRA, G.V.; LEAL, L.K.A.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; MORAES, M.O.; SOUSA, F.C.F.; MACÊDO, D.S. Central nervous system effects of the essential oil of the leaves of *Alpinia zerumbet* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 61, p. 1521- 1527, 2009.
- ARAÚJO, P.F.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; MORAIS, S.M.; FERREIRA, S.C.; LEALCARDOSO, J.H. Antinociceptive effects of the essential oil of on mice. **Phytotherapy**, v. 12, n. 6, p. 482-486, 2005.
- BARRET, S.C.H. The evolution of plant sexual diversity. **Nat. Rev. Gen.**, v. 3, p. 274-284, 2002.
- BERNI, V.; FIORINO, P.; IRIGOYEN, M.C.; LACCHINI, S. End-organ damage and cardiac dysfunction in sinoaortic denervation-induced AP lability in rats. **J. Hypertension**, v. 22, Suppl. 1, p. S27, 2004.
- BEZERRA, M.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; FONTENELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytother. Res.**, v. 14, n. 7, p. 549-551, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Instruções operacionais**: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos. Brasília, 2008.
- BRAUNWALD, E.; BONOW, R.O.; MANN, D.L.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. **Braunwald's heart disease**: A textbook of cardiovascular medicine. 9. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. v. 1.
- 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.

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

CHRASTINA, A.; POKREISZ, P.; SCHINITZER, J.E. Experimental model of transthoracic, vascular-targeted, photodynamically induced myocardial infarction. **AJP-Heart Circ. Physiol.**, v. 306, n. 2, p. H270-H278, 2014.

COLEMAN, T. G. Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. **Am. J. Physiol.**, v. 238, p. H515-H520, 1980.

CUNHA, G.H. **Efeito farmacológico das frações hexânica, clorofórmica, e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo*.** 2012. 224 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CUNHA, G.H.; FECHINE, F.V.; SANTOS, L.K.X; PONTES, A.V.; OLIVEIRA, J.C.; MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.E.A. Efficacy of the tincture of jalapa in the treatment of functional constipation: a Double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Contemp. Clin. Trials**, v. 32, p. 153-159, 2011.

CUNHA, G.H.; MORAES, M.O.; FECHINE, F.V.; BEZERRA, F.A.F.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; MORAES, M.E.A. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vasc. Pharmacol.**, v. 58, p. 337-345, 2013.

DANTAS, E.M.; PIMENTEL, E.B.; ANDREÃO, R.V.; CICHONI, B.S.; GONÇALVES, C.P.; DOS ANJOS ZANIQUELI, D.; BALDO, M.P.; RODRIGUES, S.L.; MILL, J.G. Carvedilol recovers normal blood pressure variability in rats with myocardial infarction. **Auton. Neurosci.**, v. 177, n. 2, p. 231-236, 2013.

DERBALI, A.; MNAFGUI, K.; AFFES, M.; DERBALI, F.; HAJJI, R.; GHARSALLAH, N.; ALLOUCHE, N.; FEKI, A. Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study. **J. Physiol. Biochem.**, v. 71, n. 2, p. 281-288, 2015.

DE ANGELIS, K.; SANTOS, M.S.B.; IRIGOYEN, M.C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Rev. Soc. Cardiol. Rio Grande do Sul**, v. 13, n. 3, 2004.

DE ANGELIS, K.; LEIRNER, A.A.; IRIGOYEN, M.C.; CESTARI, I.A. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. **Artif. Organ.**, v. 25, n. 11, 2001.

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 incell injury and death. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p.405-434, 2006.

ECKBERG, D. L.; NERHED, C.; VALLIN, B. G. Respiratory modulation of muscle sympathetic and vagal cardiac outflow in man. **J. Physiol. Lond.**, v. 365, p. 181-196, 1971.

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

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.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979.

FARAH, V. M.; MOREIRA, E. D.; PIRES, M. D.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 3, p. 361-369, 1999.

FAZAN JR, R.; HUBER, D.A.; SILVA, C.A.A.; SILVA, V.J.D.; SALGADO, M.C.O.; SALGADO, H.C. Sildenafil acts on the central nervous system increasing sympathetic activity. **J. Appl. Physiol.**, v. 104, n. 6, p. 1683-1689, 2008.

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.

FERGUSON, D. W.; BERG, W. J.; ROACH, P. J.; OREN, R. M.; MARK, A. L. Effects of heart failure on baroreflex control of sympathetic neural activity. **Am. J. Cardiol.**, v. 69, p. 523-31, 1992.

