

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA-ESENFAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-PPGCF

EMANUEL TENÓRIO PAULINO

**Efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* (colônia) em ratos wistar submetidos ao infarto por método simpatomimético**

Maceió

2014

EMANUEL TENÓRIO PAULINO

**Efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* (colônia) em ratos wistar submetidos ao infarto por método simpatomimético**

Dissertação de Mestrado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

Maceió

2014

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária**  
**Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade**

P328e Paulino, Emanuel Tenório.  
Efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* (colônia) em ratos wistar submetidos ao infarto por método simpatomimético / Emanuel Tenório Paulino. – 2014.  
86 f. : il.

Orientadora: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 64-86.

1. *Alpinia speciosa* – Atividade cardioprotetora. 2. Infarto do miocárdio - Ratos. 3. Isoproterenol. 4. Plantas medicinais. I. Título.

CDU: 615.221

Folha de Aprovação

AUTOR: EMANUEL TENÓRIO PAULINO

(Efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* (colônia) em ratos wistar submetidos ao infarto por método simpatomimético/Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, na forma normalizada e de uso obrigatório)

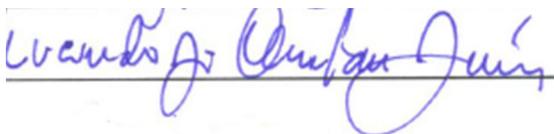
Dissertação de Mestrado, submetido ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, e aprovada em 20 de agosto de 2014.



---

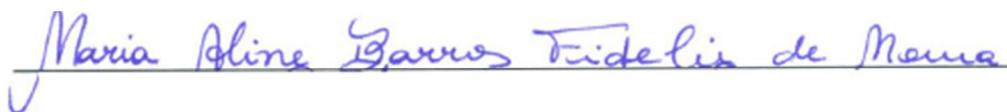
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Éurica Adélia Nogueira Ribeiro- PPGCF/UFAL (ORIENTADORA)

Banca examinadora:



---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Lucindo José Quintans Júnior(Examinador Externo/DFS-UFS)



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aline Fidelis Barros de Moura (Examinador Interno/PPGCF-UFAL)

Dedico este trabalho a Deus, que nos permite a cada dia estudar a perfeita  
complexa obra criada por Ele...natureza, fonte renovável de vida

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça que me foi concedida ao poder me dedicar a farmacologia de produto naturais, princípios ativos criados por Deus.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo incansável apoio e incentivo.

Aos meus familiares pelos estímulos a pesquisa científica

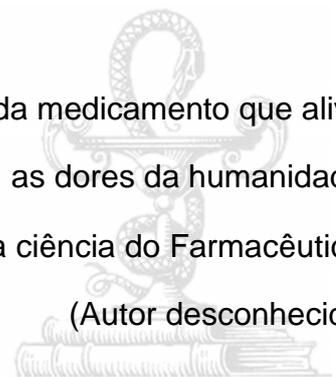
Ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, local que se tornou minha segunda casa e que aguçou minha curiosidade à ciência

Aos amigos do LFC, pelos estímulos e ajudas, diretas ou indiretas, que contribuíram para a realização deste trabalho.

A prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Êurica , pela oportunidade concedida a mim e pelos seus diários ensinamentos, e experiência de trabalho e de vida o qual tive a chance de partilhar ao longo destes anos.

Aos órgão de fomento a pesquisa (CNPq, CAPES, FAPEAL, PPSUS-MS), pelo financiamento desta pesquisa

“Em cada medicamento que alivia  
as dores da humanidade,  
ali está a ciência do Farmacêutico”  
(Autor desconhecido)



## RESUMO

### TENÓRIO, E.P.2014.Efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* (colônia) em ratos wistar submetidos ao infarto por método simpatomimético

A *Alpinia speciosa* (Pers.) B.L.Burtt. & R.M. Smith é uma planta aromática, pertencente a família *Zingiberaceae*, é conhecida popularmente como “colônia,” com amplo emprego na medicina popular brasileira no tratamento da hipertensão arterial. Algumas atividades biológicas de interesse cardiovascular têm sido relatadas como: anti-hipertensiva, antioxidante, redutor dos níveis de colesterol tipo LDL, redutor da adiposidade visceral e antiplaquetária. No entanto, não há relatos de suas propriedades cardioprotetoras em ensaios experimentais de infarto do miocárdio. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* (EHAS) em ratos wistar induzidos ao infarto com isoproterenol. Ratos machos wistar pesando 250-350g foram alocados em 3 grupos (n=5) (CS = 0.5 mL Salina v.o por 26 dias) / (ISO = infartados com isoproterenol 85 mg/kg s.c em 2x), (EHAS =300mg/kg por 26 dias e induzidos ao infarto com isoproterenol s.c. 2x). No 27º dia os animais foram sacrificados sob anestesia, o soro foi coletado e incubado em kits bioquímicos para a avaliação de biomarcadores de lesões musculares (CK-NAC;CK-MB) e de biomarcadores de lesões organo-tissulares (LDH;AST)associadas ao infarto do miocárdio. Para as análises morfométricas, foram medidas as espessuras ventriculares e peso cardíaco. Foram normalizados em função do peso corpóreo e calculados os índices morfométricos de aumentos relativos e razões de proporções. Para a análise *post mortem* os corações foram seccionados e submetidos em teste colorimétrico TTC 1% e para a análise histopatológica quali-quantitativa foram adotadas as técnicas para a formação do bloco de parafina e analisados os parâmetros: Invasão leucocitária, mionecrose e deposição de colágeno interfibrilar. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M e analisados estatisticamente em ANOVA one-way seguido de teste Newman-keuls. Considerados significantes quando: <sup>a</sup>p<0,05(CS vs. ISO) <sup>b</sup>p<0,05(EHAS vs. ISO) <sup>a1</sup>p<0,01(CS vs. ISO) <sup>b1</sup>p<0,01(EHAS vs. ISO) e <sup>a1</sup>p<0,001(CS vs ISO)<sup>b1</sup>p<0,001 (EHAS vs ISO).Peso cardíaco (CS = 1,2  $\pm$  0,1; ISO = 1,6  $\pm$  0,1<sup>a</sup>; EHAS=1,3 $\pm$ 0,<sup>b</sup>g respectivamente), EVE (4,8  $\pm$  0,2; 6,2  $\pm$  0,3<sup>a1</sup>; 4,6 $\pm$ 0,3<sup>b1</sup> mm), Peso cardíaco/Peso corpóreo (3,98 $\pm$ 0,1; 5,20 $\pm$ 0,12<sup>a1</sup>; 4,36 $\pm$ 7,07<sup>b1</sup>) (CK-NAC = 326,3,  $\pm$  37,3; 862,3  $\pm$  203,9<sup>a1</sup>; 115,4 $\pm$ 25,9<sup>b1</sup>U/L) (CK-MB = 452,7  $\pm$  11,5; 765,2  $\pm$  54,3<sup>a1</sup>; 209,6 $\pm$ 39,9<sup>b1</sup> U/L) (CTL=413 $\pm$  0,7; 3.517 $\pm$ 4,5<sup>a1</sup>; 1.376 $\pm$ 2,6<sup>b1</sup> cels). Os resultados indicam que o tratamento com EHAS foi capaz de prevenir a hipertrofia concêntrica, reduzir a espessura ventricular esquerda e a relação peso cardíaco/peso corpóreo. Na análise bioquímica observa-se a redução na atividade de CK-NAC e CK-MB após o tratamento com EHAS. O teste colorimétrico revelou que não houve desenvolvimento de áreas necróticas nos corações. Na análise histopatológica observa-se baixa intensidade e baixa distribuição de focos de mionecrose e infiltrados leucocitários e baixa deposição de colágeno interfibrilar, indicando que não houve desenvolvimento de remodelamento pós-infarto. Os resultados sugerem que o tratamento com EHAS foi capaz de promover atividade cardioprotetora frente ao infarto agudo do miocárdio experimental e pode servir como um adjuvante no tratamento e profilaxia desta doença.

PALAVRAS-CHAVES: Infarto do miocárdio; Ratos;Isoproterenol; *Alpinia speciosa*

## ABSTRACT

### TENORIO, E.P.2014. Cardioprotective effects induced by hydroalcoholic extract of the leaves of *Alpinia speciosa* (colônia) in rats submitted to myocardial infarction on sympathomimetic methods

*Alpinia speciosa* (Pers.) B.L.Burtt.& R.M. Smith is an aromatic plant belonging to Zingiberaceae family, it's popularly known as "colônia", with widely used in Brazilian traditional medicine for the treatment of hypertension. Several biological activities cardiovascular interest have been reported as antihypertensive, antioxidant, reducing the levels of LDL cholesterol type, reducing visceral adiposity and antiplatelet. But, there aren't reports to cardioprotective properties, in experimental assay, to the myocardial infarction. The objective of this study was to investigate the cardioprotective effects of extract from leaves of *Alpinia speciosa* (ASEH) in wistar rats in the infarcted induction with isoproterenol. Male Wistar rats (250-350g) were divided into 3 groups (n = 5), (SC = 0.5 mL Saline p.o for 26 days) / (ISO = infarction by isoproterenol 85 mg/kg s.c,2x), (ASEH= 300mg/kg, orally 26 days and underwent infarction with isoproterenol 85mg/kg s.c, 2x). On the 27th day the animals were euthanized, serum was collected and incubated in biochemical kits for the evaluation of muscle biomarkers(CK-NAC, CK-MB), and tissue damage biomarkers(LDH, AST) associated to myocardial infarction. For morphometric analysis of hearts were measured the thickness ventricular of left and right. Reason cardiac weight by body weight (TLV, TRV and WC/WB). For *postmortem* analysis the hearts were sectioned yet submitted to colorimetric test TTC1% and histopathological myocardial analyze qualitative and quantitative, analyzing: infiltration of leukocytes, myonecrosis and deposition of collagen interfibrillar. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM, and analyzed statistically by ANOVA one-way followed by Newmans-keuls test. Considered significant when <sup>a</sup>p<0,05(CS vs. ISO) <sup>b</sup>p<0,05(ASEH vs. ISO) <sup>a'</sup>p<0,01(CS vs. ISO) <sup>b'</sup>p< 0,01(ASEH vs. ISO) and <sup>a''</sup>p<0,001(CS vs ISO)<sup>b''</sup>p<0,001(ASEH vs ISO). Weight of hearts (SC = 1,2  $\pm$  0,1; ISO = 1,6  $\pm$  0,1<sup>a</sup>; EHAS=1,3 $\pm$ 0,1<sup>b</sup>g respectively)TLV (4.8  $\pm$  0.2; 6.2  $\pm$  0.3<sup>a'</sup>; 4,6 $\pm$ 0,3<sup>b'</sup> mm) WC/WB (3,98 $\pm$ 0,1; 5,20 $\pm$ 0,12<sup>a''</sup>; 4,36 $\pm$ 7,07<sup>b''</sup>) (CK-NAC = 326.3,  $\pm$  37.3; 862.3  $\pm$  203.9<sup>a'</sup>; 115,4 $\pm$ 25,9<sup>b'</sup>U/L) (CK-MB = 452.7  $\pm$  11.5; 765.2  $\pm$  54.3<sup>a''</sup>; 209,6 $\pm$ 39,9<sup>b''</sup>U/L),(TLC=413 $\pm$  0,7; 3.517 $\pm$ 4,5<sup>a''</sup>; 1.376 $\pm$ 2,6<sup>b''</sup> cells)the results indicate that treatment with ASEH was able to prevent hypertrophy concentric cardiac it is observed that there is a decrease in TLV and WC/WB. In the biochemical analysis observed a reduction in counting enzyme CK-NAC and CK-MB fraction after treatment with ASEH. The colorimetric test revealed there wasn't development necrotic areas in the heart. Histopathological analysis we observe reveals less intensity and low distribution of focal myonecrosis and lymphocytic infiltrations, low amount of collagen deposition indicating no formation of cardiac remodeling, The results indicate that treatment with ASEH was able to promote protective activity in myocardial infarction and could be a tool on treatment or prophylaxis this disease.

