

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MANUELLE PRESTRELO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *ASPIDOSPERMA MACROCARPUM*
Mart. (APOCYNACEAE) EM RATOS**

Maceió-al
2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

O48a Oliveira, Manuelle Prestrelo de.

Avaliação dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo extrato etanólico das folhas da *Aspidosperma macrocarpon* Mart. (Apocynaceae) em ratos / Manuelle Prestrelo de Oliveira. – 2012.
55 f. : il.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Co-orientador: Eurica Adélia Ribeiro Nogueira
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 40-55.

1. *Aspidosperma macrocarpum*. 2. Hipotensão. 3. Anéis mesentéricos. 4. Vasorrelaxamento. 5. Receptores muscarínicos. I. Título.

CDU: 616.12-008.33:615.322

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970

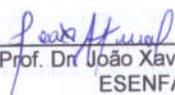
PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO

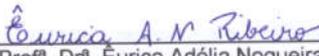
**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS
PELO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *ASPIDOSPERMA
MACROCARPUM* Mart. (APOCYNACEAE) EM RATOS”**

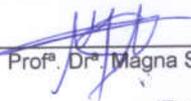
por

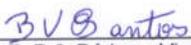
Manuelle Prestrelo de Oliveira

A Banca Examinadora, reunida aos 16 dias do mês de novembro do ano
de 2012, considera o(a) candidato(a) **APROVADO(A)**.


Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
ESENFAR-UFAL
(Orientador)


Prof.ª. Dr.ª. Eurica Adélia Nogueira Ribeiro
ESENFAR-UFAL
(Examinadora)


Prof.ª. Dr.ª. Magna Susana Alexandre Moreira
UFAL
(Examinadora)


Prof.ª. Dr.ª. Bárbara Viana de Oliveira Santos
UFPB
(Examinadora)

MANUELLE PRESTRELO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *ASPIDOSPERMA MACROCARPUM*
Mart. (APOCYNACEAE) EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo
Júnior

Maceió-al
2012

RESUMO

Aspidosperma macrocarpum Mart é uma planta popularmente conhecida como “peroba-gigante-do-cerrado”. Espécies do gênero *Aspidosperma* apresentam atividades farmacológicas diversas, sendo utilizadas no tratamento de leishmaniose, inflamações de útero e ovário, diabetes, malária e contra febre. Apesar dos diversos e significantes estudos de espécies do gênero *Aspidosperma*, algumas espécies são pouco relatadas ou mesmo não possuem estudos de suas atividades biológicas. Um exemplo é a espécie *A. macrocarpum*. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo extrato etanólico das folhas de *A. macrocarpum* (EEAM) através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro*. A administração de maneira randômica das doses EEAM (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.), promoveu uma hipotensão transitória (-17 ± 2 , -12 ± 2 , -12 ± 1 e $-17, \pm 3$ mmHg, respectivamente) e uma bradicardia (-3 ± 1 , -10 ± 3 , -5 ± 1 e -4 ± 2 bpm, respectivamente) de maneira independente de dose em ratos normotensos não anestesiados. A resposta hipotensora induzida por EEAM foi atenuada significativamente nas doses de 10 e 20 mg/kg na presença de L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS sintase, porém a resposta bradicárdica não foi alterada. Após o bloqueio com atropina, bloqueador não seletivo dos receptores muscarínicos, a resposta hipotensora foi significativamente abolida e revertida, já a bradicardia foi potencializada. Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso, EEAM (0,03-300 $\mu\text{g/ml}$), induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis com endotélio vascular ($\text{CE}_{50} = 273 \pm 6$ $\mu\text{g/ml}$) o efeito não foi alterado após a remoção do endotélio vascular ($\text{CE}_{50} = 117 \pm 3$ $\mu\text{g/ml}$). O EEAM induziu relaxamento em anéis mesentéricos sem endotélio pré-contraídos com 80 mM de KCl ($\text{CE}_{50} = 323 \pm 3$ $\mu\text{g/mL}$). A administração orogástrica do extrato (200 mg/kg) promoveu uma diminuição significativa da pressão arterial média em ratos espontaneamente hipertensos. Em conclusão, estes resultados sugerem que o EEAM promove efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos não anestesiados. Esta hipotensão é provavelmente, devido ativação de receptores muscarínicos do tipo M_3 , decorrente do vasorrelaxamento da musculatura lisa vascular e também apresenta um efeito anti-hipertensivo.

Palavras-chave: *Aspidosperma macrocarpum*. Hipotensão. Anéis mesentéricos. Vasorrelaxamento. Receptores muscarínicos.

ABSTRACT

Aspidosperma macrocarpum Mart is a plant popularly known as "mahogany-giant-do-cerrado". Species of the genus *Aspidosperma* have various pharmacological activities and are used in the treatment of leishmaniasis, inflammation of the uterus and ovary, diabetes, malaria, and fever. Although several studies and significant *Aspidosperma* species of the genus, some species are scarcely reported or even lack studies of biological activities. An example is the species *A. macrocarpum*. The objective of this study was to investigate the cardiovascular effects induced by ethanol extract of leaves of *A. macrocarpum* (EEAM) through an approach in vivo and in vitro. The administration of doses random manner EEAM (1, 5, 10 and 20 mg/kg, i.v.) promoted a transient hypotension (-17 ± 2 -12 ± 2 -12 and $-17 \pm 1, \pm 3$ mmHg, respectively) and a bradycardia (-3 ± 1 -10 ± 3 , -4 and $-5 \pm 1 \pm 2$ bpm, respectively) independently of dose in normotensive rats unanesthetized. The hypotensive response was induced EEAM Significantly attenuated at doses of 10 and 20 mg / kg in the presence of L-NAME, a nonselective inhibitor of NOS synthase, but the bradycardic response was not changed. After blocking with atropine, a nonselective blocker of muscarinic receptors, the hypotensive response was abolished and reversed significantly, since the bradycardia was potentiated. In the superior mesenteric artery rings isolated from normotensive rat, EEAM (0,03-300 $\mu\text{g/ml}$) induced a concentration-dependent vasorelaxation in rings with endothelium ($\text{CE}_{50} = 273 \pm 6$ $\mu\text{g/ml}$) the effect was not altered after removal of the endothelium($\text{CE}_{50} = 117 \pm 3$ $\mu\text{g/ml}$). The EEAM induced relaxation in endothelium-free mesenteric rings pre-contracted with 80 mM KCl ($\text{CE}_{50} = 323 \pm 3$ $\mu\text{g/mL}$). The orogastric administration of the extract (200 mg / kg) induced a significant decrease in mean arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. In conclusion, these results suggest that promotes EEAM bradycardic and hypotensive effect in normotensive rats unanesthetized. This hypotension is probably due to activation of muscarinic M3-type, resulting vasorelaxation of vascular smooth muscle and also features an antihypertensive effect.

Keywords: *Aspidosperma macrocarpum*. Hypotension. Mesenteric rings. Vasorelaxant action. Muscarinic receptor

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema de aquisição de dados de PA em ratos não anestesiados.....	20
Figura 2 - Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para artéria mesentérica superior isolada de rato.....	23
Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo EEAM (0,03 – 300 µg/ml), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN com endotélio funcional.....	24
Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo EEAM (0,03 – 300 µg/ml), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN sem endotélio funcional.....	24
Figura 5 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EEAM (0,03 – 300 µg/ml), sobre a contração induzida por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.....	25

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1- Efeito hipotensor induzido pela administração aguda de doses randomizadas do EEAM (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.) em ratos normotensos não-anestesiados (n = 6)..... 28
- Gráfico 2- Efeito do L-NAME (20 mg/kg; i.v.) sobre a resposta hipotensora induzida pela administração aguda de doses crescentes do EEAM (1; 5; 10 e 20 mg/kg, i.v.) em ratos normotensos não-anestesiados (n = 6). **p <0,01 *versus* controle..... 30
- Gráfico 3- Efeito da atropina (2 mg/kg; i.v.) sobre a resposta hipotensora induzida pela administração aguda de doses crescentes do EEAM (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.) em ratos normotensos não-anestesiados (n = 6), *p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 *versus* controle..... 32
- Gráfico 4- Efeito da administração oral do extrato etanólico das folhas de *Aspidosperma macrocarpum* (EEAM, 200 mg/Kg, v.o.) sobre a PAM em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados (n = 6) nos tempos 1, 2, 4 e 6 h após o tratamento. * p < 0,05 *versus* Controle..... 34
- Gráfico 5- Curva concentração resposta do efeito vasorelaxante de EEAM (0,1 - 300µg/ml), em artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso, com endotélio intacto (●) pré contraída com FEN 10⁻⁴µM , após endotélio removido(●). Os valores são expressos sendo média± erro padrão da média..... 35
- Gráfico 6- Curva concentração – resposta do efeito vasorelaxante do EEAM (0,1 - 300µg/ml), em artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio, pré contraídos com KCl 80 mM (●)..... 36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Considerações Sobre Pressão Arterial Média e Vasorrelaxamento.....	10
1.2	Considerações Sobre Hipertensão Arterial e Ratos Espontaneamente Hipertensos.....	13
1.3	Considerações Sobre Plantas Medicinais	16
1.3	Considerações Sobre Família Apocynaceae e Espécie <i>Aspidosperma Macrocarpum</i> Mart.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Geral.....	19
2.2	Específicos.....	19
3	MATERIAL	20
3.1	Animais.....	20
3.2	Obtenção do Extrato.....	20
3.3	Drogas e Reagentes.....	20
3.4	Soluções Nutritivas.....	21
4	MÉTODOS.....	22
4.1	Ensaio Farmacológico.....	22
4.2	Medida direta de pressão arterial (PA) em ratos não-anestesiados.....	22
4.1.2	Efeito do EEAM na PAM em ratos normotensos não-anestesiados.....	23
4.1.3	Verificação da participação do óxido nítrico (NO) no efeito induzido pelo EEAM na PAM em ratos normotensos não anestesiados.....	23
4.1.4	Verificação da participação muscarínica no efeito induzido pelo EEAM em ratos normotensos não anestesiados.....	24
4.1.5	Avaliação da atividade anti-hipertensiva induzida pelo EEAM em ratos espontaneamente hipertensos não anestesiados (SHR).....	24
4.2	Ensaio Farmacológico <i>In Vitro</i>.....	24

4.2.1	Preparação para retirada da artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso com ou sem endotélio.....	24
4.2.2	4.2.2 Efeito do EEAM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso.....	25
4.2.3	Efeito do EEAM sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	26
4.3	Análise Estatística.....	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	Estudos Farmacológicos Com Eeam <i>In Vivo</i>.....	28
5.1.1	Efeito do EEAM sobre a PAM em ratos normotensos não-anestesiados.....	27
5.1.2	Efeito do L-NAME sobre a resposta hipotensora induzida pelo EEAM em ratos normotensos não-anestesiados.....	29
5.1.3	Efeito dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor do EEAM em ratos normotensos não anestesiados.....	30
5.1.4	Efeito da atividade anti-hipertensiva do EEAM em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não-anestesiados.....	31
5.2	Efeito do EEAM em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de rato normotenso.....	32
5.2.2	Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por EEAM em artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato normotenso.....	33
6	DISCUSSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre a Pressão Arterial e Vasorrelaxamento

A pressão arterial (PA) pulsátil pode ser representada, matematicamente, através de um valor de PA não pulsátil, a PA média (PAM), a qual pode ser determinada pelo produto de duas variáveis que interagem complexamente: o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica total (RVPT). O DC é determinado pelo produto entre o volume de ejeção sistólico (VES) e a frequência cardíaca (FC). Deste modo, a FC participa da homeostase da PAM como um de seus determinantes primários, onde a PAM pode ser expressa pela equação: $PAM = DC \times RVPT$, e o DC expresso na seguinte equação: $DC = VES \times FC$. A PA pode ser influenciada pela ação de drogas sobre uma ou ambas as variáveis, onde o débito cardíaco pode ser diminuído ao inibir a contratilidade miocárdica ou ao diminuir a pressão de enchimento ventricular, sendo essa última conseguida através de ações sobre o tônus venoso ou sobre o volume sanguíneo, via efeitos renais. A resistência periférica pode ser reduzida por ações sobre o músculo liso, produzindo relaxamento direto dos vasos de resistência, ou ao interferir na atividade de sistemas que produzem constrição dos mesmos vasos, como é o caso do sistema nervoso simpático (HOFFMAN, 2006).