FORNITANO, L.D.; GODOY, M.F. Increased rate-pressure product as predictor for the absence of significant obstructive coronary artery disease in patients with positive exercise test. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 86, n.2, p. 138-144, 2006.

FRANCIS, J.; WEISS, R. M.; WEI, S. G.; JOHNSON, A. K.; FELDER, R. B. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 281, p. R1734-R1745, 2001.

GALINIER, M.; PATHAK, A.; FOURCADE, J.; ANDRODIAS, C.; CURNIER, D.; VARNOUS, S.; BOVEDA, S.; MASSABUAU, P.; FAUVEL, M.; SENARD, J. M.; BOUNHOURE, J. P. Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. **Eur. Heart J.**, v. 21, p. 475–482, 2000.

GRASSI, G.; MANCIA, G. Physiopatologic and clinical features of hypertensive cardiopathy. **Cardiologia**, v. 39, n. 12, p. 291-294, 1994.

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.

GOBEL, F.L.; NORDSTROM, L.A.; NELSON, R.R.; JORGENSEN, C.R.; WANG, Y.. The rate-pressure product as an index of myocardial oxygen consumption during exercise in patients with angina pectoris. **Circulation**, v. 57, n. 3, p. 549-556, 1978.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11st ed. [S.l]: Elsevier Science, 2006.

IRIGOYEN, M.C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; KRIEGER, E.M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervosa simpático. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, n. 1, 2001.

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.

JANUÁRIO, E.N. **Efeitos da estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina sobre a modulação autonômica cardiovascular em ratos com insuficiência cardíaca decorrente do infarto do miocárdio**. 2009. Tese (Doutorado em Patologia) - Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do triângulo Mineiro, Uberaba, 2009.

JENNINGS, R.B.; REIMER, K.A. Lethal myocardial ischemic injury. **Am. J. Pathol.**, v. 102, p.241-255, 1981.

JULIEN, C.; ZHANG, Z.-Q.; CERUTTI, C.; BARRÈS, C. Hemodynamic analysis of arterial pressure oscillations in conscious rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 50, n. 3, p. 239-252, 1995.

KIKUYA, M.; HOZAWA, A.; OHOKUBO, T.; TSUJI, I.; MICHIMATA, M.; MATSUBARA, M.; OTA, M.; NAGAI, K.; ARAKI, T.; SATOH, H.; ITO, S.; HISAMICHI, S.; IMAI, Y. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities the Ohasama study. **Hypertension**, v. 36, n. 5, p. 901-906, 2000.

KINGWELL, B. A.; THOMPSON, J. M.; KAYE, D. M.; McPHERSON, G. A.; JENNINGS, G. L.; ESLER, M. D. Heart rate spectral analysis, cardiac noropinephrine spillover, and muscle sympathetic nerve activity during human sympathetic nervous activation and failure. **Circulation**, v. 90, p. 234-240, 1994

KLEIGER, R.E.; MILLER, J.P.; BIGGER, J.T.; MOSS, A.J. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**, v. 59, n. 4, p. 256-262, 1987.

KOIKE, M.K.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; IDA, F.; MOREIRA, E.D.; KRIEGER, E.M. Baroreceptor function after myocardial infarction in rats. In: SCIENTIFIC MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION, 16<sup>th</sup>, 1996, Glasgow, UK. **Abstract...** Glasgow, UK, 1996.

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. 1682-1696, 2002.

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.

KRÜGER, C.; KALENKA, A.; HAUNSTETTER, A.; SCHWEIZER, M.; MAIER, C.; RÜHLE, U.; EHMKE, H.; KÜBLER, W.; HAASS, M. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in conscious rats with myocardial infarction. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 5, pt 2, p. H2240-H2247, 1997.

KRÜGER, C.; LANDERER, V.; ZUGCK, C.; EHMKE, H.; KÜBLER, W.; HAASS, M. The bradycardic agent zatebradine enhances baroreflex sensitivity and heart rate variability in rats early after myocardial infarction. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, n. 4, p. 900-912, 2000.

KUCH, M.; JANISZEWSKI, M.; MAMCARZ, A.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A.; DŁUZNIEWSKI, M. Major adverse cardiac event predictors in survivors of myocardial infarction with asymptomatic left ventricular dysfunction or chronic heart failure. **Med. Sci. Monit.**, v. 15, n. 6, 2009.

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.