KEY-WORDS: Myocardial infarction; rats; isoproterenol; *Alpinia speciosa*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL POR MÉTODO SIMPATOMIMÉTICO.....	42
QUADRO 1-IMAGENS DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS.....	49
QUADRO 2-FOTOMICROGRAFIAS DE SECÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	51
QUADRO 3-FOTOMICROGRAFIAS HISTOPATOLÓGICAS.....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PESO CORPOREO (g) DOS RATOS DURANTE EXPERIMENTO.....46

TABELA 2- ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DE CORAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DA  
FISIOPATOLOGIA DO INFARTO AGUDO DO  
MIOCÁRDIO.....48

TABELA3- ANÁLISE QUANTITATIVA HISTOLÓGICA SOBRE INFILTRADOS  
LEUCOCITÁRIOS.....50

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-ANÁLISE ENZIMÁTICA DE CREATINO-FOSFOQUINASE.....46

GRÁFICO 2-ANÁLISE ENZIMÁTICA DE LACTATO DESIDROGENASE E ASPARTATO AMINO  
TRANSFERASE.....47

GRÁFICO 3-PROPORÇÃO CARDÍACA.....48

## LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

6-PG	6-fosfogluconato
AC	Ciclase de adenilil
AKT	Proteína quinase A
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclica
AST	Aspartato amino transferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CAT	Catalase
CK-MB	Creatino-kinase fração MB
CK-NAC	Creatino-kinase total
COX-2	Ciclooxygenase 2
CTL	Contagem total de leucócitos
CVLM	Região caudal ventrolateralmedular
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EHAS	Extrato hidroalcoólico de <i>Alpinia speciosa</i>
ERO` s	Espécies reativas de oxigênio
EVD	Espessura ventricular direita
EVE	Espessura ventricular esquerda
G-6-PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	Ácido gaba amino butírico
GMPc	Monofosfato de guanilil cíclico
GSH	Glutationa oxidase
HDL	Colesterol de alta densidade
HIF-1a	Fator indutor de hipóxia 1 alpha
HK	Hexoquinase
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Oxido nítrico sintetase induzível
ISO	Isoproterenol

K <sup>+</sup> ATP	Canais para potássio trifosfato de adenosina dependentes
LDH	Lactato desidrogenase
LDH-2	Lactato desidrogenase isoforma 2
LDL	Colesterol de baixa densidade
LPQRn	Laboratório de pesquisas químicas e recursos naturais
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ase	Enzima sódio-potássio dependentes de trifosfato de adenosina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
Pcard	Peso cardiac
Pcorp	Peso corporeo
R=Pcard/Pcorp	Razão do peso cardíaco sobre peso corporeo
REDOX	Redução-oxidação
RENAME	Relação nacional de medicamentos essenciais
RVLM	Região rostroventrolateral medular
SC	Controle salina
SOD	Superoxido dismutase
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBARS	Ácido tiobarbitúrico reativo à substâncias oxidativas
TGF-β	Fator de transformação de crescimento celular beta
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TPF	1,3,5-Trifenil formazan
TTC	Cloreto de trifenil tetrazolio
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
α1	Receptores metabotrópicos tipo Alpha-1
α2	Receptores metabotrópicos tipo Alpha-2
β1	Receptores metabotrópicos tipo Beta 1
Δ	Delta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1	Considerações gerais sobre infarto agudo do miocárdio.....	19
2.2	Atividade autonômica simpática e infarto agudo do miocárdio experimental.....	24
2.3	Plantas medicinais na terapêutica cardiovascular e <i>Alpinia speciosa</i> .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>40</b>
4.1	Coleta botânica.....	40
4.2	Animais.....	40
4.3	Substâncias.....	40
<b>5</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
5.1	Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Alpinia speciosa</i> (EHAS).....	41
5.2	Preparação da solução do extrato hidroalcoólico das folhas <i>Alpinia speciosa</i> .....	41
5.3	Indução do infarto do miocárdio em ratos por isoproterenol.....	41
5.4	Delineamento experimental.....	41
5.5	Estudos morfométricos.....	42
<b>5.5.1</b>	<b>Peso médio corporal dos ratos</b> .....	<b>42</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Peso médio dos corações</b> .....	<b>43</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Espessura ventricular(ventrículos esquerdo e direito)</b> .....	<b>43</b>
5.6	Análise bioquímica: determinação das taxas séricas da aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) E creatino kinase (CK).....	43
<b>5.6.1</b>	<b>Creatino-kinase total (CK-NAC) Creatino-Kinase fração MB (CK-MB)</b> .....	<b>43</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Lactato desidrogenase (LDH)</b> .....	<b>44</b>
<b>5.6.3</b>	<b>Aspartato amino transferase (AST)</b> .....	<b>44</b>
5.7	Determinação de áreas necróticas em músculo estriado cardíaco.....	44
5.8	Estudos histopatológicos.....	45
5.9	Análise estatística.....	45

<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
6.1	Avaliação de massa corpórea.....	46
6.2	Perfil enzimático de lesões musculares.....	46
6.3	Perfil enzimático de lesões organo-celulares.....	47
6.4	Perfil morfométrico.....	47
6.5	Proporção cardíaca.....	48
6.6	Análise macroscópica.....	49
6.7	Análise histopatológica.....	49
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

## 1.INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma das complicações do aparelho cardiovascular que mais acomete a população mundial, com aproximadamente 7,4 milhões de morte ao redor do mundo equivalente a 43% de óbitos anuais (NHLBI,2009). Esta patologia pode ser definida como uma doença gerada pelo desequilíbrio das concentrações de oxigênio utilizadas pelo metabolismo cardiovascular, esta alteração geralmente ocorre devido oclusão coronária, que impede o fluxo sanguíneo miocárdico (TENDERA, 2004).

O diagnóstico do IAM é baseado em um conjunto de investigações clínicas e laboratoriais, que estão relacionadas a liberação de biomarcadores enzimáticos cardíacos, alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, bem como alterações morfológicas cardíacas (JAFFE, 2000).O tratamento consiste no uso concomitantemente de fármacos cardiovasculares, como: anti-hipertensivos, antiplaquetários e hipolipidêmicos. Dentre estas classes farmacológicas, os anti-hipertensivos são empiricamente utilizados na clínica para impedir o agravo cardiovascular da hipertensão a longo prazo, em virtude destes serem capazes de reduzir a pré-carga e assim impedir as altas pressões intracavitárias cardíacas, que levam à hipóxia, iniciando o IAM, no entanto triagens clínicas demonstram a ineficácia destes medicamentos na proteção isquêmica (DICKSTEIN, 2002).

Apesar das melhorias no manejo clínico e farmacológico, o IAM continua a ser a principal causa de morte em todo o mundo (ZHOU, 2012). Esta constatação incentiva à pesquisa científica de novos fármacos para o tratamento do IAM ou de terapêuticas coadjuvantes (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2009). Com a finalidade de atingir esse objetivo vários modelos experimentais em animais foram desenvolvidos. Entre eles, pode-se mencionar o modelo por indução farmacológica com fármacos simpaticomiméticos, como isoproterenol. As alterações fisiopatológicas e morfológicas observadas neste modelo animal são semelhantes aos observados no IAM em humano. Portanto, esta ferramenta experimental serve como modelo bem padronizado para investigar o potencial cardioprotetor de diferentes plantas medicinais,que possuem propriedades antioxidantes (importantes no combate ao envelhecimento celular e a redução do desequilíbrio REDOX

cardiovascular) e em adição mostram menos efeitos colaterais do que os fármacos sintéticos(SHAIK, 2012; RAMADAN, 2013).

Alguns estudos na literatura farmacológica tem demonstrado o potencial cardioprotetor de plantas medicinais utilizadas pela população com finalidade citoprotetora do miocárdio (SARAVANAN,2004;SCHDEVA, 2012;PARK,2009).

Estudos de Stanely, 2008 e Tiwari e cols, 2012, revelam que plantas originárias da indo-malasia em formulações polisherbais, possuem efeito cardioprotetor em ratos wistar no modelo experimental simpatomimético (STANELY,2008;TIWARI,2012).

Deste modo, o gênero *Alpinia* de origem asiática encontra-se inserido na medicina ayurvédica e chinesa, que possui cerca de 230 espécies e são facilmente encontradas em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (BARCELOS, 2010). Recentes estudos evidenciaram que espécies de *Alpinia* apresentaram propriedades cardioprotetoras (TIWARI, 2012; TANG,2014).

Neste contexto, a *Alpinia speciosa* é uma planta pertencente a este gênero utilizada pela população brasileira no tratamento da hipertensão arterial e seus agravos pelo consumo de infusos e decoctos e está inclusa na lista RENISUS do Brasil e possui atividades anti-hipertensivas cujo seu mecanismo de ação está relacionado com propriedades vasorelaxantes endotélio dependentes pela estimulação da NOS via GMPc (LAHIOU, 2003), antioxidante (TAWATA,2007), hipolipidêmicas, reduzindo os níveis de colesterol do tipo LDL e aumentando os níveis de HDL (LIN, 2008) e antiplaquetárias devido ao bloqueio da formação de tromboxano A<sub>2</sub> via COX (TENG, 1990). No entanto, não há nenhum relato científico que tenha avaliado a atividade cardioprotetora das folhas da *Alpinia speciosa*.

Assim, nossa hipótese é que o conjunto destas ações sobre o sistema cardiovascular possa produzir efeito cardioprotetor em ratos wistar tratados de modo crônico com o extrato hidroalcoólico da folhas de *Alpinia speciosa* quando submetidos ao modelo de infarto simpatomimético

O possível efeito cardioprotetor produzido pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* pode ser representar uma opção no tratamento adjuvante da hipertensão arterial a longo prazo de baixo custo efetivo, de modo a permitir o

adequado controle da hipertensão, bem como impedir a progressão ao agravo desta doença.

## 2.REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

O IAM pode ser conceituado como uma doença resultante do desequilíbrio entre as concentrações de oxigênio ofertada e demandada ao miocárdio. Este desequilíbrio é gerado por diminuição do fluxo coronariano, ocasionado por obstrução da artéria coronária, dificultando o suprimento metabólico cardíaco (SBC, 2009).