Portanto, os níveis de PA são regulados por meio de alterações na resistência total e no DC através da ação integrada dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino. Os mecanismos regulatórios promovem o controle da PA a curto prazo (neurais), expressando-se em segundos a minutos; a médio prazo (hormonais), em minutos e a longo prazo (aldosterona e sistema rim-volume), que pode ser expresso em horas ou dias (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

O controle neural é feito por meio de eferências do sistema nervoso autônomo, atuando sobre o coração e os vasos. Os barorreceptores arteriais, os quimiorreceptores e os receptores cardiopulmonares bem como a resposta sistêmica do sistema nervoso central (SNC) correspondem aos mecanismos neurais. Os barorreceptores, localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, quando estimulados por aumento súbito na PA, reduzem o tônus do sistema nervoso simpático (SNS) para os vasos e coração, promovendo redução da PA e FC pelas vias eferentes vagais, por ativação da via parassimpática (GUYTON, 2002; GUYENET,

2006; KAREMAKER; WESSELING, 2008) Os quimiorreceptores são responsáveis pela regulação local do tônus da musculatura lisa dos vasos, sendo ativados pela redução de O_2 ou excesso de CO_2 e H^+ (CARVALHO; COSTA, 1979; BERNE, 2009).

Os mecanismos hormonais implicam tanto na elevação da PA através do sistema catecolaminérgico (através da adrenalina e da noradrenalina), o sistema renina-angiotensina e o hormônio antidiurético, como na redução da PA através da liberação do peptídeo natriurético atrial e o sistema calicreína-cininas, assim como as substâncias produzidas localmente pelo endotélio (óxido nítrico, endotelinas e prostaglandinas) (EVORA et al, 1995).

A base do controle a longo prazo da PA é o sistema renal e de líquidos corpóreos. A regulação de volume dos líquidos corpóreos (volemia) é efetuada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, essencial ao equilíbrio hidroeletrólítico do corpo, que em conjunto são responsáveis pela elevação da PA. O rim atua na regulação da PA através da secreção da renina, a qual converte o angiotensinogênio (produzido pelo fígado) em angiotensina I (Ang I), que pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) é convertida em angiotensina II (Ang II). Este peptídeo atua no sistema cardiovascular promovendo vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca, hipertrofia cardíaca, nos rins reabsorção tubular de sódio, além de estimular a secreção de aldosterona (RUAN et al, 2010). O equilíbrio dos sistemas vasodilatadores e vasoconstritores se apresenta decisivo na regulação do tônus vascular, onde a PA elevada é causada por alterações da atividade dos mecanismos vasoativos. Na maioria dos modelos de hipertensão experimental, o aumento da PA é resultado do desequilíbrio entre a hiperatividade simpática e deficiência vasodilatadora, que pode ser visto em modelos de SHR e ratos Dahl e sal-sensíveis (PINTÉROVÁ et al, 2009). O sistema nervoso simpático é um dos maiores sistemas constritores envolvidos na regulação da PA. Este sistema induz contração da musculatura lisa vascular (MLV) por ativar o influxo de Ca^{2+} , através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v), aumentando os níveis de cálcio intracelular (PINTÉROVÁ; KUNEŠ; ZICHA, 2011).

Um dos principais determinantes do tônus vascular, a concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, é controlada através do potencial de membrana, ao mesmo passo que os níveis de cálcio intracelular também afetam o potencial de membrana, deste modo, o cálcio exerce um controle sobre este, regulado por canais iônicos, trocadores e ATPases dependentes de cálcio (PINTÉROVÁ; KUNEŠ; ZICHA, 2011). Os canais iônicos presentes na membrana plasmática da musculatura lisa vascular (MLV), assim como as células endoteliais desempenham papel fundamental na manutenção do tônus vascular. Do mesmo modo que os vasoconstritores dependem da elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$ para

induzir contração da MLV. As células endoteliais promovem relaxamento das células da musculatura lisa vascular (CMLVs) adjacentes por meio do aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Portanto, o nível da $[Ca^{2+}]_i$ nas células endoteliais e CMLVs é essencial para a precisa regulação de órgãos e tecidos (LEDOUX et al., 2006).

O influxo de Ca^{2+} do meio extracelular se dá através dos canais para cálcio dependente de voltagem do tipo lento (Cav-L), ativado em resposta a uma despolarização de membrana, e dos canais para Ca^{2+} operados por receptores, convém resaltar que a liberação de Ca^{2+} pelos estoques do retículo sarcoplasmático também são fundamentais para o aumento da $[Ca^{2+}]_i$. O influxo de Ca^{2+} na célula é favorecido pela diferença de gradientes químico dos íons Ca^{2+} (SANDERS, 2001) e a manutenção deste gradiente é realizado pela atuação das Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA) e do trocador Na^+/Ca^{2+} nas células CMLVs (FLOYD; WRAY, 2007). Além do cálcio, os íons fosfato representam ferramenta universal na transdução de sinal, pois ambos possuem capacidade de alterar os campos eletrostáticos e a conformação protéica (CALPHAM, 2007).

O processo contrátil da CMLVs inicia com o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ que, assim como o DAG, pode promover a ativação da proteína cinase C (PKC), a qual fosforila proteínas alvo específicas e Ca_v-L (WEBB, 2003). A estimulação da via da fosfolipase C (PLC), após a ativação de receptores de membrana por ligantes específicos, promove subsequentemente hidrólise dos fosfolipídeos de membrana 4,5-bisfosfato de inositol (PIP_2) e produção do diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) (CHALMERS et al, 2007). O IP_3 ativa receptores sensíveis ao IP_3 (IP_3R) presentes no retículo sarcoplasmático permitindo a liberação Ca^{2+} , que por sua vez ativa os receptores de rianodina, processo esse denominado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CIRC). O Ca^{2+} no meio intracelular das CMLVs forma um complexo com a calmodulina, Ca^{2+} -calmodulina [$(Ca^{2+})_4$ -CAM] (PAULIS et al, 2007). Este complexo promove à ativação da enzima cadeia leve de miosina cinase (MLCK), que promove a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) permitindo que a miosina interaja com a actina e o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na ligação da ponte cruzada da miosina com a actina e conseqüente contração muscular. O relaxamento muscular ocorre quando há redução da $[Ca^{2+}]_i$ interrompendo o complexo Ca^{2+} - calmodulina, inativando a MLCK e ativação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) que remove os fosfatos de alta energia (WEBB, 2003). Portanto, a Ca^{2+} -calmodulina e MLCP controlam a atividade da MLCK por meio de fosforilação e desfosforilação da MLC regulando assim o diâmetro dos vasos (HILL et al, 2006).

As células endoteliais promovem regulação do tônus vascular por meio da liberação de fatores relaxantes (FRDE) e contracturantes derivado do endotélio (FCDE), dentre estes fatores incluem espécies reativas de oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico (como exemplos: prostaciclina PGI_2 , ácidos epoxieicosatetraenóicos EETs e derivados da lipoxigenase), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e o óxido nítrico (NO) como fatores relaxantes, e endotelina, tromboxano A_2 (TXA_2) e prostaglandinas F_2 como fatores contracturantes (JIN et al, 2010).

O NO ativa diretamente a enzima ciclase de guanilil solúvel nas CMLVs produzindo o nucleotídeo cíclico monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que induz ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG), a natureza do EDHF ainda é desconhecida (JIN, 2010). Alguns receptores acoplados a proteína G, quando estimulados ativam a proteína G que estimula a atividade da adenilil ciclase (AC) a produzir o segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), o qual via ativação da proteína cinase A (PKA) altera a dinâmica do Ca^{2+} intracelular e a função contrátil (LUCAS et al, 2000). As proteínas cinase A e G agem através da fosforilação de canais como os canais para Ca^{2+} , reduzindo o influxo de Ca^{2+} , canais para K^+ , promovendo hiperpolarização e redução do influxo de Ca^{2+} pelos Cav-L; ativação da SERCA e PMCA com aumento conseqüente do sequestro e extrusão de Ca^{2+} , respectivamente; diminuição da mobilização de Ca^{2+} através da inibição da formação de IP3 e inibição do IP3R do RS; inibição da MLCK e ativação da MLCP com conseqüente redução da fosforilação da MLC (LUCAS et al., 2000; SOMLYO; SOMLYO, 2000). As fosfodiesterases (PDEs) inativam os nucleotídeos cíclicos regulando sua atividade (MATSUMOTO; KOBAYASHI; KAMATA, 2003; MAURICE et al., 2003).

1.2 Considerações Sobre Hipertensão Arterial e Ratos Espontaneamente Hipertensos

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), a hipertensão arterial é determinada como a elevação crônica da pressão arterial sistólica e/ou pressão arterial diastólica acima dos limites considerados normais para a população (WHO, 1978; WHO, 1996).

Para se utilizar essa conceituação, deve se considerar que o diagnóstico da doença depende de medidas de pressão arterial que são variáveis, necessitando assim, de critérios que definam normotensão e hipertensão. Esses critérios foram estabelecidos pela primeira vez por um grupo de especialistas da OMS no ano de 1958. Foi a partir desse trabalho que se tornou

possível a realização de estudos de base populacional com critérios metodológicos comparáveis em investigações de diversas procedências em estudos de prevalências, permitindo a melhor caracterização dos fatores de risco para a hipertensão nas diversas populações (LESSA, 1998).

A grande relevância da hipertensão arterial reside em está associada a anomalias estruturais no sistema cardiovascular (FOLKOW, 1982). Estas anomalias abrangem aumento na relação parede *versus* luz das artérias, aumento na resistência periférica, diminuição da complacência venosa (TAKESHITA e MARK, 1979), aumento da quantidade da massa cardíaca e muscular vascular lisa (FOLKOW, 1979; FOLKOW, 1982), além de anomalias intrínsecas na função renal (COLEMAM *et al.*, 1975).

A hipertensão arterial pode ser distinguida em primária ou essencial e secundária ou adquirida levando em consideração sua origem. A hipertensão essencial conceituada por Amodelo e Santello (1998, p.332) descreve que é “uma doença crônico-degenerativa de caráter multifatorial que inclui aspectos genéticos, neuro-humorais, dietéticos, vasculares e cardiogênicos”.

O fator primário da hipertensão é uma resistência vascular elevada, a qual pode ser controlada através de medicamentos.

O tratamento da hipertensão é constituído por diversos medicamentos, os quais incluem vários grupos de drogas tais como: inibidores da enzima conversora da angiotensina I (TOMHS, 1991; LUND-JOHANSEN e OMVIK, 1993), antagonistas dos canais de cálcio (TOMHS, 1991; MROCZEK *et al.*, 1991), bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos (AALKJAER *et al.*, 1987), diuréticos (FREIS, 1983; AALKJAER *et al.*, 1987), além dos antagonistas dos receptores da angiotensina II (BRUNNER *et al.*, 1993; KARLBERG, 1993). No entanto, algumas das substâncias desses grupos de drogas têm efeitos significativos sobre o sistema nervoso central. Dentre elas podemos mencionar: o propranolol (bloqueador não seletivo dos receptores beta-adrenérgicos), que provoca depressão do sistema nervoso central, e alucinações (GREENBLATT e SHADER, 1972), a clonidina (agonista alfa-adrenérgico) que diminui a atividade motora espontânea do comportamento condicionado de fuga, possui propriedades antipsicóticas além de sedação acentuada (LAVERTY e TAYLOR, 1969), a nifedipina e diltiazem (antagonistas dos canais de cálcio), que além de tontura, também provocam sedação (EBNER e DUNSCHÉDE, 1976; TANAKA, 1978).

Um dos grandes problemas para alcançar o sucesso do controle dos níveis pressóricos durante longos períodos está na adesão do paciente ao tratamento. Além disso, a maioria da população não tem poder aquisitivo ou mesmo acesso á medicina assistencial,

sendo esta uma das principais causas de desistência do tratamento. Esta adesão ao tratamento pode ser aumentada se for ofertado o Produto Natural/Plantas Medicinais que consegue reunir um enorme grupo de simpatizantes que “acreditam” na ação benéfica da planta e desta forma pode beneficiar o paciente reduzindo significativamente a morbidade/mortalidade. Além disto, as descobertas de novas substâncias com ação inédita irão aumentar a probabilidade quimiocombinatória, beneficiando maior número de pacientes (YUNES et al, 2001).

Neste contexto, torna-se necessário investir em novos estudos para identificar substâncias eficazes, seguras e de baixo custo, que possam oferecer novas ações terapêuticas contra a hipertensão arterial.