LACERDA, J. E. C. **Estudo da Atividade Simpática em ratos submetidos ao infarto do miocárdio**. Tese (Doutorado) - Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

LA ROVERE, M.T.; BIGGER JUNIOR, J.T.; MARCUS, F.I.; MORTARA, A.; SCHWARTZ, P.J. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. **Lancet**, v. 351, n. 9101, p. 478-484, 1998.

LA ROVERE, M.T.; MORTARA, A.; PANTALEO, P.; MAESTRI, R.; COBELLI, F.; TAVAZZI, L. Scopolamine Improves autonomic balance in advanced congestive heart failure. **Circulation**, v. 90, n. 2, 1994.

LA ROVERE, M.T.; PINNA, G. D.; MAESTRI, R.; MORTARA, A.; CAPOMOLLA, S.; FEBO, O.; FERRARI, R.; FRANCHINI, M.; GNEMMI, M.; OPASICH, C.; RICCARDI, P. G.; TRAVERSI, E.; COBELLI, F. Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients. **Circulation**, v.107, n. 4, 2003.

LAHLOU, M.S.; FIGUEIREDO, A.F.; MAGALHÃES, P.J.; LEAL-CARDOSO, J.H. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoide oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.80, n.12, p. 1125-1131, 2002b.

LAHLOU, M.S.; GALINDO, C.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTENELES, M.C.; DUARTE, G.P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 68, n. 12, p. 1097-1102, 2002a.

LAHLOU, M.S.; INTERAMINENSE, L.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H.; DUARTE, G.P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 17, p. 323-330, 2003.

LARANJA, S.M.; BERGAMASCHI, C.M.; SCHOR, N. Evaluation of three plants with potential diuretic effect. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 38, n.1, p. 13-16, 1992.

LEAL-CARDOSO, J.R.; MOREIRA, M.R.; PINTO DA CRUZ, G.M.; MORAIS, S.M.; LAHLOU, M.S.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v. 11, p. 549-553, 2003.

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.

LEVICK, J.R. **An Introduction to Cardiophascular Physiology**. 2nd ed. [S.l.]: Butterworth-Heinemann, 1995.

LI, H.; XIE, Y; YANG, Q.; WANG, S.; ZHANG, B.; WANG, J.; CAO, W.; BI, L.; SUN, J.; MIAO, S.; HU, J.; ZHOU, X.; QIU, P. Cardioprotective effect of paeonol and danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. 2012.

LIN, J.; OAK, M. JUNG, S.H.; PARK, D.H.; AUGER, C.; KIM, K.R.; LEE, S.; SCHINKERTH, V.B. Na ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* stems causes NO-mediated endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings and prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelium dysfunction in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 383, n. 6, p. 635-645, 2008.

LOBO FILHO, H.G. **Efeitos do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos**. 108f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

LOMBARDI, F.; SANDRONE, G.; PERNPRUNER, S.; SALA, R.; GARIMOLDI, M.; CERUTTI, S.; BASELI, G.; PAGANI, M.; MALLIANI, A. Heart rate variability as an index of sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**, v. 60, n. 16, p. 1239-1245, 1987.

LOPES, P.F.F.; DE OLIVEIRA, M.I.B.; ANDRÉ, S.M.S; NASCIMENTO, D.L.A.; SILVA, C.S.S.; REBOUÇAS, G.M.; FELIPE, T.R.; ALBUQUERQUE FILHO, N.J.B.; MEDEIROS, H.F. Aplicabilidade Clínica da Variabilidade da Frequência Cardíaca. **Rev Neurocienc.**, v. 21, n. 4, p. 600-603, 2013

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil:** arbustivas, herbáceas e trepadeiras. São Paulo: Editora Plantarum, 1995.

MAHMOOD, Z.A.; SUALEH, M.; MAHMOOD, S.B.; KARIM, M.A. Herbal treatment for cardiovascular disease the evidence based therapy. **Pakistan J. Pharm. Sci.**, v. 23, n. 1, p. 119-124, 2010.

MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; CERUTTI, S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, p. 482-492, 1991.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p.3-15, 1995.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas:** sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002.

MANSUR, P.H.G.; CURY, L.K.P.; DESTRO-FILHO, J.B.; RESENDE, E.S.; DESTRO, J.P.B.; DE OLIVEIRA, L.M.; DE MORAES, D.C.G.; DE FREITAS, G.R.R.; ROCHA, L.S.S. Análise de registros eletrocardiográficos associados ao infarto agudo do miocárdio. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 87, n. 2, p. 106-114, 2006.