Estima-se que a prevalência do IAM seja de cerca de 300-400 mil casos anualmente no Brasil e 1 óbito a cada 6 casos, revelando alto índice de morbimortalidade gerada por distúrbio do aparelho cardiovascular (SBC,2004). Estudos recentes têm mostrado que apenas  $\frac{1}{4}$  dos pacientes acometidos pelo IAM recebem os medicamentos necessários durante as primeiras 12 horas iniciais da doença, refletindo a necessidade de rápido atendimento emergencial (BARUZZI,2003)

Considerada clinicamente como uma doença silenciosa, o IAM possui uma sintomatologia inicial complexa, pode manifestar-se através de sinais dolorosos como a *angina pectoris*, caracterizado por uma crise aguda dolorosa, em forma de opressão, que irradia para membros superiores, pescoço ou abdome. Estes pacientes apresentam-se normalmente pálidos, relatam mal-estar, dispneia e taquicardia, que ocorre em reflexo a diminuição da condução sanguínea (CANTO, 2000).

O diagnóstico é realizado pela junção de aspectos clínicos e laboratoriais, que consistem em: valores hemodinâmicos aumentados, desnivelamento do segmento ST do eletrocardiograma, aumento de biomarcadores enzimáticos, aumento de sinalização pró-inflamatória e oclusão de ramos coronarianos em exames de imageamento por contraste (WINTER, 2000).

É bem relatado na literatura que o desenvolvimento do IAM gera alterações morfofuncionais agudas e adaptativas em resposta aos danos celulares gerados, estas representam os mecanismos reparativos de ataque e defesa fisiopatológicos (WEHRENS,2003). As alterações agudas ocorrem em nível molecular e depois reestabelecem-se, são elas: bioquímicas, neuro-humorais e imunoinflamatórias,

enquanto que as alterações adaptativas são mudanças na morfologia da musculatura cardíaca com a finalidade de impedir a falência miocárdica, são denominadas de adaptações hipertróficas (ENGELHARD, 2002).

As alterações bioquímicas clinicamente relevantes são relacionadas com o aumento dos níveis séricos de troponina I, uma proteína intracelular que se eleva de 3 a 4 horas após o início do infarto (GODOY, 1998). Já as frações MB e totais da enzima creatino kinase (CK-NAC), aumentam a partir da sexta hora, mantendo o máximo de liberação enzimática de 12 a 24 horas na corrente sanguínea, com um platô de 30 horas para CK-MB e de 72 horas para CK-NAC, em seguida ambas tendem a decrescer e normalizar-se (MOTTA, 2011).

As alterações neuro-humorais ocorrem devido às mudanças nas transduções de sinais de neurotransmissores e de expressões imunoinflamatórias (LOHSE, 2003).

Aliado a estas mudanças neuro-humorais, há um aumento significativo das espécies reativas de oxigênio (ERO's) geradas pela superestimulação de enzimas oxidativas, a exemplo xantina oxidase e consequente inibição parcial das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), favorecendo o desbalanço REDOX intracelular. Este desbalanço propociona alta produção de oxigênio singlete e ânions superóxidos que agem como agentes eletrófilos, que atacam as membranas celulares compostas de fosfolípídeos, gerando um consequente aumento de produtos de reações de lipoperoxidação, que desencadeiam a sinalização pró-inflamatórias através de citocinas (HAMILTON, 2007).

A mudança mais expressiva na sinalização de neurotransmissores é a hiperexcitação do sistema nervoso simpático e redução na transmissão colinérgica, que por sua vez, aumentam a expressão de sistemas efetivo no controle da pressão arterial, como o sistema renina-angiotensina (BRUM,2006).

O aumento na transmissão simpática, gera o aumento da concentração de catecolaminas, gerando a curto prazo hipertensão arterial e a longo prazo contribuem direta e indiretamente para o desenvolvimento do infarto e falência miocárdica, de modo direto sua interação com receptores adrenérgicos quando

hiperativados geram trabalho cardíaco extenuante e iniciam o fenômeno de hipóxia celular. A baixa concentração de oxigênio gera a rápida conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em hipoxantina que se degrada em radicais livres, estes atacam as membranas plasmáticas desestabilizando-as e ainda geram mecanismos para liberação do fator de hipóxia 1a (HIF-1a) gerando estímulos a p53 que inicia a cascata da via apoptótica caspase 3 e 9 (SEMENZA,2002)

De modo indireto as catecolaminas são rapidamente oxidadas e formam compostos altamente reativos, estes desencadeiam ataques membranares que desestabilizam as células facilitando seu desequilíbrio redox bem como membranas, associado a isto o aumento da concentração de catecolaminas causam hiperestimulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, a produção demasiada de angiotensina II interagem com receptores AT1 e iniciam a longo prazo a liberação de mediadores indutores de vias hipertróficas e de morte celular (MEHTA, 2007)

A angiotensina II em altas concentrações e sem mecanismos de feedback negativo para contrapor esta ligação, geram mecanismos patológicos, sistemas de transdução intracelulares mediados pela interação de angiotensina II e receptores AT1 liberam biomoléculas como o fator de transformação de crescimento celular beta ( $TGF-\beta$ ) que por sua vez estimulam uma proteína kinase A (AKT) esta é responsável pela fosforilação de segundos mensageiros(BAD e FKHR)mediadores das vias apoptoticas caspase 3 e 9 além de estimular a fagocitose mitocondrial iniciando dano celular e assim liberando o conteúdo intracelular para a corrente sanguínea como, eletrólitos, segundos mensageiros e enzimas intracelulares: creatino fosfoquinase, lactato desidrogenase e aspartato desidrogenase em tecidos musculares(SHULTZ, 2002)

Do mesmo modo e em sincronismo a angiotensina II ao interagir demasiadamente com receptores AT1, estimulam a liberação de biomoléculas de resposta inflamatória pela liberação de fator de necrose tumoral alpha ( $TNF-\alpha$ ). O  $TNF-\alpha$  por sua vez estimula liberação do fator nuclear kappa B (NF-KB) que geram transcrição nuclear gerando fenômenos de inflamação pela liberação de citocinas como interleucina (IL-1,IL-6), bem como enzimas como cicloxigenase 2(COX-2), óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e segundos mensageiros responsáveis pela

adesão, invasão e migração de células de defesa como macrófagos e linfócitos para fagocitar células miocárdicas, iniciando os mecanismos reparativos (KALRA,2002).

Os mecanismos reparativos agudos pró-inflamatórios se dão em resposta ao aumento de moléculas intracelulares que extravasam na corrente sanguínea, como ERO e produtos da peroxidação lipídica que se encontram aumentados no IAM (OHJA, 2008). O aumento destas biomoléculas geram estímulos à sinalização de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) mediadas pelo sistema imune, resultando no aumento de invasão de células leucocitárias, gerando miocardite aguda (NIIJIMA, 1991).

Após a inflamação aguda fibroblastos, drenam o edema intersticial e iniciam o processo de cicatrização pela síntese de colágeno e fibronectina intersticiais impedindo assim a falência miocárdica (DOBACZEWSKI, 2010).

A miocardite aguda gerada no IAM é caracterizada pelo aumento de muco, secreção inflamatória e edema cardíaco. A associação do edema à miocardite favorece a sinalização de morte celular patológica, também conhecida como necrose. O edema, secreção fluída composta basicamente por componentes citoplasmáticos extravasados para o meio extracelular, é drenado através de mecanismos reparativos primários e substituído por colágeno, sintetizado entre as miofibrilas e as zonas de necrose, dando origem as adaptações morfológicas e, portanto, iniciando o mecanismo reparador celular secundário (FRANGOIANNIS, 2002).

Em adição a este efeito regenerador de células miocárdicas, para evitar a falência miocárdica, através da ligação direta de angiotensina II a receptores AT1, promovem indução de síntese de proteínas da matriz extracelular dando origem à fibrose intersiticial, via MAP quinases e RNA mensageiro e induz fenômenos hipertróficos sobre feixes miocárdicos através de estímulos a fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e fator de crescimento insulino dependentes (IGF-1). O aumento da fibra muscular cardíaca pela hipertrofia celular, associada ao mecanismo reparador tecidual dá origem as acomodações morfológicas cardíacas (EBENSPERGER,1998).

As acomodações morfológicas cardíacas se caracterizam pelos mecanismos regulatórios do tônus miocárdico, que são definidos como remodelamento cardíaco (NOGUEIRA, 1999; ROMANO; MACIEL, 2008), estes podem ser classificadas em:

1-REMODELAMENTO CONCÊNTRICO (ocorre aumento da espessura da parede ventricular sem aumento da massa cardíaca);

2- HIPERTROFIA CONCÊNTRICA (caracteriza-se por aumento da espessura da parede ventricular com aumento da massa cardíaca, acompanhada de redução da cavidade ventricular);

3- HIPERTROFIA EXCÊNTRICA (promove aumento da massa cardíaca sem aumento da espessura da parede ventricular).

O principal tipo de hipertrofia associada ao IAM é a hipertrofia concêntrica, ou seja, aquela onde ocorre o espessamento ventricular e apical e redução do espaço cavitário (JUNIOR; FRANCHINI, 2001; MATOS-SOUZA; FRANCHINI; JUNIOR, 2008). O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca deve-se aos fatores genéticos, bioquímicos e mecânicos, os mais pronunciados na reposta hipertrófica são os bioquímicos e mecânicos (LI, 2002; RIBEIRO, 2003; NAKAYAMA , 2010).

Os aspectos bioquímicos caracterizam-se pela hiperatividade simpática, uma desregulação simpátovagal, que pode ser observada em pacientes hipertensos com disfunção ventricular (FISHER; FADEL, 2010; GRASSI; 2009). Outro fator bioquímico associado é a hiperestimulação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), que resulta na produção demasiada de angiotensina II, esta exerce suas funções nos receptores AT1 e AT2. A interação da angiotensina II com receptores AT1 gera aumento pressórico, devido a capacidade de estimular a liberação de mineralocorticoides pelas supra-renais como a aldosterona que favorece a reabsorção de sódio e retenção hídrica, este por sua vez quando hiperativado, causa sobrecarga pressórica sobre o sistema cardiovascular, esta sobrecarga induz a formação hipertrófica (FYHQUIST;SAIJONMAA, 2008).

O principal fator mecânico associado à hipertrofia cardíaca é a sobrecarga pressórica, pois este aumenta o trabalho cardíaco demasiadamente. O aumento do trabalho cardíaco de maneira a exauri-lo, promove o aumento do tamanho fibrilar, sem estímulos de gêneses de cardiomiócitos de maneira expressiva, aumentando a

massa ventricular e a espessura dos ventrículos, caracterizando a hipertrofia cardíaca (CICOGNA, 2002). Indivíduos que desenvolvem hipertrofia cardíaca, sobrevivem ao ataque cardíaco, e podem ser acometidos pelas comorbidades, como a insuficiência cardíaca (PACKER,1992)

O tratamento do IAM, pode ser dividido em: cirúrgico e não cirúrgico, porém, em ambos, a farmacoterapia se faz necessária (RITCH,2001). A terapêutica cardiovascular adotada para o IAM é subdividida no tratamento de urgência, baseada na reperfusão miocárdica, com uso de agentes doadores de óxido nítrico (NO), para dilatação coronária e reestabelecimento do fluxo sanguíneo, bem como o controle da pressão arterial, com agentes anti-hipertensivos (OHJA, 2012).