A fim de avaliar ferramentas farmacológicas que possam diminuir os danos causados pela hipertensão foi introduzido um novo modelo experimental de hipertensão, sem que nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico fosse necessário. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram desenvolvidos por uma reprodução genética meticulosa, entre irmãos e irmãs, que uniformemente resultou em animais naturalmente portadores de doença hipertensiva, em 100% dos descendentes (OKAMOTO et al., 1966). Desde então, o SHR é reconhecido como um excelente modelo de hipertensão experimental e pode servir como modelo de estudos clínicos da hipertensão essencial humana. A semelhança entre a hipertensão humana e a observada no SHR, inclui: a) a predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica, b) o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume e, c) igual resposta a tratamentos com drogas (UNDENFREIND; SPECTOR, 1972; TRIPPODO; FROHLICH, 1981). Por apresentar um relativo curto período de vida, ser pequeno, ter relativamente baixo custo, e ser de fácil manutenção em biotérios, os SHR são utilizados para estudo da história natural, determinantes genéticos e alterações fisiopatológicas da doença hipertensiva essencial.

Trippodo e Frohlich ressaltaram que, embora o SHR seja um excelente modelo da hipertensão essencial humana, há as seguintes ressalvas: 1) reconhecimento da improbabilidade de que ambas as formas de hipertensão espontânea (rato e o homem) sejam expressões idênticas de uma doença hipertensora determinada geneticamente; 2) ambas têm origem poligênica e são influenciadas por fatores ambientais; 3) sendo o controle cardiocirculatório multifatorial, certos mecanismos pressores não se expressam, necessariamente, em ambas as situações; 4) o conceito fisiológico de que o desequilíbrio de um mecanismo regulatório implica na expressão de um outro mecanismo, isto implica que alterações secundárias, por exemplo, adaptativas, devam ocorrer nos dois modelos. Independentemente da controvérsia quanto à

similaridade, ou não, entre o SHR e a hipertensão essencial do homem, este modelo tem se revelado bastante útil para melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos, quer do próprio modelo em si, quer da hipertensão essencial do homem. Embora a hipertensão dos SHR seja de desenvolvimento espontâneo, fatores ambientais tais como, ingestão exagerada de sódio (LOUIS; Tabei; SPECTOR, 1971), estresse (YAMORI et al., 1969), alterações sociais (HALLBACK; ISAKSSON; NORESSON, 1975), e alterações do ciclo claro/escuro afetam esse desenvolvimento

1.3 Considerações Sobre Plantas Medicinais

O uso de espécies vegetais com finalidades terapêuticas é uma prática antiga que surgiu da necessidade humana em adaptar e modificar os recursos naturais para seu próprio benefício (SCHULZ; HANSEL e TYLER, 2002). Nos dias atuais, o emprego destas plantas como fonte de recurso terapêutico ainda persiste (DI STASI, 1996). E mesmo que poucos destes vegetais tenham eficácia, segurança e mecanismos de ação conhecidos, cerca de 80% da população já usou alguma planta na busca de alívio de alguma sintomatologia desagradável (VORA e MANSOOR, 2005). Vale também ressaltar que em algumas comunidades, a utilização destas é um dos únicos recursos na prevenção e tratamento de enfermidades (MACIEL; DIAS e MEDEIROS 2004). Foi este hábito que norteou o tratamento farmacológico de doenças, bem como o surgimento da produção de medicamentos a partir de fontes naturais (SCHULZ; HANSEL e TYLER, 2002).

Através de uma perspectiva histórica existem relatos do uso de plantas medicinais a mais de 2000 anos, por isso, não seria contra-senso admitir que muitas destas, possuem ações específicas e estão livres de efeitos colaterais perigosos (SCHULZ; HANSEL e TYLER, 2002). Caso contrário, o conhecimento sobre suas indicações e efeitos não persistiriam. Entretanto, para utilização racional de espécies vegetais como medicamentos, é necessário um maior avanço científico da pesquisa farmacológica. Pois estes avanços proporcionariam também a avaliação de substâncias com propriedades curativas atribuídas à planta e sua transformação em produtos medicinais seguros (PACHU, 2007).

Vale ressaltar que 40% dos fármacos empregados atualmente foram desenvolvidos de fontes naturais, destes 25% são de plantas (CALIXTO, 2003). Como exemplo de medicamentos que surgiram através de estudos com plantas, pode-se citar: a) morfina, um hipnoanalgésico, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*; b) os alcalóides vincristina e

vimblastina, provenientes da *Catrananthus roseus*, utilizados como quimioterápicos (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006); c) quinina, extraída da casca da árvore *Cinchona*, empregada como antimalárico; d) digoxina, glicosídeo cardiotônico proveniente da planta *Digitalis lanata* e usada na insuficiência cardíaca e e) reserpina proveniente do arbusto *Rauwolfia serpentina*, utilizada no tratamento da hipertensão leve e moderada (BARREIRO, 1990; SCHULZ; HANSEL e TYLER, 2002; KOROLKOVAS e BURKHALTER, 2008).

No Brasil e no mundo o uso de plantas medicinais como tratamento alternativo de doenças como as que atingem o sistema cardiovascular cresce significativamente. Com base nestes dados, diversos vegetais têm sido estudados com objetivos de fornecer bases científicas para tais aplicações e ampliar o arsenal terapêutico de doenças como a hipertensão (BASTOS et al, 2009). Como exemplos podemos citar a *Curcuma longa* L., empregada no tratamento da HAS pela população e utilizada como corante e flavorizante de alimentos no sul da Ásia e África. Tem sua ação hipotensora, bradicárdica e vasorrelaxante comprovadas em ratos (ADARAMOYE e MEDEIROS, 2008). Outro exemplo é o diterpeno pimarane ácido *ent-pimara-8(14),15-dien-19-oic* isolado das raízes da *Vigueira arenaria*, empregada pela população javanesa como anti-hipertensiva, promove relaxamento em anéis de carótida e de aorta isoladas de rato, indicando que o ácido pode levar a redução da pressão por diminuir a resistência vascular periférica (HIPÓLITO et al, 2009). Além de *Sida cordifolia*, planta comum no nordeste brasileiro, conhecida como “Malva Branca” é utilizada pela população no tratamento de diversas doenças. Estudos observaram que a fração aquosa do extrato hidroalcoólico das folhas da planta em questão foi capaz de causar efeito hipotensor associado à bradicardia (MEDEIROS et al, 2006). Vale ressaltar que os mecanismos pelos quais os exemplos citados exercem suas ações ainda estão sendo investigados.

1.3 Considerações Sobre Família Apocynaceae e *Aspidosperma macrocarpum* Mart.

A família Apocynaceae é encontrada somente nas Américas (LORENZI, 1998), especialmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (WOODSON, 1951). No Brasil são catalogadas como Apocynaceae mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia. Diversas espécies de *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambu, carapanaúba, pau-pereiro, amargoso e quina (CORRÊA, 1931).

O gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) é constituído por 43 espécies e são extremamente importantes quanto o fornecimento de madeira nobre e fontes de alcalóides (RAFFAUF, 1964; GILBERT, 1966; ROBERT et al., 1983; LOPES et al. 1989), os quais são responsáveis por diversas atividades biológicas (PEREIRA et al., 2007).

As plantas do gênero *Aspidosperma* são empregadas popularmente para tratamento de várias doenças (PEREIRA et al., 2007). As cascas de espécies do gênero *Aspidosperma* são usadas comumente na forma de infusões pela medicina popular da região Amazônica, devido sua baixa toxicidade e a ausência de contra-indicações (GOTTLIEB; KUBITZKI; MESQUITA, 1978; FERREIRA et al., 2004).

A espécie *Aspidosperma quebracho blanco* é utilizada como antidisnéico, antiasmático, cicatrizante e febrífugo. Além disso, é utilizada contra transtornos digestivos na Argentina (SCARPA, 2000). As cascas de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron* são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia no tratamento da malária (BRANDÃO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2003).

O extrato etanólico de rejeitos de indústria madeireira de *A. polineuron*, foram descrito como positivo quanto à atividade antifúngica contra *Pseudomonas* (GRANATO et al., 2005). Estudos atribuem atividade antimalárica as espécies *A. megalocarpon* (WENIGER et al., 2001; MITAINE-OFFER et al., 2002) e *A. quebracho-blanco* (BOURDY et al., 2004) e *A. macrocarpon* (MESQUITA et al., 2007).

Os extratos hexânico e etanólico das folhas, madeira, casca do caule, raízes e cascas das raízes de *A. macrocarpon* apresentaram atividade antimalárica in vitro contra uma linhagem de *P. falciparum*, resistente a cloroquina (MESQUITA et al., 2007). O extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma tomentosum* promoveu hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não anestesiados, sendo este efeito hipotensor atribuído à diminuição da resistência vascular periférica (FURTADO, 2009).

Uma larga aplicação terapêutica é atribuída aos alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma* (BOURDY et al., 2004). Ensaio biológicos com alcalóides monoterpênicos isolados das cascas de *A. quebracho-blanco* (AIMI et al., 1991) demonstraram atividade bloqueadora α -adrenérgica e ação inibitória de contrações de músculo liso de tecidos de diferentes animais (DEUTSCH et al., 1994), além de ação hipotensora (LYON et al., 1973a) e analgésica (FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 1995). Destaca-se o potencial dos alcalóides provenientes de espécies deste gênero no tratamento de cânceres (KANSAL; POTIER, 1986).

Embora a literatura seja rica em estudos de espécies do gênero *Aspidosperma*, algumas espécies ainda são pouco relatadas ou até mesmo não apresente estudos quanto às atividades biológicas. Um exemplo é a espécie *A. macrocarpum*, onde não foi encontrado na literatura nenhuma atividade cardiovascular referente a esta planta, nem estudo fitoquímico quanto aos seus constituintes químicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo Extrato Etanólico Bruto das Folhas de *Aspidosperma macrocarpum* (EEAM) através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Específicos

- Testes *in vivo*

- Caracterizar os efeitos do EEAM sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos normotensos não anestesiados;
- Avaliar a atividade anti-hipertensiva do EEAM em ratos espontaneamente hipertensos.

- Testes *in vitro*

- Estudar o efeito do EEAM sobre artéria mesentérica superior isolada de rato, dando ênfase para a avaliação do papel do endotélio e dos fatores por ele liberados neste efeito.

3 MATERIAL

3.1 Obtenção do Extrato

A planta foi coletada em Planaltina (GO), Brasil, em novembro de 2007 e identificadas pelo Prof. José Elias de Paula, Universidade de Brasília (UnB). Amostras voucher (PEC N° 3767) foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UnB).

As folhas de *Aspidosperma macrocarpum* Mart. foram submetidas à secagem em estufa a 40°C por 72 horas com posterior trituração. O material seco e moído apresentou peso total de 1,64 kg. Este material foi submetido à extração com 20 L de etanol 90 % em percolador à temperatura ambiente por 96 h. A remoção do solvente foi realizada sob pressão reduzida em aparelho rotatório com posterior obtenção de 446 g do extrato etanólico das folhas de *Aspidosperma macrocarpum* (EEAM).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) e ratos espontaneamente hipertensos, ambos albinos, machos, com idade entre 3 e 4 meses. Os animais tiveram livre acesso à ração e água. A temperatura ambiente foi mantida em $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram realizados no período de 7h 00 às 17h 00 (*in vivo*) e de 7h 00 às 19h 00 (*in vitro*). Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFAL sob número 006339/2010-41.

3.3 Drogas e Reagentes

Durante o desenvolvimento dos experimentos, foram utilizadas diversas ferramentas farmacológicas tais como: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de haptarina (Roche). Cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (NPS), cremofor, (todos Sigma Chemical; EUA). As substâncias utilizadas foram dissolvidas em água destilada. As soluções foram diluídas em salina (experimentos *in vivo*) ou água destilada (experimentos *in vitro*) para concentrações desejadas.

O tiopental sódio foi obtido da Cristália (Brasil). O sal sódico de heparina foi obtido da Roche (Brasil).

3.4 Soluções Nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, foram utilizadas soluções nutritivas, cujas composições estão descritas a seguir, onde essas soluções foram preparadas com água destilada e tiveram seu ph ajustado para 7,4. Solução de Tyrode (mM): NaCl (158,3), KCl (4,0), CaCl₂ (2,0), MgCl₂ (1,05), NaHCO₃ (10,0), NaH₂PO₄ (0,42), C₆H₁₂O₆ (5,6). Solução despolarizante de Tyrode com 80 mM de KCl (mM): NaCl (82,3), KCl (80,0), CaCl₂ (2,0), MgCl₂ (1,05), NaHCO₃ (10,0), NaH₂PO₄ (0,42), C₆H₁₂O₆ (5,6).

4 MÉTODO

4.1 Ensaios Farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes formas de abordagens: uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais íntegros, e outra com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando órgãos isolados.