MARTINELLI FILHO, M.; RUSSO, M.; SOSA, E.A. QT longo: a importância da investigação clínica criteriosa. **Rev. Bras. Marcapasso e Arritmia**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 1994.

MENDONÇA, V.L.M.; OLIVEIRA, C.L.A.; CRAVEIRO, A.A.; RAO, V.S.; FONTENELES, M.C. Pharmacological and toxicological evaluation os *Alpinia speciosa*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 93-97, 1991.

MEYRELLES, S.S.; CABRAL, A.M.; VASQUEZ, E.C. Impairment of the Bezold-Jarisch reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 4, 1994a.

MEYRELLES, S.S.; CABRAL, A.M.; VASQUEZ, E.C. Contribuição do reflexo cardiopulmonar na regulação cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 62, n. 2, 1994b.

MEYRELLES, S.S.; MILL, J.G.; VASQUEZ, E.C. Avaliação do reflexo Bezold-Jarisch no infarto experimental do miocárdio. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 64, n.6, p.521-524, 1995.

MILL, J. G.; STEFANON, I.; LEITE, C. M.; VASSALLO, D. V. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. **Cardiovasc. Res.**, v. 24, n. 9, p. 748- 753, 1991.

MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; VANE, M.; MOREIRA, E.D.; ROSA, K.; MORAES-SILVA, I.; LACCHINI, S.; CASARINI, D.E.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodelling and mortality. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 37, n. 4, p. 447-452, 2010.

MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; MEDEIROS, A.; MOREIRA, E. D.; MORAES-SILVA, I. C.; BRUM, P. C.; ANGELIS, K. D.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex deficiency induces additional impairment of vagal tone, diastolic function and calcium handling proteins after myocardial infarction. **Am. J. Transl. Res.**, v. 6, n. 3, p. 320-328, 2014.

MORTARA, A.; LA ROVERE, M. T.; SIGNORINI, M. G.; PANTALEO, P.; PINNA, G.; MARTINELLI, L.; CECONI, C.; CERUTTI, S.; TAVAZZI, L. Can power spectral analysis of heart rate variability identify a high risk subgroup of congestive heart failure patients with excessive sympathetic activation? A pilot study before and after heart transplantation. **Br. Heart J.**, v. 71, p. 422-430, 1994.

OLIVEIRA, C.C. **Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt & Smith.** 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

OLIVEIRA JUNIOR, N. A.; ANDRÉA, E.M.; MACIEL, W.A.; SIQUEIRA, L.R.; ATIÉ, J.; COSENZA, R. O Eletrocardiograma e a Síndrome de QT Longo. **Rev. SOCERJ**, v. 17, n. 3, p. 177-182, 2004

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIZZINELLI, P.; SANDRONE, G.; MALFATTO, G.; DELL'ORTO, S.; PICCALUGA, E.; TURIEL, M.; BASELLI, G.; CERUTTI, S.; MALLIANI, A. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circ. Res.**, v. 59, p. 178-3, 1986.

PAGANI, M.; MONTANO, N.; PORTA, A.; MALLIANI, A.; ABBOUD, F. M.; BIRKETT, C.; SOMERS, V. K. Relationship between spectral components of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in humans. **Circulation**, v. 95, p. 1441-1448, 1997.

PONIKOWSKI, P.P.; CHUA, T.P.; FRANCIS, D.P.; CAPUCCI, A.; COATS, A.J.; PIEPOLI, M.F. Muscle ergoreceptor overactivity reflects deterioration in clinical status and cardiorespiratory reflex control in chronic heart failure. **Circulation**, v. 104, p. 2324-2330, 2001.

PATEL, V.; UPANGANLAWAR, A.; ZALAWADIA, R.; BALARAMAN, R. Cardioprotective effect of melatonina against isoproterenol induced myocardial infarctation in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 644, n. 1, p. 160-168, 2010.

PINTO, N.V.; ASSREUY, A.M.; COELHO DE SOUZA, A.N.; CECCATTO, V.A.; MAGALHÃES, P.J.C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H. 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.

RODRIGUES, B.; JORGE, L.; MOSTARDA, C.T.; ROSA, K.T.; MEDEIROS, A.; MALFITANO, C.; DE SOUZA, A.L.J.R.; VIEGAS, K.A.; LACCHINI, S.; CUR. R.; BRUM, P.C.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. **J. Card. Fail.**, v. 18, p. 734-744, 2012.