A terapia farmacológica de manutenção ocorre no período pós-infarto e é baseada no impedimento de reincidências. Ela é caracterizada pelo uso da polifarmácia, e os pacientes devem ser clinicamente acompanhados, pois há o envolvimento de muitas classes farmacológicas, como: anti-hipertensivos, hipolipidêmicos e antiagregantes plaquetários (CAMPBEL, 2007).

É digno de nota, que na terapêutica cardiovascular vigente, não existem classes de fármacos preventivos ao desenvolvimento do IAM. A estratégia terapêutica utilizada para evitar as complicações cardiovasculares é o uso de anti-hipertensivos de primeira escolha para o controle da hipertensão arterial em pacientes com risco cardiovascular, porém estes fármacos são ineficazes no impedimento dos agravos da hipertensão. Em contraste, recentes estudos têm demonstrado que alguns anti-hipertensivos, como os bloqueadores de canais de cálcio e antioxidantes, apresentaram propriedades cardioprotetoras em testes pré-clínicos, logo, diante desta premissa se faz necessária à busca de novos agentes preventivos ao infarto (SANDMANN, 2001).

## **2.2ATIVIDADE AUTONÔMICA SIMPÁTICA E INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL**

O sistema cardiovascular tem como principal função o transporte de substâncias necessárias ao metabolismo celular (DAMPNEY, 2003). Para o bom desempenho desta função, há necessidade do controle adequado dos níveis pressóricos de perfusão tecidual e arterial sistêmico (SUN, 2005).

Nesta conjuntura, um dos mecanismos de controle da pressão arterial e da perfusão sanguínea é a utilização dos mecanismos de controle neuro-humorais ativados pelo sistema nervoso central e autonômico, que permite a liberação de hormônios capazes de regular a homeostasia cardiovascular (DIBONA, 2004). Desta maneira, as interações entre os sistemas nervoso autonômico e cardiovascular são complexas e fundamentais para o bom desempenho cardiovascular, conferindo equilíbrio e proteção às funções condutoras (RAMCHANDRA, 2005).

A função cardiovascular é controlada pela interação entre o sistema nervoso autonômico simpático e parassimpático. Diante do importante papel de regulação do coração, o sistema nervoso autonômico está intrinsecamente relacionado com processos fisiopatológicos cardiovasculares, como: alterações isquêmicas, degenerativas, inflamatórias, tóxicas e metabólicas (BOLIS, 2000).

As modificações da homeostasia cardíaca anteriormente relatada originam as principais doenças do aparelho cardiovascular como: hipertensão, arritmias, IAM e insuficiência cardíaca. Portanto, o desequilíbrio do sistema nervoso autonômico está envolvido na gênese das doenças cardiovasculares e tem sido alvo de estudos de muitos grupos de pesquisa (PORTER, 1990; HOYER, 2008).

Zipes e Wellens 1998, comprovaram que nas doenças cardiovasculares há um aumento significativo da atividade simpática e diminuição do tônus vagal. A hiperexcitação da sinalização simpática gera inconstância de correntes eletrofisiológicas que constituem os fatores pró-arrítmogênicos, assim como os efeitos depressores da sinalização parassimpática constituem os fatores anti-arrítmogênicos, por conferirem maior constância das correntes eletrofisiológicas, o que confere proteção cardíaca (ZIPES E WELLENS, 1998; TAGGART, 2003). em muitas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial e a hipertrofia ventricular esquerda, há um aumento expressivo da via simpática, assim como seus efeitos excitatórios mediados pelas catecolaminas (GRASSI, 2004; SCHLAICH, 2003).

Estudos recentes tem mostrado que esta hiperatividade simpática se deve a modificações dos neurônios localizados na região rostroventrolateral medular (RVLM) nos neurônios da área pressórica medular e na região caudal ventrolateral medular (CVLM) no núcleo do trato solitário (KIRSTEIN, 2004).

Estas regiões são caracterizadas pela capacidade de regular o sistema baroreflexo e controle da frequência cardíaca associada ao aumento ou redução da pressão arterial. A CVLM também conhecida como área pressórica medular exerce controle sobre a RVLM através da via inibitória gabaérgica, a RVLM está intrinsecamente relacionada ao sistema nervoso simpático, esta região envia fibras excitatórias para os neurônios pré-ganglionares do trato cortico espinal que por sua vez libera catecolaminas para o coração aumentando assim a frequência cardíaca, em contrapartida o aumento exacerbado da frequência cardíaca gera aumento no estiramento dos receptores do baroreflexo que inicia o sistema inverso, ou seja a região CVLM é ativada e inibe a região RVLM reduzindo assim a sinalização simpática (CARLSON,2008). Este sistema também pode ser ativado pelo sistema renina-angiotensina devido à alta densidade de receptores AT1 na RVLM que pode ser ativado pela angiotensina II e assim este pode se tornar o maior local de excitação do sistema nervoso simpático (ZUCKER, 2005).

Assim, as modificações nestas regiões de controle da frequência cardíaca ocorrem devido à alta sinalização dos neurônios da RVLM e redução na sinalização de neurônios CVLM, ou ineficácia do sistema eferente da CVLM, sendo assim há superexcitação simpática contribuindo para o descontrole da frequência cardíaca, que gera taquicardia e indisponibilidade de oxigênio às células miocárdicas e colabora para a isquemia miocárdica bem como falência miocárdica (KIRSTEIN, 2004).

Já está bem estabelecido na literatura que as principais alterações simpáticas como geradoras de disfunções autonômicas. O aumento do tônus simpático gera mecanismos compensatórios, que abrangem efeitos cronotrópicos e inotrópicos para a adequação do débito cardíaco, da pressão arterial sistêmica e das perfusões organo-celulares (HASKING, EISENHOFER, 1996). As catecolaminas endógenas quando hiperestimuladas não só exercem efeitos toxicantes diretos aos miocárdios, como também são capazes de promover sinalizações apoptóticas nos tecidos cardíacos mediada por citocinas e sua integração ao sistema imune (MANN, 1992; COMMUNAL, 1998).

Em casos de IAM, após a crise inicial, ocorre a liberação de fatores vasoativos e neuroativos, como: aldosterona e angiotensina II que são ativados

devido à baixa pressórica tissular, favorecendo o mecanismo de retenção de água e sódio e vasoconstrição mediado pela angiotensina II, produzindo aumento do volume sanguíneo circulante e aumento pressórico (FRANCIS, 1998). Porém este efeito compensatório provoca uma sobrecarga pressórica ventricular, que agrava a insuficiência cardíaca gerada pelo IAM (FELDER, 2003).

Como já relatado anteriormente, em casos de IAM, há uma superestimulação simpática, que possui como neurotransmissor efetivo a adrenalina, uma catecolamina endógena, isto explica o fato do sucesso do uso de beta-bloqueadores no tratamento da insuficiência cardíaca e IAM, desta forma os efeitos patológicos são minimizados e tendem a normalizar o sistema cardiovascular (HJALMARSON, 1997; PAVLOVIC, 2000). Estudos de Catelli e cols mostraram que a administração de fármacos simpatomoduladores como a clonidina e a rimelina preveniram danos miocárdicos em coelhos (CATELLI, 2003). O uso farmacológico de fármacos que possam contrapor este desequilíbrio tem sido desenvolvido com a finalidade de tratar os agravos relacionados ao IAM.

Diante do exposto, alguns modelos experimentais de IAM, foram desenvolvidos, para facilitar o entendimento fisiopatológico e farmacológico de fármacos que possam apresentar um potencial cardioprotetor. Os modelos mais comumente empregados são *in vitro*: modelo de isquemia-reperfusão e modelos *in vivo*: modelo de oclusão coronariana cirúrgica, modelo crioscópico cardíaco e modelo por indução farmacológica com fármacos simpaticomiméticos, como isoproterenol (HEARSE, 2003).

O modelo experimental isquemia-reperfusão é caracterizado pela utilização de corações isolados, retirados de animais saudáveis, inseridos em banho de órgão, o qual após um período de estabilização, passa por um período de isquemia, através da ligação reversível do ramo descendente da artéria coronária esquerda durante 45 minutos, onde neste período cessa a disponibilidade de oxigênio ofertada ao miocárdio, ocorre rápida conversão de ATP à hipoxantina, logo após o coração é reperfundido, e a oxigenação é reestabelecida por um período de 60 minutos, neste período a hipoxantina formada é convertida enzimaticamente à peróxido de hidrogênio, urato e ânion superóxido que inicia desequilíbrio redox no miocárdio (OHJA,2010).

Outro modelo experimental de infarto denominado modelo crioscópico baseia-se no congelamento de uma parte do coração, ao qual é realizado através de um procedimento cirúrgico, onde o coração rapidamente exposto à um aparelho que pontualmente congela uma pequena porção do coração, em seguida este é recolocado na caixa torácica e os animais operados são mantidos em biotérios para recuperação pós-cirúrgica, neste período ocorre sinalização pró-inflamatória e formação de necrose cardíaca, porém seus mecanismos ainda não foram bem estabelecidos, motivo de atual desuso (LUSTGARTEN,1999)

O modelo de oclusão coronária caracteriza-se pela utilização de procedimento cirúrgico, com exteriorização cardíaca com compressão lateral do tórax e ligação irreversível da coronária esquerda, através de fios de sutura, o coração é recolocado na caixa torácica, os animais passam por um período de recuperação cirúrgica, período no qual há o desenvolvimento do IAM, em seguida aos testes hemodinâmico e *post mortem*. Porém, há necessidade de uso de equipamentos de ventilação artificial, e há um índice considerável de mortes no desenvolvimento experimental, tornando a técnica de difícil execução (ZORNOFF,2009).

O modelo isoproterenol é caracterizado pela hiperestimulação não seletividade receptores adrenérgicos, porém com maior afinidade para receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, devido à maior densidade destes receptores no tecido cardíaco. Esta hiperestimulação gera uma grande mobilização de íons  $Ca^{2+}$ , aumentando assim os efeitos cronotrópicos e ionotrópicos positivos, o que leva ao trabalho cardíaco exaustivo, gerando assim insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular e indução de necrose miocárdica, resultando em liberação de biomarcadores do IAM (TROPONINA I, CK-NAC, CK-MB, LDH-2) e invasão de células leucocitária provocando digestão de miofibrilas, semelhante ao processo de morte cardíaca em quadros de IAM (REMIÃO,2002). Associado a este efeito, as catecolaminas são rapidamente convertidas em formas oxidativas, aumentando assim os níveis de oxidantes, estes por sua vez, aumentam a toxicidade no sistema cardiovascular e levam a eventos de lipoperoxidação, iniciando o IAM (SINGAL,1983).

O isoproterenol é uma catecolamina sintética, estruturalmente caracteriza-se por uma região aromática associada a uma cadeia alifática que é considerada o ponto de ancoragem em receptores adrenérgicos, farmacologicamente atua

mimetizando os efeitos de hormônios endógenos (adrenalina e noradrenalina), e é utilizada na clínica com a finalidade de reanimação cardíaca ou como fármacos de controle pressórico em procedimentos cirúrgicos (SBC,2003).