4.2 Ensaios Farmacológicos e Protocolos Experimentais *in vivo*

4.2.1 Medida direta da pressão arterial (PA) em ratos não anestesiados

Ratos foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (1: 20 v/v), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*). Para o protocolo de caracterização do efeito anti-hipertensivo o cateter foi implantado, seguindo o mesmo método, apenas na aorta abdominal, via artéria femoral esquerda.

A PA e FC foram medidas 24h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (BLPR, AECAD, Brasil) pré-calibrado acoplado a um amplificador (Modelo 04P, AECAD, Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital usando um software AQCAD (AVS Projetos, SP, Brasil) (Figura 1). Para cada ciclo cardíaco, o computador calculará pressão arterial sistólica, diastólica e média. O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas. Após os experimentos os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (i.v.).

Figura 1 - Sistema de aquisição de dados de PA em ratos não anestesiados.



Fonte: Autora, 2012

4.1.2 Efeito do EEAM na PAM em ratos normotensos não anestesiados

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 min., para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida foi administrado NPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 min., doses do EEAM (1, 5, 10 e 20 mg/kg , i.v.) foram administradas pela via endovenosa *in bolus* com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Os valores de PA foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração do extrato.

4.1.3 Verificação da participação do óxido nítrico (NO) no efeito induzido pelo EEAM na PAM em ratos normotensos não anestesiados

Após um registro controle obtido como descrito no item 4.1.2.1, os animais eram tratados com L-NAME (20 mg/kg , i.v.), um inibidor da sintase do NO (MONCADA; HIGGS, 1993). Após 30 minutos, uma nova curva dose-resposta para EEAM era obtida. Mudanças na

PAM induzidas por EEAM eram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com L-NAME.

4.1.4 Verificação da participação muscarínica no efeito induzido pelo EEAM em ratos normotensos não anestesiados

Após um registro controle obtido, os animais eram tratados com atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Após 30 minutos, uma nova curva dose-resposta para EEAM era obtida. Mudanças na PAM induzidas pelo EEAM eram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com atropina.

4.1.5 Avaliação da atividade anti-hipertensiva induzida pelo EEAM em ratos espontaneamente hipertensos não anestesiados (SHR)

Os valores de PAM foram registrados através do método de medida direta da pressão arterial descrita anteriormente. Os animais foram divididos em dois grupos de oito animais cada. Grupo controle, o qual foi administrado salina por via oral e o grupo tratado, que recebeu uma única dose de 200 mg/kg do EEAM via orogástrica. Os valores de PA foram registrados antes e após o tratamento (em 0, 1, 2, 4 e 6 horas após administração). A porcentagem de redução de PA foi calculada considerando os valores antes do tratamento como 100% de atividade.

4.2 Ensaio farmacológico e Protocolos Experimentais *in vitro*

4.2.1 Preparação para retirada da artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso com ou sem endotélio

Os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Através de uma incisão no abdome do animal, era retirada a artéria mesentérica superior e colocada em um recipiente (placa de Petry) contendo solução nutritiva previamente aquecida, no qual o tecido conectivo e adiposo foi removido e a camada muscular seccionada em anéis medindo aproximadamente 1 – 2 mm de comprimento. Estes anéis foram acondicionados, por meio de hastes, em cubas de vidro (com capacidade máxima de 5ml) contendo solução nutritiva de Tyrode sob temperatura constante de 37° C e aerada com solução carbogênica, 95% O₂ e 5% CO₂. Os

anéis foram suspensos por linhas de algodão, as quais estavam fixas a um transdutor de força (ANCAD 1604, AVS Projetos, Brasil) e acoplado a um sistema de aquisição de dados (DATAQ, AVS Projetos, SP, Brasil) para o registro das contrações isométricas (Figura 2). Cada anel era submetido a uma tensão constante de 0,50 g por um período de 60 minutos. Durante este tempo, o meio nutritivo era trocado a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Figura 2 - Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para artéria mesentérica.



Fonte: Autora, 2012.

4.2.2 Efeito do EEAM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso

Após o período de estabilização, a presença (Figura 3) ou ausência (Figura 4) de endotélio foi confirmada através da administração de acetilcolina (10^{-4}M) e após a estabilização da terceira contração (5 a 10 minutos), concentrações crescentes do EEAM foram adicionadas a cuba de maneira cumulativa na fase tônica, tanto em anéis com endotélio como em anéis sem endotélio.

Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela acetilcolina correspondeu a 80%. Para a execução dos protocolos experimentais em artérias desprovidas de endotélio vascular, a camada íntima foi removida mecanicamente por meio da fricção de uma cânula metálica no lúmen do vaso.

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo EEAM (0,03 – 300 µg/ml), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraindidos com FEN com endotélio funcional

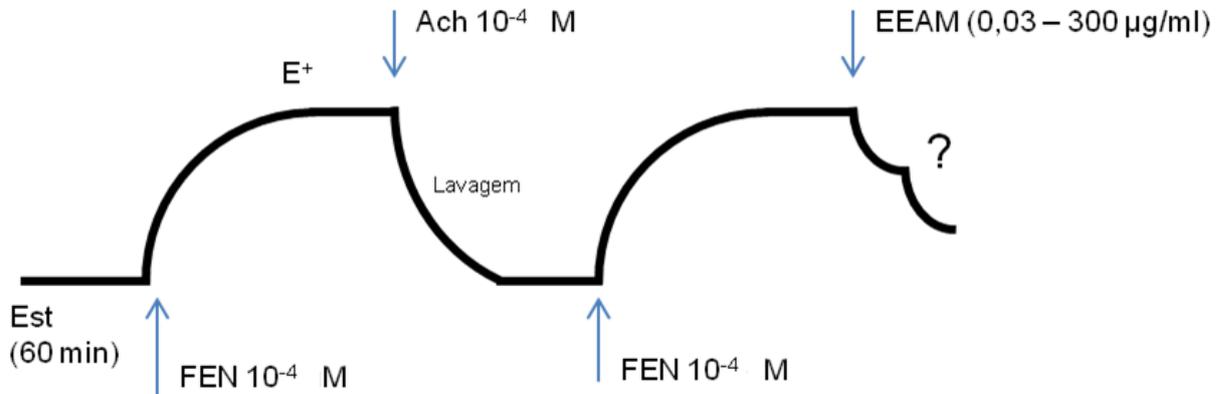
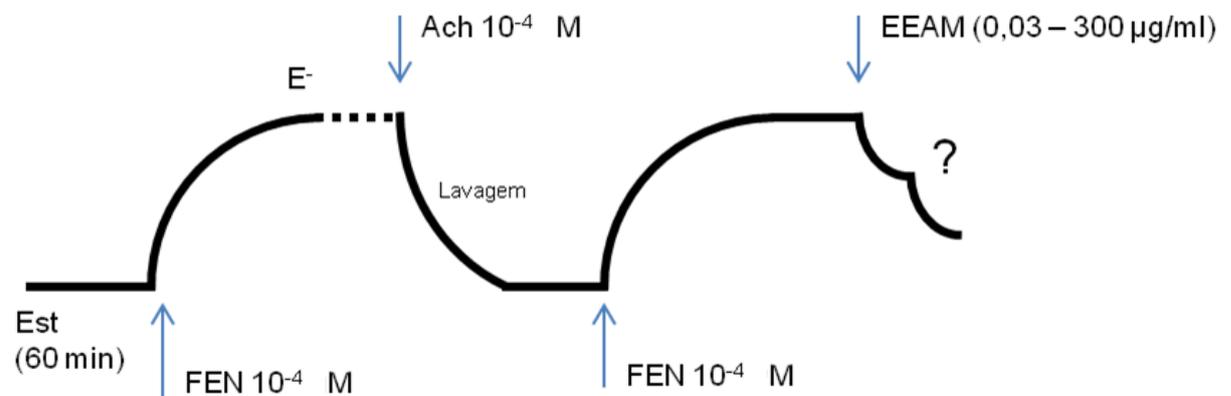


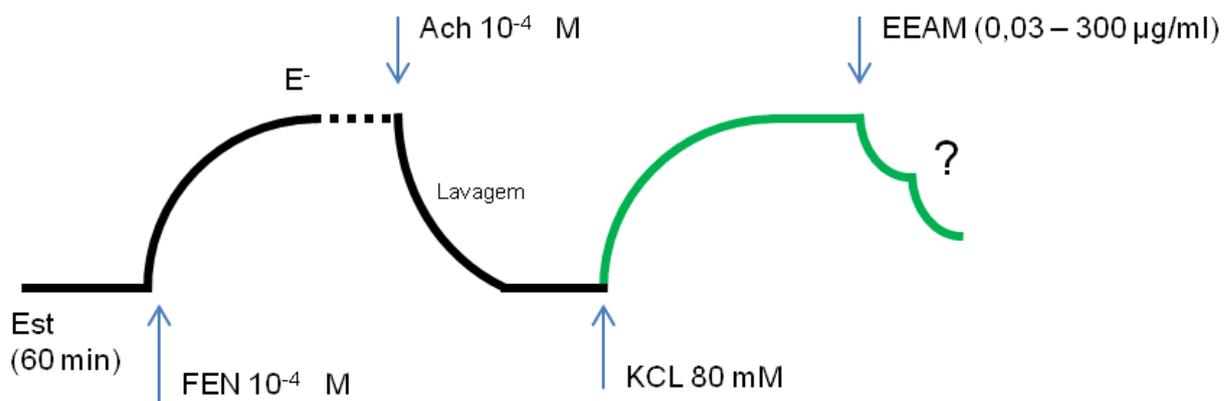
Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo EEAM (0,03 – 300 µg/ml), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraindidos com FEN sem endotélio funcional.



4.2.3 Efeito do EEAM sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.3, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de K^+ (KCl 80 mM) que promove uma despolarização da membrana plasmática gerando a ativação dos canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem (Ca_v) com conseqüente influxo de Ca^{2+} e contração (REMBOLD, 1996). Este processo foi então repetido com o objetivo de se obter duas concentrações com magnitude similar para o KCl 80mM. No componente tônico e sustentado da segunda contração, com o tempo médio de 40 minutos para a estabilização, foi adicionado a cuba concentrações crescentes do EEAM (0,03 - 300 μ g/mL) de maneira cumulativa (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EEAM (0,03 – 300 μ g/mL), sobre a contração induzida por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional.



4.3 Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Foram realizadas teste “*t*” de Student não-pareados, para análise de diferença entre as médias e ANOVA “one way” seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o valor para “*p*” foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). As curvas foram obtidas através de regressão não linear. A concentração capaz de

induzir 50% de uma resposta máxima (CE_{50}) foi obtida através de regressão não-linear. O valor de E_{max} corresponde à média percentual de relaxamento do EEAT para cada condição estudada. Toda a análise estatística e plotagem das curvas e gráficos foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos do EEAM sobre PAM em ratos Normotensos não anestesiados

Após um período de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, a administração de maneira randômica das doses EEAM (1, 5, 10 e 20 mg/kg i.v.), promoveu uma hipotensão transitória ($-17,5 \pm 2$; $-12,4 \pm 2,1$; $-12,5 \pm 2,4$; e $-17,2 \pm 1,9$ mmHg, respectivamente) de maneira independente de dose em ratos normotensos não anestesiados (Gráfico 1).

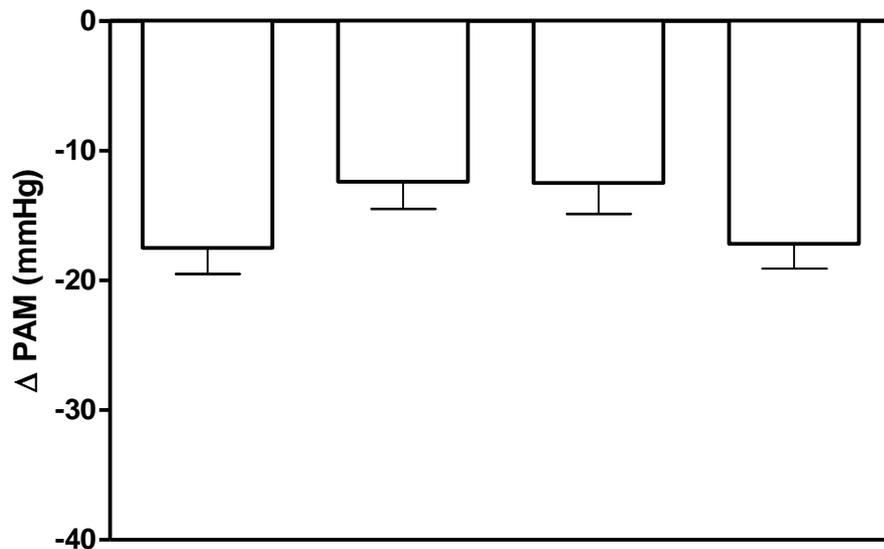


Gráfico 1 - Efeito hipotensor e bradicárdico induzido pela administração aguda de doses randomizadas do EEAM (1, 5, 10 e 20 mg/kg; i.v.) em ratos normotensos não anestesiados (n = 6).