SANCHES, I. C.; SARTORI, M.; JORGE, L.; IRIGOYEN, M. C.; De ANGELIS, K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 10, p. 942-948, 2009.

SANTANA, A.P.M. **Avaliação da segurança e genotoxicidade do chá da *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt e Smith em voluntários sadios**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SANTOS, B.A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M.S.; MIRANDA, F.M.F.; CARNEIRO, D.C., CAVALCANTE, P.H.; CÂNDIDO, E.A.F.; XAVIER FILHO, L.; CRUZ, J.S.; GONDIM, A.N.S. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type  $Ca^{2+}$  current blockade. **Phytomedicine**, v. 18, p. 539-543, 2011.

SHEN, M.J.; ZIPES, D.P. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. **Circ. Res.**, v. 114, n. 6, p. 1004-1021, 2014.

SCHULTZ, H.D. Cardiac vagal chemosensory afferents. Function in pathophysiological states. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v 940, p. 59-73, 2001.

SILVA, C. P. **Papel do 17  $\beta$ -estradiol no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol em ratas**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. cap. 18, p. 387-416.

SORAYA, H.; KHORRAMI, A.; GARJANI, A.; MALEKI-DIZAJI, N.; GARJANI, A.; Acute treatment with metformin improves cardiac function following isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Pharmacol. Rep.**, v. 64, n. 6, p. 1476-1484, 2012.

STAUSS, H. M.; RARICK, K.R.; DEKLOTZ, R.J.; SHERIFF, D.D. Frequency response characteristics of whole body autoregulation of blood flow in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 296, n. 5, p. 1607-1616, 2009.

SZABO, B. M.; Van VELDHUISEN, D. J.; BROUWER, J.; HAAKSMA, J.; LIE, K. I. Relation between severity of disease and impairment of heart rate variability parameters in patients with chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 76, p. 713-716, 1995.

STEVENS, T.L.; BURNETT, J.C.J.R.; KINOSHITA, M.; REFIELD, M.M. A functional role for endogenous atrial natriuretic peptide in a canine model of early left ventricular dysfunction. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n.1101, p.1108, 1995.

SU, D.F.; MIAO, C.Y. Blood pressure variability and organ damage. **Clin. Exp. Pharm. Physiol.**, v. 28, p. 709-715, 2001.

TIMERMAN, A.; FEITOSA, G.S. **Síndromes coronárias agudas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, A.M.; TOSTES, R.C. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 609-702, 2010.

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

TOMLINSON, P.B. Studies in the sistematic anatomy of the Zingiberaceae. **J. Linnean Soc.**, v. 55, p. 547-592, 1956.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Departamento de Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas. **Final Technical Report – Acute and long –term toxicological analysis of the essential oil from colônia (with repeated doses) in mice**. Florianópolis, 2008.

VAN DE BORNE, P.; MONTANO, N.; PAGANI, M.; OREN, R.; SOMERS, V. K. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. **Circulation**, v. 95, n. 6, p. 1449-1454, 1997.

VANDERLEI, L.C.M.; PASTRE, C.M.; HOSHI, R.A.; CARVALHO, T.D.; GODOY, M.F. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 24, n. 2, p. 205-217, 2009

VASQUEZ, E.C. Contribution of the cardiopulmonary reflex to the cardiovascular regulation in normal and pathophysiological states. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 4, p.1049-1064, 1994.

VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H.; CABRAL, A. M. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 4, p. 521-532, 1997.

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 clinicalcardiologist. **Circulation**, v. 105, p.2332–2336, 2002.

VYBIRAL, T.; GLASER, D.H.; MORRIS, G.; HESS, K.R.; YANG, K.; FRANCIS, M.; PRATT, C. Effect of low dose of scopolamine in heart rate variability in acute myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 22, p. 1320-1326, 1993.

WHITE, W.B. Heart rate and the rate-pressure product as determinants of cardiovascular risk in patients with hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 12, n. S2, p. 50S-55S, 1999.

WESTFALL, T.C.; WESTFALL, D.P. Agonistas e antagonistas adrenérgicos. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 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.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001.

YOUSEFI, K.; SORAYA, H.; FATHIAZAD, F.; KHORRAMI, A.; HAMEDEYASDAN, S.; MALEKI-DIZAJI, N.; GARJANI, A. Cardioprotective effect of methanolic extract of *Marrubium vulgare* L. on isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 51, p. 653-660, 2013.