Possui farmacodinâmica relacionada por seus efeitos cronotrópicos e ionotrópicos positivos, através de receptores metabotrópicos do tipo adrenérgico ( $\beta_1, \beta_2$ ), no coração atua em receptores preferencialmente do subtipo  $\beta_1$ , devido a sua alta densidade, que estão acoplados a proteína G do tipo Gs, que estimula a enzima ciclase de adenilil (AC), favorecendo o aumento de monofosfato de adenosina (AMPc), este segundo mensageiro, favorece a abertura de canais para cálcio do retículo sarcoplasmático e dos canais para cálcio tipo L expressos na membrana, este por sua vez, aumenta os níveis de cálcio intracelular, que agora estão disponíveis para a interação com miofibrilas, resultando em contração cardíaca, aumentando assim a frequência e o débito cardíaco e a força contrátil (XIAO, 2004).

A exposição em doses repetidas, ao isoproterenol, provoca alterações e distúrbios cardiovasculares, estes podem ser gerados pela hiperestimulação adrenérgica. As principais alterações são: morfológicas, funcionais e metabólicas, a junção destas alterações é denominada cardiomiopatia (NAIR,2006)

O isoproterenol induz hipertrofia muscular, caracterizada pelo aumento de massa muscular, sem aumento de número de células miocárdicas (GOLDSTEIN,1995), esta hipertrofia é mediada pela interação com receptores  $\beta_1$  adrenérgicos, pelo trabalho cardíaco extenuante (TAIMOR,2001), aliado a isto há aumento sobre a sinalização do sistema renina-angiotensina, contribuindo para o processo hipertrófico (OCARANZA,2002) ativada pela hiperestimulação adrenérgica nas regiões medulares do sistema nervoso central. O aumento do estresse oxidativo celular (AMIN,2001) parece estar envolvido na sinalização hipertrófica, porém este mecanismo ainda não está bem esclarecido.

O efeito toxicante direto às células miocárdicas, provoca necrose com bandas de contração, caracterizada pelo aparecimento de células mortas em estado de hipercontração, infiltrado de células inflamatórias mononucleares e de calcificações, devido aos depósitos de cálcio mitocondriais, perda de glicogênio e marginalização de cromatina, estes efeitos parecem ocorrer quando largas quantidades de cálcio entram nas células por membranas danificadas, que são lesadas quando há o

aumento de formas oxidativas do isoproterenol que atacam as membranas celulares (DAHLLA,2001)

Estas alterações membranares geram uma sinalização apoptótica extrínseca, com indução da caspase III via TNF- $\alpha$ , mediada pela ativação  $\beta$ 1 adrenérgica (OLIVETTI,2000).A necrose induzida, acompanha o fenômeno de fibrose (GRIMM,1998). Este tipo de necrose é observada em casos de morte súbita (GOLDSTEIN,1995)

As principais alterações histológicas que ocorrem nas primeiras 24 após a administração de altas doses de isoproterenol, são: formação de edemas intersticiais e intercelulares, turgência das fibras musculares, hernização de discos celulares, vacuolização extensa, inflamação exacerbada e agregação de células inflamatórias (REMIÃO,2002).

As alterações bioquímicas advêm dos distúrbios metabólicos, induzidos por isoproterenol, ocorre uma redução no metabolismo energético de cardiomiócitos assim como dos antioxidantes endógenos, caracterizado por redução dos níveis de glicogênio, ATP e de creatino fosfoquinase, aumento da captação de lipídeos pelo ventrículo esquerdo e redução das desidrogenases miocárdio e aumento destes na corrente sanguínea, há também aumento nos níveis de transaminases circulatórias (SÁNCHEZ,1997).

As alterações eletrolíticas mais proeminentes estão relacionadas com aumento dos níveis de cálcio e de sua captação pelo miocárdio em torno de 6 horas após a administração do isoproterenol, redução nos níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e aumento dos níveis de  $\text{K}^+$  na corrente sanguínea, após 24 horas manutenção ou ligeiro aumento nos níveis de  $\text{Na}^+$  no miocárdio e normalização dos eletrólitos com leve redução nos níveis de cálcio plasmáticos (REMIÃO,2001)

As alterações membranares, ocorrem sobre os fosfolipídeos, após 24 horas da administração ocorre diminuição da capacidade de metilação do sarcolema, aumento do conteúdo do retículo sarcoplasmático e redução da capacidade de metilação e não há alterações significativas no conteúdo e metilação de mitocôndrias(SÁNCHEZ,1997);

Quanto ao sarcoplasma, após 24 horas há diminuição sobre bombas de cálcio, redução dos sistemas antiporte  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ , aumento nos reservatórios superficiais de cálcio, sem alteração na densidade de canais de cálcio e de bombas  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (DAHLLA, 2001)

As alterações hemodinâmicas se devem ao aumento dos níveis pressóricos sistêmicos induzidos pela hiperestimulação adrenérgica e inibição dos fatores de vasorelaxamento. Além disto, há isquemia parcial provocada por vasoespasmos coronarianos, que induz uma oclusão coronariana pelo mecanismo de vasocontração de catecolaminas, porém estes, não são considerados fatores preditivos ao desenvolvimento do IAM (MARQUES, 2006)

O isoproterenol também induz lipólise, mediado pela interação com receptores do tipo  $\beta_3$ , este tipo de efeito tem sido correlacionado à necrose induzida (BLOOM, 1999).

A indução do estresse oxidativo pelo isoproterenol pode acontecer por duas maneiras: 1- via indução da MAO ou 2- via formação de quinonas e aminocromos. A primeira catalisa a desaminação oxidativa do isoproterenol, produzindo como produtos da reação péroxido de hidrogênio, que tem sido atribuída a toxicidade de catecolaminas, devido a sua propriedade de ser transformar em ânions superóxidos (BINDOLI, 1992).

A segunda ocorre quando as catecolaminas são oxidadas em quinonas ou aminocromos, como isoprenocromo, produto da oxidação do isoproterenol, como formação de ERO's, estes por sua vez são capazes de oxidar novas catecolaminas, dando origem a um ciclo de formação de espécies reativas de oxigênio, quinonas, aminocromos e ERO's possuem a capacidade de reagir eletrofilicamente grupamentos tióis presentes no aminoácido cisteína, que constituem proteínas, estas por sua vez estão presentes em membranas celulares, isto provoca desestabilização celular, iniciando a via apoptótica, que caracteriza a genotoxicidade induzida por ISO (DHALLA, 2001).

Além disto, as formas oxidadas do isoproterenol e ERO's reagem eletrofilicamente com a glutatona, que encontra-se abundantemente em hepatócitos

que induz toxicidade em nível metabólico na biotransformação e excreção (REMIÃO,2002).

O infarto induzido por isoproterenol é um modelo, de baixo custo efetivo, é capaz de mimetizar todos os efeitos patológicos do IAM, possui alta especificidade e reprodutibilidade. Além de não necessitar de aparatos e aparelhagens de alto custo-tecnológico.

### **3.3 PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPÊUTICA CARDIOVASCULAR E *Alpinia speciosa***

Plantas, por sua origem biológica, necessitam de substâncias fisiológicas que as mantenham vivas e em equilíbrio natural. Assim, elas produzem substâncias por meio de rotas biossintéticas que dão origem a metabólitos primários, responsáveis pela nutrição e desenvolvimento das mesmas, ou metabólitos secundários, substâncias estas, responsáveis por mecanismos de defesa ou proliferação da espécie, estes últimos também encontram aplicações nas ciências da saúde, através do seu uso terapêutico (LAPA, 2004).

Os produtos de origem natural têm sido utilizados com a finalidade terapêutica há muitos anos, os primeiros registros foram descritos ainda na idade antiga (DUNFORD, ELDIN, 2001). O uso de plantas medicinais tornou-se popular através do conhecimento tradicional, passado de geração a geração. Em nosso país, o uso foi também disseminado por meio do conhecimento popular indígena, que utilizavam extratos vegetais rudimentares no tratamento de doenças (DAHALLA, 1996).

Hoje, é possível observar que mesmo após o surgimento da síntese de compostos, os produtos de origem natural, ainda representam parte expressiva do arsenal terapêutico, seja através do uso de fitoterápicos, fitofármacos, seja pelo uso de vegetais na medicina popular (MACIEL, 2002; MACEDO, 2007). É válido ressaltar que 28% dos medicamentos úteis na medicina moderna são derivados de produtos naturais ou são de origem natural, 4% dos sintéticos possuem o grupo farmacofórico de origem natural (CRAGG, 2007). Porém, ainda são poucas as plantas com atividade medicinal e com requisitos de segurança e farmacodinâmica respectivamente elucidadas (VORA, MANSOOR, 2005).

Na terapêutica cardiovascular, os glicosídeos cardioativos (digoxina e digitoxina) extraídos da *Digitalis purpúrea* “dedaleira”, são exemplos de produtos naturais de origem vegetal comercialmente vendido e são utilizados no tratamento de arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva e taquicardia (NAVARRO,2000).O captopril, fármaco sintético, porém originado de produto natural (endotoxina da serpente *Bothrops jararaca*) é um anti-hipertensivo, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) é outro exemplo produto natural (IANZER,2004), comercialmente vendido, ambos estão inclusos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) e empregados na terapêutica vigente (RENAME,2010).

A busca por moléculas bioativas no campo científico é impulsionado graças ao uso popular de plantas com a finalidade terapêutica, visando à geração de conhecimento sobre os aspectos etnofarmacológicos e/ou procura de novos compostos que possam ser inseridos no mercado farmacêutico com eficácia e segurança superiores aos já encontrados na terapêutica vigente, assim a pesquisa farmacológica de produtos biologicamente ativos têm crescido com o passar do tempo (SCHIAVO, 2006).

Aproximadamente 82% da população do nosso país recorrem aos produtos naturais à base de plantas para tratamento de seus agravos de saúde, uma saída para um tratamento farmacológico com bases científicas e em sua maioria de baixo custo efetivo é o uso de fitoterápicos (ABIFITO,2004).

Em 2001, o ministério de saúde do Brasil, lançou o programa nacional de plantas medicinal e fitoterápico, fornecendo uma relação de medicamentos fitoterápicos úteis na atenção básica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos aprovada pelo decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, surgiu com o objetivo de garantir a população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos de modo a promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva bem como da indústria nacional, além de ampliar as opções terapêuticas de modo seguro e eficaz integrado aos serviços de saúde, preservando o conhecimento tradicional, elevar a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e

inovações integradas à plantas medicinais e fitoterápicos nas várias fases da cadeia produtiva (PNPMF/2006)

Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), lançou a resolução de número RDC 26/2014 que regulamenta o uso de produtos tradicionais fitoterápicos e a instrução normativa 2/14 que lista plantas que são reconhecidas como seguras e eficazes, declaradas pela ANVISA como registro simplificado. A primeira resolução objetiva-se em regulamentar os produtos tradicionais fitoterápicos cujos mesmos serão autorizados pela demonstração do uso seguro em humanos por um período de aproximadamente 30 anos. Quanto à instrução normativa fixa 43 plantas comumente utilizada pela população com finalidade terapêutica e que poderão ser utilizada para a produção de medicamentos sem a necessidade de comprovação adicional de eficácia e segurança em registro simplificado (RDC 26/2014; IN 2/14).