5.2 Efeito do L-NAME Sobre a Resposta Hipotensora Induzida pelo EEAM em Ratos Normotensos Não Anestesiados

Em 6 animais, o L-NAME (20 mg/kg, i.v.) reduziu a resposta hipotensora induzida por EEAM significativamente nas doses de 10 e 20 mg/kg ($-8,8 \pm 3,5$; -9 ± 2 ; $-2,8 \pm 1,6$ e $-5,8 \pm 0,6$ mmHg, respectivamente) (Gráfico 2).

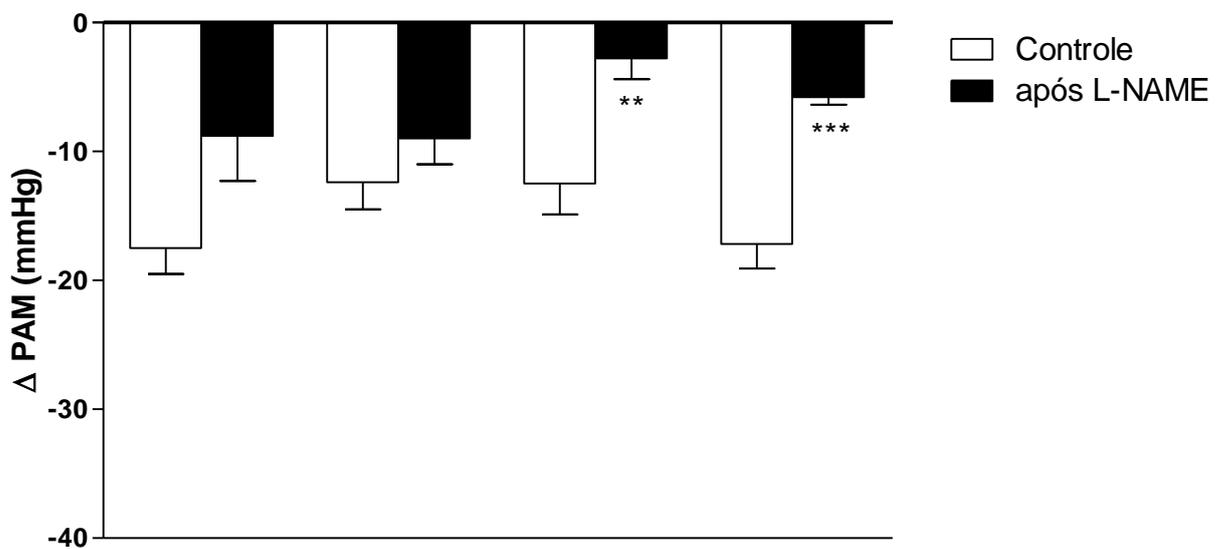


Gráfico 2 - Efeito do L-NAME (20 mg/kg; i.v.) sobre a resposta hipotensora induzida pela administração aguda de doses crescentes do EEAM (1; 5; 10 e 20 mg/kg, i.v.) em ratos normotensos não anestesiados (n = 6). **p < 0,01 e *** p < 0,001 *versus* controle.

5.3 Avaliação da Participação dos Receptores Muscarínicos no Efeito Hipotensor do EEAM em Ratos Normotensos Não Anestesiados

A resposta hipotensora foi significativamente abolida e revertida na presença de atropina ($16,6 \pm 7,7$; $20,3 \pm 5,6$; $19,5 \pm 3,8$; $35 \pm 8,8$ mmHg, respectivamente) (Gráfico 3).

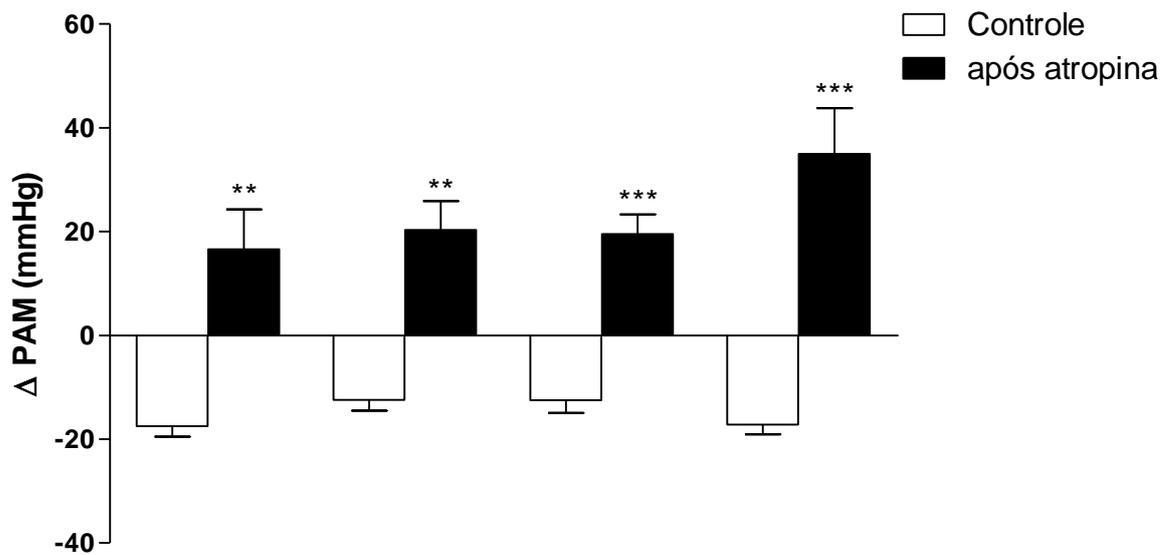


Gráfico 3 - Efeito da atropina (2 mg/kg; i.v.) sobre a resposta hipotensora induzida pela administração aguda de doses crescentes do EEAM (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.) em ratos normotensos não anestesiados (n = 6). * p < 0,05; **p < 0,01 e *** p < 0,001 *versus* controle.

5.4 Efeito da atividade anti-hipertensiva do EEAM em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não anestesiados

Neste protocolo experimental foram utilizados animais espontaneamente hipertensos (SHR) divididos em dois grupos: Grupo Controle, tratado com veículo e Grupo Tratado, recebeu EEAM (200 mg/kg, v.o.). A PAM do Grupo Controle não foi alterada, porém a PAM do Grupo Tratado, quando comparado com o grupo controle, foi significativamente reduzida após 2 horas da administração do extrato (Gráfico 4).

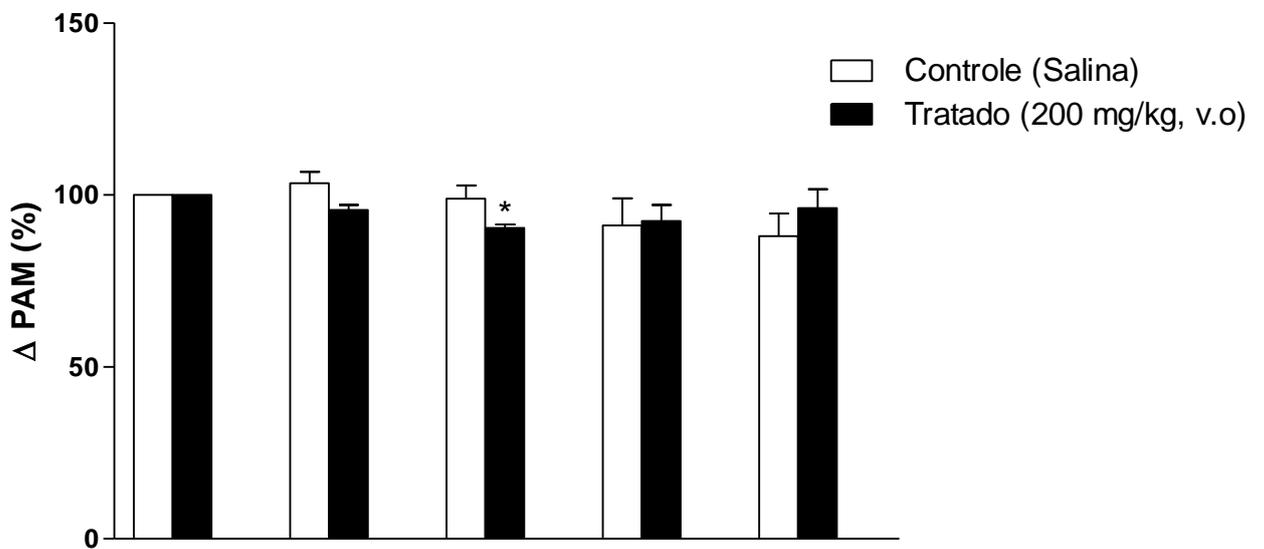


Gráfico 4 - Efeito da administração oral do EEAM (200 mg/Kg, v.o.) sobre a PAM em ratos espontaneamente hipertensos não anestesiados (n = 6) nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 h após o tratamento. * $p < 0,05$ versus Controle.

5.5 Efeito do EEAM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos com e sem endotélio

Após pré-contração com FEN (10^{-4} M), EEAM (0,03-300 $\mu\text{g/ml}$) promoveu vasorrelaxamento, de maneira dependente de concentração ($\text{pD}_2 = 1,93 \pm 0,08$ $\mu\text{g/ml}$ e $E_{\text{máx}} = 47,99 \pm 9,71\%$) em anéis com endotélio funcional. A remoção do endotélio não alterou a resposta vasorrelaxante induzida pelo EEAM ($\text{pD}_2 = 1,76 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$ e $E_{\text{máx}} = 64,26 \pm 5,16\%$) (Gráfico 5 e Tabela 1).

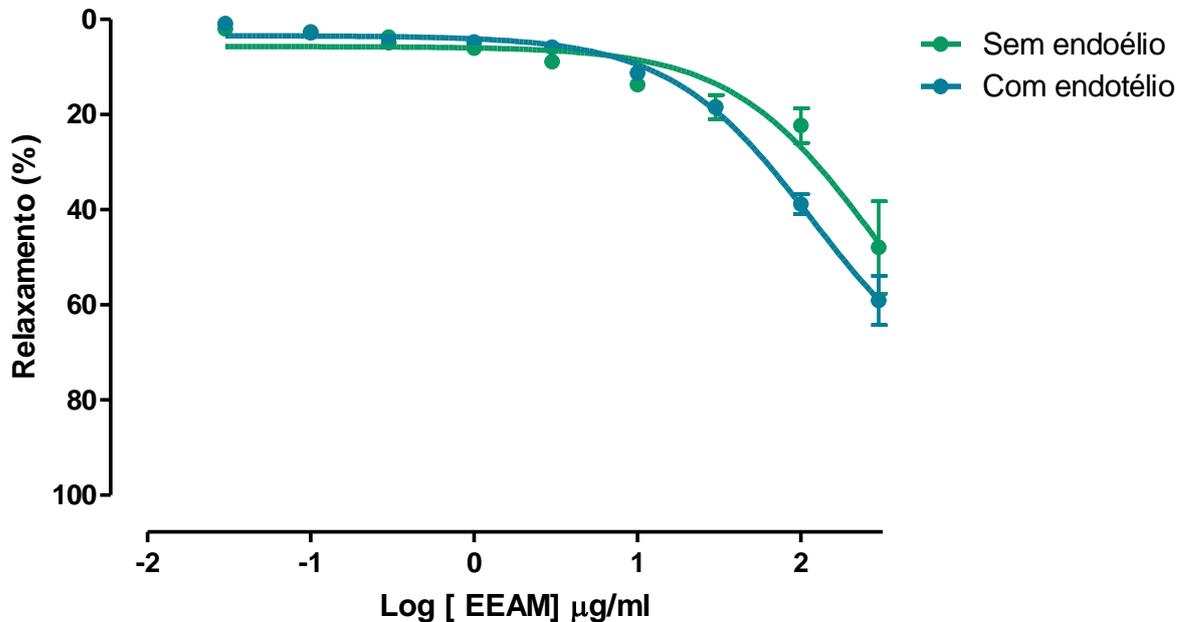


Gráfico 5 - Curva concentração resposta do efeito vasorrelaxante de EEAM (0,1 – 300 $\mu\text{g/ml}$), em artéria mesentérica superior isolada de rato wistar, com endotélio intacto (●) pré contraída com FEN 10^{-4} M , após endotélio removido(●). Os valores são expressos sendo média \pm erro padrão da média. (n = 6)

5.6 Efeito do EEAM sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotenso

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contraídos com um agente despolarizante KCl 80 mM, a adição cumulativa do EEAM (0,03-300 $\mu\text{g/ml}$) promoveu um efeito vasorelaxante dependente de concentração, com $\text{pD}_2 = 1,85 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$ e $E_{\text{máx}} = 46,11 \pm 0,28\%$ (Gráfico 6). Entretanto quando comparado ao vasorrelaxamento observado após pré-contração de anéis sem endotélio com FEN, o efeito vasorrelaxante de EEAM frente a pré-contrações com KCl 80 mM demonstrou-se menos eficaz (Tabela 1).