A riqueza da biodiversidade brasileira estimula a população a retirar da natureza plantas com o objetivo de curar doenças, fornecendo subsídios para estudos etnofarmacológicos, visando a averiguação de atividade farmacológica de plantas para curar a doença na qual é empregada popularmente (BENINI,2010).

A valorização da flora brasileira e seus compostos isolados como fonte de protótipos de novos fármacos integra o perfil atual do uso de recursos naturais de maneira sustentável, recomendado pelas políticas públicas de uso de fontes naturais renováveis, em contrapartida estimulam a busca pela comprovação da segurança e dos efeitos terapêuticos associados ao uso tradicional de plantas na medicina brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011)

Alguns gêneros de plantas têm sido relatadas por seus efeitos cardioprotetores. Dentre eles, o gênero *Vitis*, conhecidas por compor as espécies de uvas utilizadas na produção de vinhos e sucos, vem se destacando por suas propriedades vasodilatadoras, reduzindo a resistência periférica total e, por conseguinte a pré-carga pressórica (NAMES, 2013)

Deste modo, a espécie *Vitis vinífera*, apresentou propriedades cardioprotetoras, devido às reduções pressóricas anteriormente relatadas (ORALLO, 2002) dependentes das produções de óxido nítrico (MOURA, 2002) e efeitos

antioxidantes (CHIDAMBARA, 2002). Também foram avaliados os efeitos cardioprotetores de procianidinas (MANFREDI, 2003) e de compostos polifenólicos derivados de *Vitis vinífera* (LEIFER, 2008).

A miricetina, flavonoide derivado de *Vitis vinífera*, foi capaz de reduzir os níveis de CK total, aumentou as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase e foi capaz de diminuir a desordem na frequência cardíaca induzida por isoproterenol (TIWARI, 2009).

O resveratrol, polifenol encontrado em espécies de *Vitis*, mostrou a capacidade de produzir efeitos cardioprotetores, devido à modulação nas funções de células vasculares, modula efeitos vasorelaxantes (LI, 2000), inibe a oxidação de LDL, suprime a agregação plaquetária e reduz o dano miocárdico durante o infarto induzido pelo modelo isquemia-reperfusão, deste modo tem sido relatado com o componente responsável pelo efeito cardioprotetor de espécies de uvas (BRADAMANTE, 2004).

De modo semelhante, a espécie *Vitis labrusca*, foi investigada quanto aos seus efeitos cardioprotetores, o extrato etanólico das folhas, promoveu redução no estresse oxidativo, lipoperoxidação e foi capaz de modular as enzimas superóxido dismutase e catalase (OLIBONI, 2011).

Também, já foram relatados na literatura seus efeitos cardiovasculares, anti-hipertensivos indutores de vasorelaxamento dependentes de endotélio (MOURA, 2004).

O gênero *Allium* e seus compostos isolados têm sido reportados na literatura por suas atividades cardioprotetoras, a espécie *Allium ursinum*, promoveu efeito cardioprotetor e reduziu os distúrbios hemodinâmicos presentes no IAM, estes efeitos se devem a inativação da enzima conversora de angiotensina, gerando redução na liberação de angiotensina II e seus efeitos reduzindo o volume e débito cardíaco, e assim diminuindo a pré-carga vascular, deste modo há bloqueio do processo de remodelamento cardíaco e falência miocárdica resultante da hipertensão e seus agravos a longo prazo, estes efeitos tem sido atribuídos ao ácido gálico (RIETZ, 1993)

A espécie *Allium sativum*, induz efeito cardioprotetor, por bloqueio da lipoperoxidação induzida durante a isquemia (SARAVANAN, 2004), além de possuir efeito vasorelaxante e reduzir calcificações coronárias, facilitando a irrigação miocárdica e o consumo de oxigênio, prevenindo assim a hipóxia, o ácido gálico foi apontado como responsável por este efeito (GINTER, 2010). De maneira análoga, a espécie *Allium chinense*, produz efeito cardioprotetor dependente da via oxidativa, este é capaz de reduzir o estresse oxidativo lipídico em cardiomiócitos isolados (REN, 2010).

O extrato metanólico de *Allium cepa*, produziu efeito cardioprotetor, por redução da hipóxia induzida bem como, redução sobre a apoptose mediada pela caspase III (PARK, 2009).

O gênero *Crocus*, caracterizado por compostos pigmentares alimentícios comercializado como especiarias na ásia, foram avaliados quanto às propriedades cardioprotetoras, a espécie *Crocus sativus*, produziu redução nos distúrbios hemodinâmicos, bioquímicos e histopatológicos presentes no IAM (GOYAL, 2010) assim como, redução na injúria induzida por isoproterenol (SCHDEVA, 2012). O safron e o safronal, produtos derivados de *Crocus sativus*, demonstraram seus efeitos cardioprotetores (MEHDIZADEH, 2013) reduzindo os índices hipertróficos cardíacos induzidos pelo IAM (JOUKAR, 2012).

O gênero *Terminalia*, foi relatado por suas ações cardioprotetoras, a espécie *Terminalia arjuna*, possui seus efeitos atribuídos às propriedades antioxidantes e bloqueio da cascata apoptótica (SHUKLA, 2012), a espécie *Terminalia pallida*, diminuiu as taxas de biomarcadores e melhorou os aspectos histopatológicos do IAM (SHAIK, 2012).

O gênero *Syzygium*, tem apresentado efeitos cardioprotetores, por suas propriedades antioxidantes, o extrato metanólico das sementes de *Syzygium cumini*, promoveu cardioproteção, reduziu os níveis de CK-MB, CK-NAC e LDH (MASTAN, 2009). A espécie *Syzygium aromaticum*, mostrou efeitos cardioprotetores dependente de seus efeitos antioxidantes (OWEN, 2002).

Neste contexto, a família *Ziginberaceae*, possui cerca de 1.200 espécies e cerca de 53 gêneros, dentre eles o gênero *Alpinia*, este é abundante na região da

indo-malásia, componentes de diversas medicinas alternativas como ayurvédica e chinesa e conhecidas por seus compostos aromáticos, utilizados na aromaterapia (ELPO,2004). Recentes estudos têm demonstrando que, algumas plantas da família *zingiberaceae* possuem efeitos cardioprotetores, como: *Zingiber officinale* popularmente conhecido como “gengibre” e *Alpinia chinensis*, planta originária do oeste asiático com propriedades antioxidantes e utilizadas na medicina tradicional chinesa (ANASARI, 2006;TIWARI, 2012).

*Alpinia speciosa* (Pers.) B.L.Burtt. & R.M. Smith (sinonímias científicas: *Alpinia zerumbet*, *Costus zerumbet*, *Languas speciosa*, *Zerumbet speciosa*-CORREIA,2010)é uma planta aromática utilizada na ornamentação doméstica, pertencente à família Zingiberaceae, é encontrada com facilidade nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo incluindo o Brasil. No nosso país é conhecida popularmente como colônia e é amplamente utilizado na medicina popular mundial, dentre seus usos populares destacam-se em sua aplicação na hipertensão arterial e no tratamento de úlcera (ARAÚJO, 2005).

Diversas atividades farmacológicas têm sido relatadas na bibliografia para o óleo essencial de *Alpinia speciosa* como: efeito antinociceptivo (ARAÚJO, 2005), efeito miorelaxante (WONG, 2009), efeito ansiolítico (KOIKE, 2009), efeito neuroléptico (ARAÚJO, 2010), dentre outras.

Os efeitos cardiovasculares induzidos pelos extratos ou componentes isolados de *A. speciosa* são bem referidos na literatura.

Moura e colaboradores 2005 descreveram o efeito anti-hipertensivo e vasorelaxante induzido pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *A. speciosa*. Os autores atribuem o efeito anti-hipertensivo a propriedade vasorelaxante dependente de endotélio, seu mecanismo está associado a síntese de óxido nítrico via GMPc (MOURA, 2005). O óleo essencial e monoterpenos isolados da *A. speciosa* induziram efeito anti-hipertensivos e vasorelaxantes em ratos DOCA-sal (LAHIOU, 2003).

Em átrios isolados de ratos, o óleo essencial desta planta foi capaz de promover uma atividade cardiodepressora por bloqueio de canais de cálcio tipo L (SANTOS 2011). O extrato etanólico das sementes de *A. speciosa* foi capaz de

aumentar os níveis de colesterol de alta densidade (HDL) e reduzir o colesterol de baixa densidade (LDL), indicando efeitos hipolidêmicos (LIN, 2008). Foi relatado também o efeito antiplaquetário de substâncias isoladas dos rizomas de *A. speciosa* (TENG, 1990). Os efeitos antioxidantes do óleo essencial desta planta foram descritos por Tawata (TAWATA, 2007) Victório e colaboradores 2009, correlacionam as melhoras hemodinâmicas com suas propriedades antioxidantes (VICTÓRIO, 2009).

Quanto aos aspectos toxicológicos, o extrato hidroalcoólico apresentou baixa toxicidade em testes de toxicidade aguda e subaguda em camundongos (MENDONÇA, 1991). Porém não há relatos das propriedades cardioprotetoras induzidos pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa*

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Avaliar o possível efeito cardioprotetor induzido pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa*, em ratos wistar, infartados por indução com isoprotenerol.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

Aferir as taxas séricas da aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK)

Avaliar a morfometria nas relações peso/espessuras do miocárdio;

Determinar as áreas de lesões necróticas no miocárdio, avaliando a extensão do infarto instalado;

Examinar a histologia do miocárdio, observando a formação de mionecrose, infiltrado de células leucocitárias e remodelamento cardíaco pós-infarto.

## **4.MATERIAL**

### **4.1 COLETA BOTÂNICA**

4,5 Kg de folhas de *A. speciosa* foram coletadas em setembro de 2010, no bairro Cidade Universitária em Maceió - Alagoas. A espécie foi devidamente identificada pela botânica Flávia de Barros Prado Moura. Uma exsicata do material botânico encontra-se depositada no Herbário Professor Honório Monteiro (MUFAL), sob n.º de registro MUFAL 4090.

### **4.2 ANIMAIS**

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar machos, (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 e 350 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água.

Todos os procedimentos experimentais descritos neste trabalho estão de acordo com as normas de uso de animais em laboratório conforme descritos em guias de experimentação animal e o presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa conforme número de protocolo N°010852/2009-01.