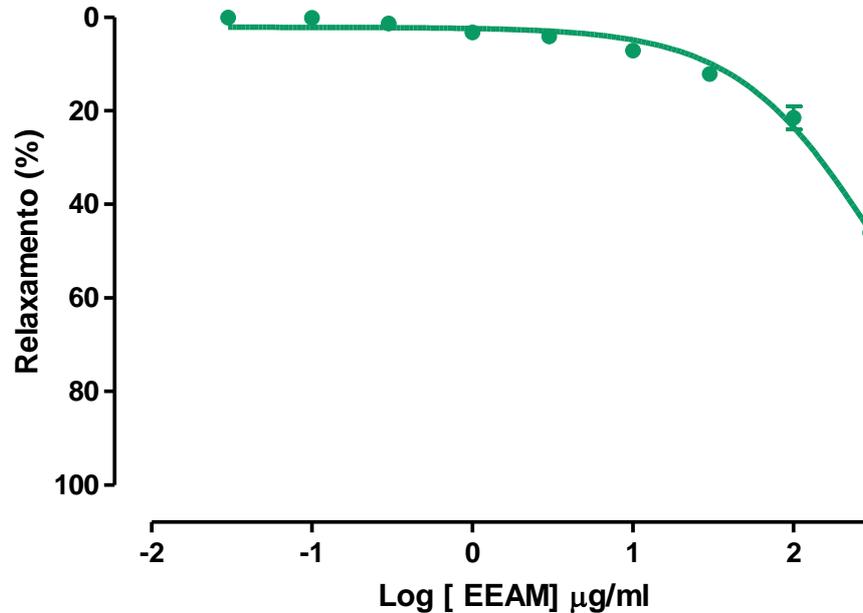


Gráfico 6- Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAM (0,03-300 $\mu\text{g/ml}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com KCl 80 mM (●) (n=6).

Tabela 1 - Comparação dos valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de EEAM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (n= 5)

Condições	$E_{m\acute{a}x}$	pD_2
Experimentais	(%) relaxamento	
FEN (E^+)	47,99 \pm 9,7	1,93 \pm 0,08
FEN (E^-)	64,26 \pm 5,16	1,76 \pm 0,04
Pré-contraídos KCl 80 mM (E^-)	46,11 \pm 0,28**	1,85 \pm 0,04

Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 5 experimentos. ** $p < 0,01$ *versus* FEN E^- . E^+ = com endotélio e E^- = sem endotélio.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as ações cardiovasculares induzidas pelo extrato etanólico das folhas de *Aspidosperma macrocarpum* Mart, investigando os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Dessa forma, foram utilizadas duas abordagens metodológicas: *in vivo* para avaliação da pressão arterial em ratos normotensos Wistar e espontaneamente hipertensos não anestesiados e *in vitro* utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos Wistar.

O principal achado deste trabalho foi que a administração aguda de EEAM promoveu hipotensão em ratos normotensos Wistar não anestesiados, provavelmente em consequência de uma diminuição da resistência vascular periférica, em função da ativação de receptores muscarínicos endoteliais. Também foi observado que EEAM promoveu efeito anti-hipertensivo em animais SHR.

Para evitar alterações no funcionamento dos principais sistemas de regulação da pressão, tais como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o barorreflexo (FLUCKIGER et al, 1985; DORWARD et al, 1985), realizamos os protocolos de medida direta da pressão arterial em animais não anestesiados, pois a anestesia altera as respostas autonômicas através da inibição de algumas sinapses do sistema nervoso central (KORNER et al, 1968; WHITE e MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al, 1982), além de outros efeitos sobre os sistemas de controle da pressão arterial (SMITH e HUTCHINS, 1980; FLUCKIGER et al, 1985).

Diante da inexistência de estudos cardiovasculares mais detalhados do extrato das folhas de *Aspidosperma macrocarpum*, nossos estudos foram conduzidos inicialmente por uma abordagem *in vivo* para caracterizar os efeitos induzidos pelo extrato em ratos normotensos. A administração aguda (i.v.) de doses randômicas do extrato induziu efeito hipotensor acompanhado independente de dose. Estes efeitos apresentaram rápido retorno aos valores basais.

A literatura relata que a estimulação de receptores muscarínicos presentes nas células endoteliais vasculares gera uma intensa vasodilatação, apesar da ausência aparente de inervação colinérgica na maioria dos vasos sanguíneos (BRUNNING et al, 1994). Os receptores envolvidos nesta resposta é o M₃ (EGLIN; WHITING, 1985; CHOO et al, 1986; CAULFIELD, 1993; SAWAYER et al, 1999). Esta estimulação induz um aumento na [Ca²⁺]_i nas células endoteliais vasculares, promovendo a formação e liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), a exemplo do NO

(MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) e dos derivados prostanóides, principalmente a prostaciclina (PGI_2). O endotélio através da liberação destes fatores vasoativos apresenta papel fundamental na regulação do tônus da musculatura lisa vascular. O tônus vascular por sua vez desempenha papel crítico na regulação fisiológica da pressão arterial (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Estudos sugerem que o desenvolvimento e manutenção da hipertensão envolvem a redução dos efeitos vasodiladores dependentes de endotélio sobre o tecido vascular (OJEWOLE, 2006). A existência de FRDEs foi postulada por Furchgott e colaboradores quando eles observaram que acetilcolina relaxava preparações aórticas através de mecanismos dependentes de endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Em condições fisiológicas, NO é liberado pelas células endoteliais e difunde-se para as células da MLV adjacente causando relaxamento (PÉREZ-VIZCAÍNO et al., 1999).

A formação do gás NO ocorre por meio da ativação da enzima dependente de Ca^{2+} NO-sintase (NOS), que catalisa a reação a partir do aminoácido L-arginina. A natureza lipofílica do NO facilita a difusão através das células da musculatura lisa adjacente, estimula GC solúvel (COHEN; VANHOUTTE, 1995), metabolizando o GTP e transformando-o em GMPc. O GMPc, por sua vez, ativa a PKG, resultando em ativação da bomba de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (SERCA) e aceleração da recaptção de Ca^{2+} para os estoques intracelulares (CORNWELL et al, 1991); ativação dos canais para K^+ ; fechamento dos canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem e fosforilação da MLCK, inativando-a. Todos estes eventos culminam em vasorrelaxamento (FURCHGOTT, 1983; VANHOUTTE et al, 1995), diminuindo assim a resistência vascular periférica. Além desta via dependente de GMPc, alguns trabalhos têm demonstrado que o NO também pode produzir seus efeitos por uma via independente de GMPc através da ativação direta de canais para K^+ sensíveis ao Ca^{+2} de grande condutância (BKCa) (BOLOTINA et al, 1994; MISTRY; GARLAND, 1998).

As respostas mediadas pelo NO podem ser bloqueadas por análogos da L-arginina, tal como o N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Este análogo apresenta-se como um inibidor competitivo da enzima NO-sintase (MONCADA; HIGGS, 1993). O bloqueio da síntese do NO com L-NAME causa um aumento na resistência vascular (REES et al, 1989) acompanhado por um aumento na pressão arterial e diminuição no fluxo sanguíneo em vários leitos vasculares (GARDINER et al, 1990; LEHERA et al, 1991).

Nestas condições, a resposta hipotensora foi significativamente reduzida nas últimas doses. Estes dados sugerem que o extrato possa estar reduzindo a resistência periférica total através da liberação de NO a partir do endotélio vascular.

A estimulação de receptores muscarínicos em células endoteliais induz vasorrelaxamento através da liberação de FRDES, como o NO (PETERSON et al, 1984). A estimulação desses receptores induz hipotensão decorrente da redução da RVPT (MEDEIROS, 2006).

A fim de verificarmos se a participação do NO na resposta induzida pelo extrato seria devido a uma estimulação de receptores muscarínicos endoteliais, utilizamos atropina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Após a administração da atropina, a resposta hipotensora revertida à hipertensão. Estes resultados sugerem que existe uma participação efetiva dos receptores muscarínicos do tipo M₃ na resposta hipotensora induzida por EEAM. O extrato poderia atuar provendo ativação destes receptores com consequente liberação de NO, uma vez que os resultados anteriores sugerem a participação do NO no efeito observado.

Em 1963, Okamoto e Aoki introduziram um novo modelo animal de hipertensão arterial, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sem que nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico fosse necessário, é reconhecido por ser um excelente modelo de hipertensão experimental e pode servir como modelo de estudos clínicos da hipertensão essencial humana. O principal objetivo de estudar modelo animal de hipertensão arterial é fornecer fundamentos teóricos e experimentais para melhor compreender os diferentes aspectos da hipertensão humana (FERRARI; BIANCHI, 1995).

Por isso, objetivamos investigar se o extrato também produzia efeito anti-hipertensivo, em SHR. Para isto, utilizamos o protocolo de caracterização do efeito sub-crônico da administração de uma única dose de 200 mg/kg via oral do extrato em ratos SHR não anestesiados. O extrato foi capaz de reduzir significativamente a PAM apenas na segunda hora, o que sugere que o efeito de EEAM pode ser devido a uma soma das alterações na pré-carga (PAD) e da pós-carga (PAS), indicando que estes efeitos podem ocorrer devido a alterações no tônus vascular e na resistência periférica (BERNE e LEVY, 2009) corroborando com os achados citados anteriormente.

Para confirmar a possível ação periférica vascular do EHFSC realizamos protocolos *in vitro* com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar. Escolhemos este modelo devido, aos vasos de pequeno calibre, como a artéria utilizada, apresentarem uma maior participação na regulação da pressão arterial e perfusão de órgãos, pois constituem o principal local de geração de resistência vascular (KWANA et al, 2004).

Para isto, efetuamos experimentos frente à pré-contrações induzidas por FEN. Deste modo, pudemos avaliar se EHFSC era capaz de promover um efeito vasorrelaxante. Como

sugerido pelos dados experimentais *in vivo*, o EHFSC promoveu vasorrelaxamento dependente de concentração. Para verificarmos se o efeito dependia da presença de endotélio, uma nova curva concentração-resposta do EHFSC foi obtida em anéis de artéria mesentérica sem endotélio. Nestas condições notamos que o efeito relaxante não foi alterado. Através destes resultados pudemos constatar que assim como foi sugerido previamente, o extrato exerce efeito vasorrelaxante, entretanto esta ação independe da integridade do endotélio para ser observada.

As contrações diferem quanto ao tipo de estímulos celulares e mecanismos envolvidos para gerar a contração, podendo ser denominado de acoplamento farmacomecânico ou eletromecânico (REMBOLD, 1996). No primeiro, farmacomecânico, primeiramente ocorre ligação do agonista com o receptor ativando a proteína fosfolipase C do tipo $G_{q/11}$. Esta ativação leva ao aumento dos segundos mensageiros IP_3 e DAG. O IP_3 liga-se a um receptor específico localizado no retículo sarcoplasmático (RS) permitindo a liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares que, por sua vez, ligam-se a uma proteína denominada calmodulina (CaM) para formação de um complexo (Ca^{2+} -CaM) iniciando com isto o mecanismo contrátil. Complementando este processo, por meio de um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana (V_m), há um aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura de canais para Ca^{2+} do tipo L, além de liberação do Ca^{2+} induzida pelo próprio íon através de receptores de rianodina (RYP) presentes na membrana do RS e por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} reverso (MCCARRON et al, 2003; THORNELOE; NELSON, 2005; SALAMANCA; KHALIL, 2005). Este tipo de acoplamento é observado nas contrações induzidas por FEN.

No acoplamento eletromecânico o aumento na $[Ca^{2+}]_i$ ocorre através do influxo de Ca^{2+} gerado pela despolarização de membrana. Este influxo pode ocorrer de forma direta como na presença da solução despolarizante, onde há aumento da concentração externa de K^+ ($[K^+]_e$) ou indiretamente através da ligação de agonistas aos seus receptores gerando abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (VOCC'S), ocasionando conseqüentemente a contração (REMBOLD, 1996).

Para caracterizar a especificidade da resposta vasorrelaxante do EEAM, realizamos uma curva concentração-resposta frente a contrações induzidas por um acoplamento eletromecânico através da adição de solução despolarizante de 80 mM de KCl (KCl 80) ao meio. Observamos de maneira semelhante ao resultado obtido com FEN, o extrato promoveu vasorrelaxamento de maneira dependente de concentração, demonstrando que EEAM induz relaxamento tanto sobre contrações induzidas por um acoplamento farmacomecânico (FEN),

como por um eletromecânico (KCl 80 mM), caracterizando assim um efeito vasorrelaxante inespecífico do extrato. Estes resultados apresentam um forte indício de que a vasodilatação possa envolver um passo comum na via de sinalização celular, visto que ambos agentes contraturantes utilizados promovem aumento intracelular dos níveis de Ca^{2+} (GALICIA et al, 2008). Possivelmente, o mecanismo vasodilatador do EHAO envolva a inibição do influxo de Ca^{2+} através do bloqueio dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem ou inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares.

Os resultados em conjunto sugerem que EEAM induz efeito hipotensor causado pela redução da resistência vascular periférica, provavelmente através da liberação de NO e/ou através da inibição direta do influxo e liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares nas células MLV interferindo na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O extrato também produziu atividade anti-hipertensiva possivelmente por reduzir a resistência vascular periférica.

REFERÊNCIAS

- AALKJAER, C.; HEAGERTY, A. M.; PETERSEN, K. K.; SWALES, J. D.; MULVANY M. J. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation-contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. **Circ. Res.**, 61: 181-186, 1987.
- ADARAMOYE, O.Q; MEDEIROS, I. A. Involvement of Na^+ - Ca^{2+} in the endothelium-independent vasorelaxation induced by *Curcuma longa*L. In isolated rat superior mesenteric arteries. **J Smooth Muscle Res**, v. 5, n. 44, p. 151-158, 2008.
- AIMI, N. *et al.* Novel indole alkaloids from cell suspension cultures of *Aspidosperma quebracho blanco* schlecht. **Tetrahedron Lett**, v. 32, n.37, p. 4949-4952, 1991.
- AMODELO, C.; SANTELLO, J.L. Hipertensão Arterial Essencial. In *Cardiologia*. SOCESP. São Paulo, 1998.
- AMORIM, I.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L. Flora e estrutura da vegetação arbustiva-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, n.3, v.19, p.615-23, 2005.
- ATLAS, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8, p. s9-s20, 2007.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29- 39, 1990.
- BARROSO, G.B. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária. v.3, p.326,1991.
- BASTOS, J.F.A et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 106, p. 331–337, 2009.
- BERNE, R, M.; LEVY, M. N. Hemodinâmica Cardíaca. In: BERNE, R, M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STATION, B. A. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. Cap. 14, p. 275-286, 2004.

BOLDI, A. Libraries from natural products-like scaffolds. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.8, p.281-286, 2004.

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

BRANDÃO, M. G. L. *et al.* Survey of medicinal plantas used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p.175, 1992.

BRODDE, O. E.; MICHEL, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacology Reviews**, v. 51, p.651-690, 1999.

BRUNNER, H. R.; NUSSBERGER, J.; WAEBER, B. Angiotensin II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. **J. Hypertens.**, 11 (suppl. 3): 53-58, 1993.

BRUNNING, T. A.; HENDRICKS, M. G. C.; CHANG, P. C.; KUYPERS, E. A. P.; VAN ZWIETEN, P. A. In vivo characterization of vasodilating muscarinic receptors in humans. **Cir Res**, v. 74, p. 912-919, 1994.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 22, p.162-195, 2008.

CALPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 14, p. 1047-1058, 2007.

CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Life Sci**. v. 61, p. 1619- 1630, 1997.

CALIXTO, J. B. YUNES, R. A. Medicamentos fitoterápicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Editora Argos. pp.297-315, 2001.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, 2003.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CAMARGO, A. C. M. DROGA Mercadoria ou medicamento?. **Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n 4, p. 30-45, 2005.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos caridovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 8: 30-40, 2001.

CAMPBELL, D. G.; HAMMOND, H. D.; Floristic Inventory of Tropical Countries: The Status of Plant systematics, Collections, and Vegetation, plus Recommendations for the Future, NY **Botanical Garden**: New York, 1989.

CARVALHO, A. P.; COSTA, A. F. Circulação e respiração: **Fundamentos de Biofísica e Fisiologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1979.

CHALMERS, S.; OLSON, M. L.; MACMILLAN, D.; RAINBOW, R. D.; McCARRON, J. CASTRO, M. E.; Rolim, M. O.; Mauricio, T. F. Prevenção da hipertensão e sua relação com o estilo de vida de trabalhadores. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 184-189, 2005.

CAULFIELD, M. P. Muscarinic receptors: Characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**, v.58, p. 323-331, 1993.

CHIN, Y. W.; BALAUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **Journal of Automated Methods & Management in Chemistry**, v. 8, p.E239-E253, 2006.

CHOO, L. K.; MALTA, E.; MITCHELSON, F. The affinity of some selective muscarinic receptor antagonists for the muscarinic receptor mediating endothelial-dependent relaxation of the rabbit and rat thoracic aorta. **J Pharm Pharmac**, v.38, p. 843-845, 1986.

CIRIGLIANO, M.; SUN, A. Advising patients about herbal therapies. **The journal of the American Medical Association**., v .280, N. 18, p. 1565, 1998.

CODY, R. J. The sympathetic nervous system and the renin–angiotensin–aldosterone system in cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 80, p. 9J-14J, 1997.

COELHO, F. B. R.; DALBELO, C. A.; LOLIS, S. Levantamento Etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COLEMAM, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes, **Pharmacol. Rev.**, 46: 205 – 229, 1994.

COLEMAN, T. G.; MANNING, R. D. Jr.; NORMAN, R. A. Jr. AND DECHEE, J. The role of the kidney in spontaneous hypertension. **Am. Heart J.**, 89: 94-98, 1975.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. v.2, p.771, 1931.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M. Alkaloids of *Aspidosperma pyriforme*. **Phytochemistry**, v.22, n.6, p. 1526-1528, 1983.

COHEN, A. C.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. **Circulation**, v. 92, n. 3337-3349, 1995.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5 ed., v.1: Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

CORNWELL, T. L.; PRYZWANSKY, K. B.; WYATT, T. A.; LINCOLN, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Mol. Pharmacol.** v. 40, p. 923–931, 1991.

CRACKOWER, M. A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v.417, n.20, p.822-828, 2002.

DHEIN, S.; VAN KOPPEN, C. J.; BRODDE, O-E. Muscarinic receptors in the mammalian heart. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 161-132, 2001.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Structural functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 29, p. 781-789, 1997.

DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal Science Food Agriculture**, v. 80, n.12, p. 1744-1756, 2000.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. um guia de estudo interdisciplinar. Univ. Estadual Paulista: São Paulo, p. 230, 1996.

DORWARD, P. K. *et al.* The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circulation Research**, v. 57, p. 618-633, 1985.

EBNER, F.; DUNSCHEDER, H. B. **Hemodynamics, therapeutic mechanism of action and clinical findings of Adalat use based on world-wide clinical trials.** In : Third Adalat Symposium, edited by A. D. Jatene and P. R. Lichtlen, pp. 283-300, Excerpta Medica, Amsterdam, 1976.

EGLER, R.M., HEDGE, S.S., WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacology Reviews** v. 43, p. 109–142, 1986.

EGLER, R. M.; WHITING, R. Determination of the muscarinic receptor subtype mediating vasodilatation. **Br J Pharmacol**, v. 84, p. 3-5, 1985.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas.** In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS, Editora da UFSC, cap. 6, p.91-99, 2001.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; DISCIGIL, B.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Endotélio e óxido nítrico: História, fisiologia e as primeiras observações relacionadas com a hipertensão arterial. **Hiper. Ativo**, v. 2, n. 2, p. 1-20, 1995.

FARNSWORTH, N. R., BINGEL, A. S. **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity.** Springer: New York. p. 61-73, 1997.

FELDER, C.C.; MA, A.L.; BRILEY, E.M., AXELROD J. - Muscarinic acetylcholine receptor subtypes associated with release of Alzheimer amyloid precursor derivatives activate multiple signal transduction pathways. *Ann N Y Acad Sci* 695: 15-8, 1993.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**. v. 93,p.515-524, 1988.

FERRARI, P.; BIANCHI, G. Lessons from experimental genetic hypertension, in: J. H. LARAGH; B. M. BRENNER. **Hypertension, pathophysiology, diagnosis and management.** 2 Ed. Raven Press Ltd, New York. p. 1261-1279, 1995.

FERREIRA, I. C. P. *et al.* **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 325, 2004.

FLOYD, R.; WRAY, S. Calcium transporters and signaling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 42, p. 467-476, 2007.

FLUCKIGER, J. P. *et al.* Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v.109, p. 105-109, 1985.

FOLKOW, B. Relationship between vessel design and hemodynamics along the precapillary resistance compartment in normo- and hypertension. **Blood Vessels**, 16: 277-280, 1979.

FOLKOW, B. Structure and function of the arteries in hypertension. **Am. Heart J.**, 114:938-948, 1982

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

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., **Principles of Medicinal Chemistry**, 4th ed., Williams & Wilkins: Media, 1995.

FREIS E. D. How diuretics lower blood pressure. **Am. Heart J.**, 106 : 185-187, 1983.

GALICIA, V. J.; ORTIZ-ANDRADE, R.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; IBARRA-BARAJAS, M.; GALLARDO-ORTIZ, I.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; ESTRADA-SOTO, S. Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium channel blockade. **Vascul Pharmacol**, v. 49, p. 26-31, 2008.

GAMBERINI, M.T.; LAPA, A.J.; **Mecanismo de Ação Hipotensora de Extrato Aquoso (EA) e Frações Purificadas da Baccharis trimera Mart. (Carqueja)**. IN: XIV Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 1996, Florianópolis, Resumos, p.110.

GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; KEMP, P. A.; BENNETT, T. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, long evans rats. **Br J Pharmacol**, v. 101, n. 3, p. 625-631, 1990.

GARLAND, C.; PLANE, F.; KEMP, B.; COCKS, T. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends Pharmacol Sci**. v.16, p.23-30, 1995.

GUYTON, A. C. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v.252, n.5014, p.1813-1816, 1991.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of pressure. **Nature**, v. 7, p. 335-346, 2006.

GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 315-319. INPA, 1966.

GOMES, S. M. *Aspidosperma* Mart. et Zucc. (Apocynaceae) no Distrito Federal, Brasil e caracteres para o aprimoramento da taxonomia do gênero, 1997. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 1997.

GREENBLATT, D. J.; SHADER, R. I. On the psychopharmacology of beta-adrenergic blockade. **Curr. Ther. Res.**, 14 : 615-625, 1972.

GRYNBERG, A. Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids. **Journal of Human Hypertension**, v. 19, p. S25-S33, 2005.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature**. v.7, p.335-346, 2006.

HALLBACK, M.; ISAKSSON, O.; NORESSON, E. Consequences of myocardial structural adaptation on left ventricular compliance and the Frank-Starling relationship in spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiol Scand**. v. 94, p. 259-70, 1975.

HARVEY A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HARVEY, A. L. **Natural Product Pharmaceuticals: A Diverse Approach to Drug Discovery** Richmond, Surrey, UK: PJB Publications, 2001.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, p.480-484, 2007.

HILL M, A.; DAVIS, M. J.; MEININGER, G. A.; POTOCHNIK, S. J.; MURPHY, T. V. Arteriolar myogenic signalling mechanisms: Implications for local vascular function. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 34, p. 67-79, 2006.

HIPÓLITO, U. V et al. Mechanism underlying the vasorelaxant action of the pimarane *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol in the isolated rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 616, p. 183-191, 2009.

HOFFMAN, B. B. Terapia da Hipertensão. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S. L.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman – **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11^a ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p. 757-778, 2006

HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M.; BUCKLEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. **Ann Review Pharmacology and Toxicology**, v.30, p.633-673, 1990.

JACOME, R.L.R.P, et al. Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A.DC. (“pau-pereira”). **Química Nova**. v. n.26. p. 897-900, 2004.

JIN, X.; SATOH-OTONASHI-, Y.; ZAMAMI, Y. et al. Endothelial modulation of agonist-induced vasoconstriction in Mesenteric Microcirculation. **Pharmac Soc of Japan**. v. 130, n. 5, p. 723-728, 2010.

KANNEL, W. B. Elevated Systolic Blood Pressure as a Cardiovascular Risk Factor. **The American journal of cardiology**, v. 81, p.251-255, 2000.