### **4.3 SUBSTÂNCIAS**

Tiopental sódico (Cristália prod. Quím e farmacêuticos®), Isoproterenol (Sigma Chemical, USA), Cremophor (Sigma Chemica, USA) Kits bioquímicos: CK-NAC liquiform, CK-MB liquiform, LDH liquiform, AST liquiform (Labtest), Etanol P.A (Merck®), Ácido acético glacial (Merck®), Clorofórmio (Merck®), Ácido pícrico (Merck®), Xilol (Dinâmica), Parafina histológica 55°C (Labsynth ®), Parafina histológica 60° C(Labsynth ®), Hematoxilina (Interlab ®), Eosina (Interlab ®), Tricrômio de manson (Interlab ®), Intelã (Interlab ®) Cloreto de trifetil tetrazólio (Merck®)

## **5.MÉTODOS**

### **5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *ALPINIA SPECIOSA* (EHAS)**

As folhas foram secas na sombra sem ventilação durante 6 dias e depois trituradas, resultando em peso seco de 4 Kg. Em seguida, as folhas foram submetidas a um processo de extração utilizando uma mistura hidroalcoólica (proporção: 90% de etanol mais 10% de água destilada), sob forte agitação em 5 ciclos de meia hora cada. O extrato foi seco sob pressão reduzida em evaporador rotatório e após este processo foram obtidos 3,5 Kg de extrato hidroalcoólico das folhas com rendimento de 85,65%. O extrato foi desenvolvido no Laboratório de Produtos Químicos e Recursos naturais da Universidade Federal de Alagoas orientado pelo Profº. Drº. João Xavier de Araújo Júnior. Em seguida o extrato bruto foi cedido ao nosso laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

### **5.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS *ALPINIA SPECIOSA*.**

O extrato foi solubilizado em cremofor® (3 %) e dissolvido em solução salina para obtenção da dose de 300 mg/Kg (solução estoque).

### **5.3 INDUÇÃO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

A indução do infarto foi realizada conforme técnica descrita por RAJADURAI; STANELY; MAINZEN; PRINCE, 2006. O isoproterenol foi dissolvido em salina e injetado por via subcutânea nos animais na dose de 85 mg/Kg por dia durante dois dias consecutivos.

### **5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Os animais foram alocados randomicamente em três grupos com cinco animais cada, conforme abaixo:

- Grupo não infartado tratado com solução salina 0,9% -SC;
- Grupo infartado com isoproterenol (85 mg/kg, 2x s.c.) e tratado com solução salina -ISO

-Grupo tratado com o extrato na dose de 300 mg/Kg e induzidos ao infarto com isoproterenol (85 mg/kg, 2x s.c.) -EHAS.

Figura1- Representação esquemática do delineamento experimental por método simpatomimético



FONTE: TENÓRIO, E.P.2014

Os animais foram submetidos ao tratamento diário com o extrato ou salina por gavagem (via oral) durante 26 dias e submetidos ao modelo de infarto no 25º e 26º dia. No 27º dia, todos os grupos foram submetidos aos testes *post mortem* (bioquímicos, morfométricos, macroscópicos e histopatológicos) com a finalidade de avaliar as alterações cardíacas induzidas pelo isoproterenol, bem como possíveis melhoras, associadas ao tratamento subcrônicos com EHAS.

## 5.5. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS

### 5.5.1. Peso médio corporal dos ratos

Para avaliação de massa corpórea, os ratos foram pesados em balança semi-analítica modelo SHIMADZU® no início do tratamento (1º dia) e no último dia do tratamento (27º dia).

### 5.5.2. Peso médio dos corações

Os três grupos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia (Tiopental sódico, 45 mg/Kg, i.p.). Os corações foram excisados, isolados, limpos de tecidos conectivos, lavados com solução salina 0,9% e em seguida pesados em balança analítica modelo MARTE<sup>®</sup>.

### 5.5.3. Espessura ventricular

Os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia. Os corações foram retirados, lavados com solução salina 0,9% e depois seccionados em posição longitudinal. Os ventrículos, esquerdo e direito, foram medidos através de escala milimetrada utilizando paquímetro. Em seguida foram fotografados *in natura* e sequencialmente submersos em fixador bouin.

## **5.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA: DETERMINAÇÃO DAS TAXAS SÉRICAS DA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST), LACTATO DESIDROGENASE (LDH) E CREATINA KINASE (CK)**

Com a finalidade de avaliar a extensão da lesão cardíaca induzida pelo isoproterenol, as atividades da LDH, CK e AST no soro dos ratos foram medidas. Os ratos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia e o sangue foi coletado através punção cardíaca. O sangue coletado foi, inserido em tubos sem anticoagulante, centrifugado a 800 rpm por 5 minutos, o soro coletado, separando incubado em kits bioquímicos (CK-NAC,CK-MB,LDH e AST) Labtest<sup>®</sup>, e a leitura foi realizada por espectrofotometria, calculadas as médias e os erros em triplicata.

### 5.6.1 Creatino-Kinase total (CK-NAC) e Creatino-Kinase fração MB (CK-MB)

A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. A glicose -6-fosfato, na presença de glicose-6- fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduziu NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorbância em 340 nm é proporcional à atividade da CK na amostra.

### 5.6.2 Lactato Desidrogenase(LDH)

A desidrogenase láctica (LDH) catalisa a conversão reversível de ácido láctico muscular em ácido pirúvico, um passo essencial nos processos metabólicos, que em última análise produzem a energia celular. A LDH catalisa a conversão do piruvato ao lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorvância em 340 nm devido a oxidação do NADH é proporcional a atividade da LDH na amostra.

### 5.6.3 Aspartato Amino Transferase (AST)

A determinação de aspartato amino transferase (AST) ou transaminase glutâmico oxalacética (TGO) foi realizada por método enzimático cinético, usando kit Labtest. A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato. O oxalacetato por ação da malato desidrogenase é então reduzido a malato e a coenzima NADH é oxidada a NAD. A absorvância em 340 nm é resultante da oxidação do NADH e é proporcional a atividade da AST na amostra.

## 5.7 DETERMINAÇÃO DE ÁREAS NECRÓTICAS EM MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO

Os três grupos foram eutanasiados conforme mencionado acima. Os corações foram excisados e congelados por 20 minutos, e depois seccionados em posição transversal em fatias 3-5 mm. Em seguida foram imersos em solução de Cloreto de trifeniltetrazolio à 1% (TTC 1%) em meio tamponado com pH = 7,4 e mantidos em banho-maria sob temperatura de 37 °C por 20 minutos. As secções foram examinadas sob luz, verificando existência de áreas necróticas em decorrência do infarto e em seguida foram fotografadas. O teste baseia-se na propriedade redox do TTC, este é convertido a formazan na presença de desidrogenases, este corante fixa-se nas células formando regiões avermelhadas. Em áreas onde há necrose, as células encontram-se mortas e as desidrogenases inativas, desta forma não ocorre conversão do TTC, assim não há fixação do corante e as regiões permanecem amareladas ou acinzentadas

## **5.8 ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS**

Os ratos foram eutanasiados conforme mencionado acima. Os corações foram retirados, imersos em fixador bouin e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico. Em seguida foram embebidos em parafina, seccionados em fatias de espessura de 4  $\mu\text{m}$ , desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina e eosina e tricrômio de manson. Foram realizados cortes semi-seriado contendo 9 lâminas por peça histopatológica. Os parâmetros analisados nas lâminas foram: Migração leucocitária, contagem leucocitária total e deposição de colágeno em tecidos cardíacos.

## **5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). Para o tratamento estatístico foi utilizado à análise de variância ANOVA, One-way seguido de Newman-Keuls. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando valor obtido para “p” foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Toda a análise estatística e plotagem dos gráficos foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism<sup>®</sup> versão 3.0.

## 6.RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO DE MASSA CORPÓREA

Pode-se observar na tabela 1, que não houve alteração significativa nas massas corpóreas dos animais em decorrência da indução do modelo experimental ou do tratamento com EHAS.

**Tabela 1–Peso corporal (g) dos ratos durante o experimento**

Grupos	1º dia	27º dia
CS	290±5,0	301,0±6,5
ISO	285±2,0	303,0±8,0
EHAS	294±10,2	303,4±12,5

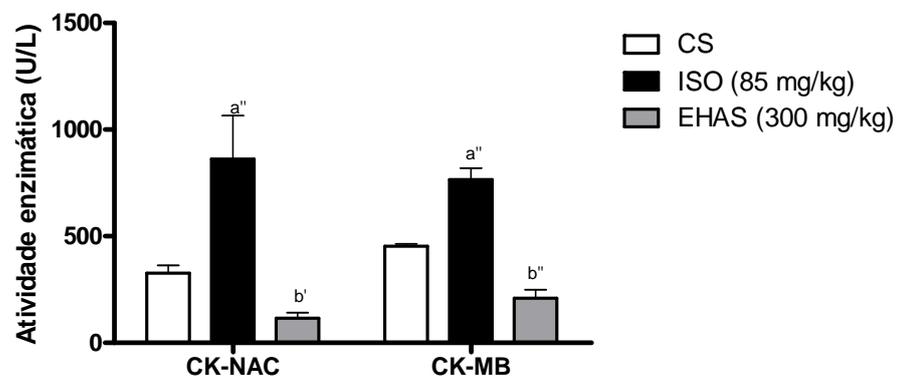
Grupos: Controle salina (CS, n=5), Controle infartado (ISO, n=5) e grupo tratado com extrato hidroalcoólico de *Alpinia speciosa* (EHAS, n=5). Resultados expressos em média± E.P.M analisados estatisticamente em ANOVA one-way, seguido de pós testeNewman-Keuls .

FONTE: TENÓRIO, E.P. 2014

### 6.2 PERFIL ENZIMÁTICO DE LESÕES MUSCULARES

Os resultados obtidos no teste bioquímico (gráfico 1) mostram que houve aumento ( $a'' p < 0,001$ ) nos níveis plasmáticos de CK-NAC (CS=326,3,  $\pm 37,3$ ; ISO= 862,3  $\pm 203,9^{a''}$ ) e CK-MB (CS=452,7  $\pm 11,5$ ; ISO=765,2  $\pm 54,3^{a''}$ ), no grupo infartado ISO em comparação ao grupo controle salina, enquanto que no grupo tratado com EHAS, houve diminuição  $b' p < 0,01$  e  $b'' p < 0,001$  (ISO vs. EHAS) nos níveis de CK-NAC (ISO=862,3  $\pm 203,9$ ; EHAS=115,4 $\pm 25,9^{b'}$ /L) e CK-MB (ISO= 765,2  $\pm 54,3$ ; EHAS=209,6 $\pm 39,9^{b''}$ ) quando comparados ao grupo infartado ISO.

**GRÁFICO 1- ANÁLISE ENZIMÁTICA DE CREATINO-FOSFOQUINASE**



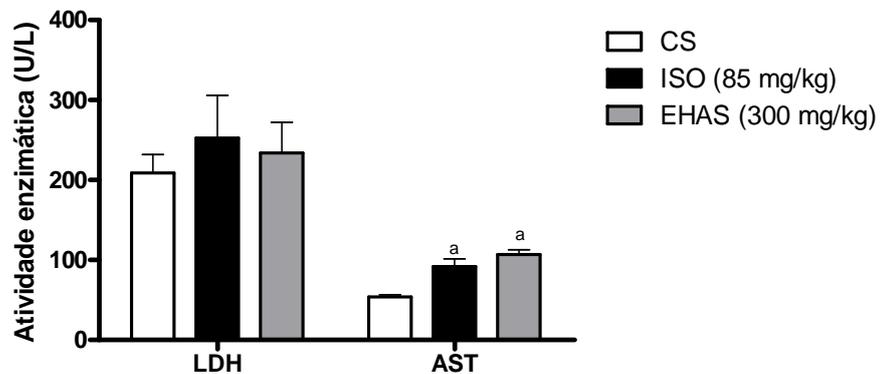
Níveis de atividade enzimática entre os grupos: CS (0,5 mL, v.o, n=5.); ISO (85 mg/kg 2x s.c, n=5.) e EHAS (ISO 85 mg/kg 2x s.c + EHAS 300 mg/kg 26 x V.O, n=5.). Os resultados estão expressos em média±E.P.M. Análise estatística ANOVA one-way seguido de Newman-Keuls considerados significativos quando quando  $a' p < 0,01$  (CS vs. ISO) e  $a'' p < 0,001$  (CS vs ISO)  $b' p < 0,01$  (EHAS vs ISO)  $b'' p < 0,001$  (EHAS vs ISO).