KANSAL, V. K.; POTIER, P. The biogenetic, synthetic and biochemical aspects of ellipticine, an antitumor alkaloid. **Tetrahedron**, v. 42, n.9, p. 2389-2408, 1986.

KAREMAKER, J. M.; WESSELING, K. H. Variability in cardiovascular control: the baroreflex reconsidered. **Cardiovascular Eng**, v. 8, p. 23-29, 2008.

KARLBERG, B. E. Cough and inhibition of the renin-angiotensin system. **J. Hypertens.**, 11 (suppl 3): 49-52, 1993

KOHN, L. K. *et al.* Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p.110-115, 2006.

KORNER, P. I. *et al.* The effects of chlorolose-urethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **Journal of Physiology. (Land)**, v.199, p. 283-302, 1968.

KOROLKOVAS, A.; BURKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 2008.

KRIEGER, J. E. Hipertensão arterial: bases genéticas da hipertensão arterial. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 15: 24-26, 2000.

LAVERTY, R.; TAYLOR, K. M. Behavioural and biochemical effects of 2-(2, 6 dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride (ST 155) on the central nervous system. **Br. J. Pharmacol.**, 35: 253-264, 1969.

LEDOUX J. *et al.* Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LEHERA, V.; SALON, M. G.; MIRANDA-GUARDIOLA, F.; MONCADA, S.; ROMERO, J. C. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. **Am J Physiol**, v. 261, p. F1033-1037, 1991.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev**, v. 52, p. 375-414, 2000.

LYON, R. L. *et al.* Biological and phytochemical evaluation of plants. XI. Isolation of aspidospermine, quebrachidine, rhazinilam, (-)-pyrifolidine, and akuammidine from *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.62, n 11, p. 218-221, 1973a.

LYON R, L.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical evaluation of plants. XII. Isolation of acetylakuammidine from *Aspidosperma quebracho-blanco* leaves. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.62, n. 5, p.833, 1973b.

LOPES, J. N. C. *et al.* Preliminary screening of brasilian plant extracts for molluscicidal activity. **Planta Medica**, v. 55, n.4, p. 388, 1989.

LORENCE, A.; NESSLER, E. Molecules of interest. Camptothecin over four decades of surprising findings. **Phytochemistry**, v.65, p.2735-49, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum.p.352, 1998.

LOUIS, W. J.; TABELI, R.; SPECTOR, S. Effects of sodium intake on inherited hypertension in the rat. **Lancet**, v. 2, p. 1283-6, 1971.

LUCA, V.; LAFLAMME, P. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. **Physiology and Metabolism**. v.4, p.225-233, 2001.

LUND-JONANSES, P.; OMVIK, P. Cardiac effects of ACE inhibition. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 22(suppl.1): 536-540, 1993

MACGREGOR, G.A., WEBB-PEPLOE, K.M. A hypertension in the Elderly, **Am J Geriatr. Cardiol.** v.9, p. 130-137, 2000.

MACIEL, S.S; DIAS, K.L.G; MEDEIROS, I.A. Calcium mobilization as the endothelium-independent mechanism of action involved in the vasorelaxant response induced by the aqueous fraction of the ethanol extract of *Albizia inopinata* G.P. Lewis (AFL) in the rat aorta. **Phytochemistry**, v.11, n. 2-3, p.130-1434, 2004.

MALUENDAS, E. W. B.; PEITZ, C. Yerbalatina Phytoativos, a menor distância entre você e a natureza. In: JÚNIOR, C. C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas**. Santa Catarina: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais pp. 208-211, 2004..

MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Phosphodiesterases in the vascular system. **J. smooth muscle res**, v. 39, p. 67-86, 2003.

MAURICE, D. H.; PALMER, D.; TILLEY, D. G. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. **Mol Pharmacol**, v. 64, p. 533–546, 2003.

MCCARRON, J. G et al. Sarcolemma agonist induced interactions between InsP3 and ryanodine receptors in Ca²⁺ oscillations and waves in smooth muscle. **Biochem Soc Transactions**, v. 31, p. 920– 924, 2003.

MEDEIROS, I.A et al. Cardiovascular effects of *Sida cordifolia* leaves extract in rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 19-27, 2006.

MENEZES, I. A.C.; MOREIRA, I. J. A.; CARVALHO, A, A.; ANTONIOLLI, A, R.; SANTOS M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p.41-47, 2007.

MESQUITA M.L. *et al.* In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 165–170, 2007.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. **Trends Pharmacol Sci**, s. 5, p. 12-16, 1984.

MISTRY, D. K.; GARLAND, C. J. Nitric oxide (N)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, v. 124, n. 6, p. 1131-1140, 1998.

MITAINE-OFFER, A.-C. *et al.* Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v. 9, p. 142-145, 2002.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. **Trends Pharmacology Science**, v. 5, p. 12-16, 1984.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MROCZEK, W. J.; BURRIS, J. F.; ALLENBY K. S. Effect of Amlodipine on 24-hour ambulatory blood pressure in hypertensive patients. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 17 (suppl. 1): S13-S15, 1991.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiol Res**, v. 70, p. 921-951, 1990.

NASA, Y. *et al.* Positive inotropic and negative chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **Brit J Pharmacol**. v.105, n.3, p.696-702, 1992.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v.66, p.1022-1037, 2003.

NITSCH, R. M.; GROWDON, J. H. Role of neurotransmission in the regulation of amyloid beta-protein precursor processing. **Biochem Pharmacol**. 47(8): 1275-84, 1994.

OATES, J. A.; BROWN, N. J. **Anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão.** In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill. Cap. 32, p.657-678, 2003.

OJEWOLE J A. Vasorelaxant and Hypotensive Effects of *Sclerocarya Birrea* (A Rich) Hochst (Anacardiaceae) Stem Bark Aqueous Extract in Rats. **Cardiovasc J South**; v. 17, p. 117–123. 2006.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J.**, v. 27, p. 282-293, 1963.

OKAMOTO, K. *et al.* Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J.** v.30, p.703-716, 1966.

OLIVEIRA, F. Q. *et al.* Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.2, p. 23-31, 2003.

OPIE, L. H. **The Heart-Physiology, from cell to circulation.** Philadelphia – New York, Raven, 1998.

PACHU, C.O. **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos.** PB: Campina Grande, 2007. Originalmente apresentado como tese de doutorado, Universidade Federal de Campina Grande, 2007.

PAGE, C. P.; CYRTIS, M. J. C.; SUTTIER, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFAMANN, B. B. **As drogas e o sistema cardiovascular.** Farmacologia Integrada. 1ª ed., Editora Manole, São Paulo-SP, 153-193, 1999.

PAULIS L, LÍŠKOVÁ S, PINTÉROVÁ M, DOBEŠOVÁ Z, KUNEŠ J, ZICHA J: Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats: the influence of chronic captopril treatment. **Acta Physiol (Oxf)** v. 191, p. 255-266, 2007.

PEREIRA, M. M. *et al.* Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PINTÉROVÁ, M.; LÍŠKOVÁ, S.; DOBEŠOVÁ, Z.; BEHULIAK, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Impaired Control of L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels in Experimental Hypertension. **Physiol. Res.** v. 58, s. 2, S43-S54, 2009.

PINTÉROVÁ, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Altered Neural and Vascular Mechanisms in Hypertension. **Physiol. Res.** v. 60, p. 381-402, 2011.

RAFFAUF, R. F. Some chemotaxonomic considerations. **Lloydia**, v. 27, n.4, p. 286-298, 1964.

REMBOLD, C. M. Eletromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány, M. *Biochemistry of smooth contraction*. San Diego: **Academic Press**, p. 227-239, 1996.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J., MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc Natl Acad USA**, v. 86, p. 3375-3378, 1989.

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**, INPA: Manaus, 1999.

ROBERT, G. M. T. *et al.* *Aspidosperma de Guyane: alcaloides d'Aspidosperma markgravianum*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n.5, p. 694-707, 1983.

ROSSKOPF, D.; MICHEL, M. C. Pharmacogenomics of G Protein-Coupled Receptor Ligands in Cardiovascular Medicine. **Pharmacology Review**, v. 60, p. 513–535, 2008.

RUAN, C-H.; DIXON, R. A. F.; WILLERSON, J. T. M.; RUAN, K-H. Prostacyclin for Pulmonary Arterial Hypertension. **Texas Heart Institute Journal**, v. 37, n. 4, p. 391-399, 2010.

RUBIO, R.; BERNE, R. M. Release of adenosine by normal myocardium in dogs and its relationship to regulation of coronary resistance. **Circ Res**, 25: 407-415, 1969.

SALAMANCA, D. A; KHALIL, R. A. Protein kinase C as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochemic Pharmacol**, v. 70, p. 1537-1547, 2005.

SANDERS, K. M: Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **J Appl Physiol**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SAWAYER, D. B. *et al.* Direct pharmacological comparison of the muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rabbit thoracic aorta. **Gen Pharmacol**, v.32, p. 445-452, 1999.

SCHULZ, V; HANSEL, R; TYLER, V. **Fitoterapia racional**. 1 Ed. Barueri: Manole, 2002.
SNEADER, W. **Drug Prototypes and their Exploitation**. Chichester, UK: Wiler, 1996.

SMITH, T L; HUTCHINS P. M. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Am J Physiol**, v. 238, p. H539-H544, 1980.

SONKUSARE, S. *et al.* Vascular calcium channels and high blood pressure: **Pathophysiology and therapeutic implications a Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 131-142, 2006.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J Physiol**, v. 522, p. 177-185, 2000.

SOTTOMAYOR, M. *et al.* Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Phytochemistry Reviews**, v.3, p.159-71, 2004.

STEVENS, P. F., 2001. **Angiosperm Phylogeny Website. Version 7**. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em Dezembro de 2011.

SUZUKI, A. *et al.* Short and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**. v. 15, p. 351-357, 2002.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Characterization of vagal pathways mediating gastric accommodation reflex in rats. **J Physiol**. v.504, n.2, p.479-488, 1997.

TAKESHITA, A.; MARK A. L. Decreased venous distensibility in borderline hypertension. **Hypertension**.1: 202-206, 1979.

TANAKA, Y. *et al.* Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **Br J Pharmacol**. v.128, p.1602-1608, 1999.

TESTAI, L. *et al.* Cardiovascular effects of *urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. **J Ethnopharmacol**. v.81, p. 105-109, 2002.

TOMHS H. Treatment of mild hypertension. **Arch. Intern Med.**, 151, 1991.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canad J Physiol Pharmacol**, v. 83, p. 215-242, 2005.

TORRES, L. M. B. *et al.* Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55. p. 617-619, 2000.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: man and rat. **Circ Res.**, v. 48, p. 309-319, 1981.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

UNDENFREIND, S.; SPECTOR, S. Spontaneously hypertensive rat. **Science**. v. 176, p. 1155-6, 1972.

VAINIO, H., BIANCHINI, F., Prevention of disease with pharmaceuticals. **Pharmacol. Toxicol.** v.3, p. 111-118, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MARCIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v.28, n.3, 2005.

VANE, J.R.; ANGARD, E.E.; BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med.** v.323,p. 27-36, 1990.

VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M.; MOMBOULI, J. V. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. **Am J Cardiol**, v. 76, p. 3E-12E, 1995.

VORA, C. K.; MANSOOR, G. A. Herbs and alternative therapies: relevance to hypertension and cardiovascular diseases. **Current Hypertension Reports**, v. 7, n.4, p.275-280, 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.

WENIGER, B. *et al.* Antiprotozoal activities of Colombian plantas. **Journal Ethnopharmacology**, v.78, n.2-3, p. 193-200, 2001.

WESS J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. **Critical Review Neurobiology**, v. 10, p. 69-99, 1996.

WHITE, S. W.; McRITCHIE, R. J. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 51, p. 17-31, 1973.

WOODSON, R.J. Studies in the Apocynaceae. VIII An Interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.38, p.119-204, 1951.

YAMORI, Y.; MATSUMOTO, M.; YAMABE, H.; OKAMOTO, K. Augmentation of spontaneous hypertension by chronic stress in rats. **Jpn Circ J**. v. 33, p. 399-409, 1969.

YUNES, R. A, KUROSHIMA, K. N, de CAMPOS, F, de SOUZA, M. M, DELLE MONACHE, F, CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. **Z Naturforsch [C]**. 56: (9-10) 703-6 2001.

ZIMPFER, M.; MANDERS, W. T.; BARGER, A. C.; VATNER, S. F. Pentobarbital alters compensatory neyribak humoral mechamism in response to hemorrhage. **American Journal of Physiology**, v. 243, p. H713-H721, 1982.