FONTE: TENÓRIO, E.P.2014

### 6.3 PERFIL ENZIMÁTICO DE LESÕES ORGANOCELULARES

Pode-se observar (gráfico 2), que não houve diferença estatística nos níveis enzimáticos de LDH ( $208,0 \pm 22,9$ ;  $233,9 \pm 38,4$ ;  $233,9 \pm 38,4$ ) entre os grupos experimentais. Quanto aos níveis de AST, observa-se aumento ( $^a p < 0,05$ ) da atividade enzimática no grupo ISO (CS= $53,9 \pm 2,5$ ; ISO= $91,7 \pm 9,9^a$ ) quando comparado ao grupo CS assim como, houve aumento ( $^a p < 0,05$ ) no grupo EHAS quando comparados ao grupo CS (CS= $53,9 \pm 2,5$ ; EHAS= $106,7 \pm 6,0^a$ ). Porém não houve diferença significativa quando comparados os grupos EHAS e ISO.

#### GRÁFICO 2-ANÁLISE ENZIMÁTICA DE LACTATO DESIDROGENASE E ASPARTATO AMINO TRANSFERASE



Níveis de atividade enzimática entre os grupos: SC (0,5 mL, v.o, n=5.); ISO (85 mg/kg 2x s.c., n=5) e EHAS (ISO 85 mg/kg 2x s.c +EHAS 300 mg/kg 26 x V.O, n=5.). Os resultados estão expressos em média±E.P.M.Análise estatística ANOVA one-way seguido de Newman-Keuls considerados significativos quando  $^a p < 0,05$ (CS vs ISO)  $^a p < 0,05$  (EHAS vs CS)

FONTE: TENÓRIO, E.P.2014

### 6.4 PERFIL MORFOMÉTRICO

Os resultados deste trabalho mostram (tabela 2) que houve aumento no peso dos corações  $^a p < 0,05$ (CS vs. ISO), na espessura ventricular esquerda  $^a p < 0,01$ (CS vs. ISO) e na razão entre o peso cardíaco e o peso corpóreo  $^a p < 0,001$ (CS vs. ISO). Quando observamos o grupo tratado com EHAS, houve redução no peso dos corações ( $^b p < 0,05$ ), no aumento relativo do peso cardíaco  $^b p < 0,05$ (EHAS vs. ISO), no  $\Delta$  das espessuras ventriculares  $^b p < 0,01$ (EHAS vs. ISO) na espessura ventricular esquerda  $^b p < 0,01$ (EHAS vs. ISO), no aumento relativo da espessura ventricular esquerda  $^b p < 0,01$ (EHAS vs. ISO) e na razão do peso cardíaco sobre o peso corpóreo  $^b p < 0,001$ (EHAS vs ISO).

**Tabela 2–Aspectos morfométricos de corações no desenvolvimento da fisiopatologia do infarto agudo do miocárdio**

Parâmetros	GRUPOS		
	CS	ISO	EHAS
Peso dos corações úmidos (PCard.(mg))	1.200±64,5	1.578±63 <sup>a</sup>	1.323±88,4 <sup>b</sup>
Espessura ventricular direita (EVD(mm))	4,0 ±0,3	4,8 ±0,2	3,8 ±0,4
Espessura ventricular esquerda (EVE(mm))	4,8 ±0,2	6,2 ±0,3 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,3 <sup>b</sup>
Aumento relativo do peso cardíaco (%)	-----	36,46±13,16	-14,57±9,6 <sup>b</sup>
Razão peso cardíaco/peso corpóreo (R = Pcard/P corp(%))	3,98±0,1	5,20±0,12 <sup>a</sup>	4,36±7,07 <sup>b</sup>
Aumento relativo (EVE)	-	31±12,68	-24±7,39 <sup>b</sup>
Δ EVE	-	+1,4±0,5	-1,6±0,5 <sup>b</sup>
Δ EVD	-	+ 0,8±0,2	-1,0±0,31 <sup>b</sup>

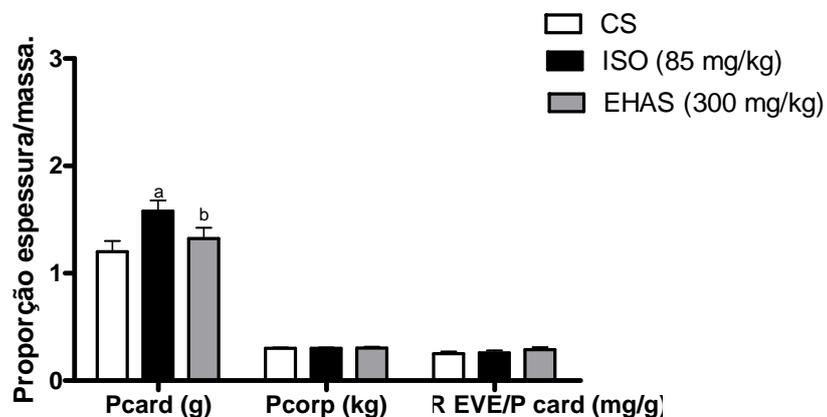
Dados expressos em Média ± E.P.M em função dos grupos : (CS, n=5) , (ISO, n=5) e (EHAS, n=5). Análise estatística paramétrica ANOVA one-way seguido de Newman-Keuls e não paramétrica test “t” student considerados significativos quando <sup>a</sup>p< 0,05(CS vs. ISO) <sup>b</sup>p<0,05(EHAS vs. ISO) <sup>a</sup>p<0,01(CS vs. ISO) <sup>b</sup>p<0,01(EHAS vs. ISO) <sup>a</sup>p<0,001(CS vs ISO) e <sup>b</sup>p<0,001 (EHASvs ISO)

FONTE: TENÓRIO,E.P.

## 6.5 PROPORÇÃO CARDÍACA

Ao relacionar o peso cardíaco às espessuras ventriculares, observa-se (gráfico 3) que não houve diferença nos resultados obtidos entre os grupos experimentais, porém ao realizar a normalização (tabela 2) do peso cardíaco ao peso corpóreo, observamos que houve aumento <sup>a</sup>p<0,001(CS vs ISO)do grupo ISO em relação ao grupo CS (CS=3,98±0,1;ISO 5,20±0,1<sup>a</sup>) e redução <sup>b</sup>p<0,001 (EHAS vs ISO) no grupo EHAS quando comparado ao grupo ISO (EHAS=4,36±7,07<sup>b</sup>;ISO=5,20±0,1)

### GRÁFICO 3- PROPORÇÃO CARDÍACA

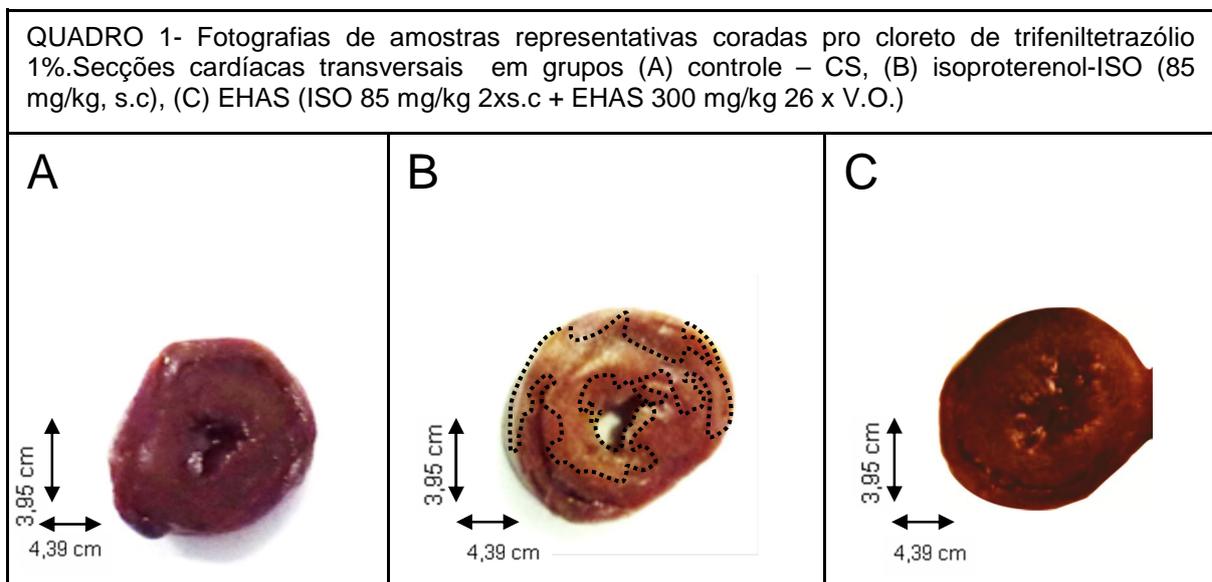


Análise morfométrica de proporções entre massas e espessuras ventriculares nos grupos: CS (0,5 mL v.o.) ISO (85 mg/kg 2x s.c.) e EHAS(ISO 85 mg/kg 2 x s.c +EHAS 300 mg/kg 26 x v.o.).Os valores estão expressos em média± E.P.M. Análise estatística ANOVA one-way seguido de Newman-Keuls, considerado significativo quando <sup>a</sup>p< 0,05(CS vs. ISO) <sup>b</sup>p< 0,05(EHAS vs. ISO)

FONTE: TENÓRIO,E.P.2014

## 6.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA DE CORAÇÕES

No quadro 1, observa-se que no grupo ISO, há formação de zonas de necrose, as quais caracterizam-se por coloração amarela, enquanto que no grupo EHAS não houve desenvolvimento de regiões de necrose, onde observa-se uma coloração vermelha intensa semelhante ao grupo CS, no qual há conservação de estruturas viáveis



FONTE: TENÓRIO, E.P.2014

## 6.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Nos quadros 2 e 3, observamos que em lâminas do grupo ISO há presença de infiltrado de células leucocitárias, formação de edema, separação de fibras musculares, perda da morfologia muscular fusiforme e inserção de colágeno interfibrilar. Enquanto que ao observar lâminas do grupo EHAS, houve redução de todas as modificações histopatológicas citadas acima. Na tabela 3, observamos que há aumento <sup>a</sup> $p < 0,001$  (CS vs ISO) da contagem total de leucócitos no grupo ISO quando comparados ao grupo CS (CS=413±0,7 vs ISO=3.517±4,5<sup>a</sup>), no entanto quando observamos o grupo EHAS, verificamos que houve redução <sup>b</sup> $p < 0,001$  (EHAS vs ISO) da contagem leucocitária em relação ao grupo ISO (ISO=3.517±4,5 vs EHAS=1.376±2,6<sup>b</sup> céls)

**Tabela 3- Análise quantitativa histológica sobre infiltrados leucocitários**

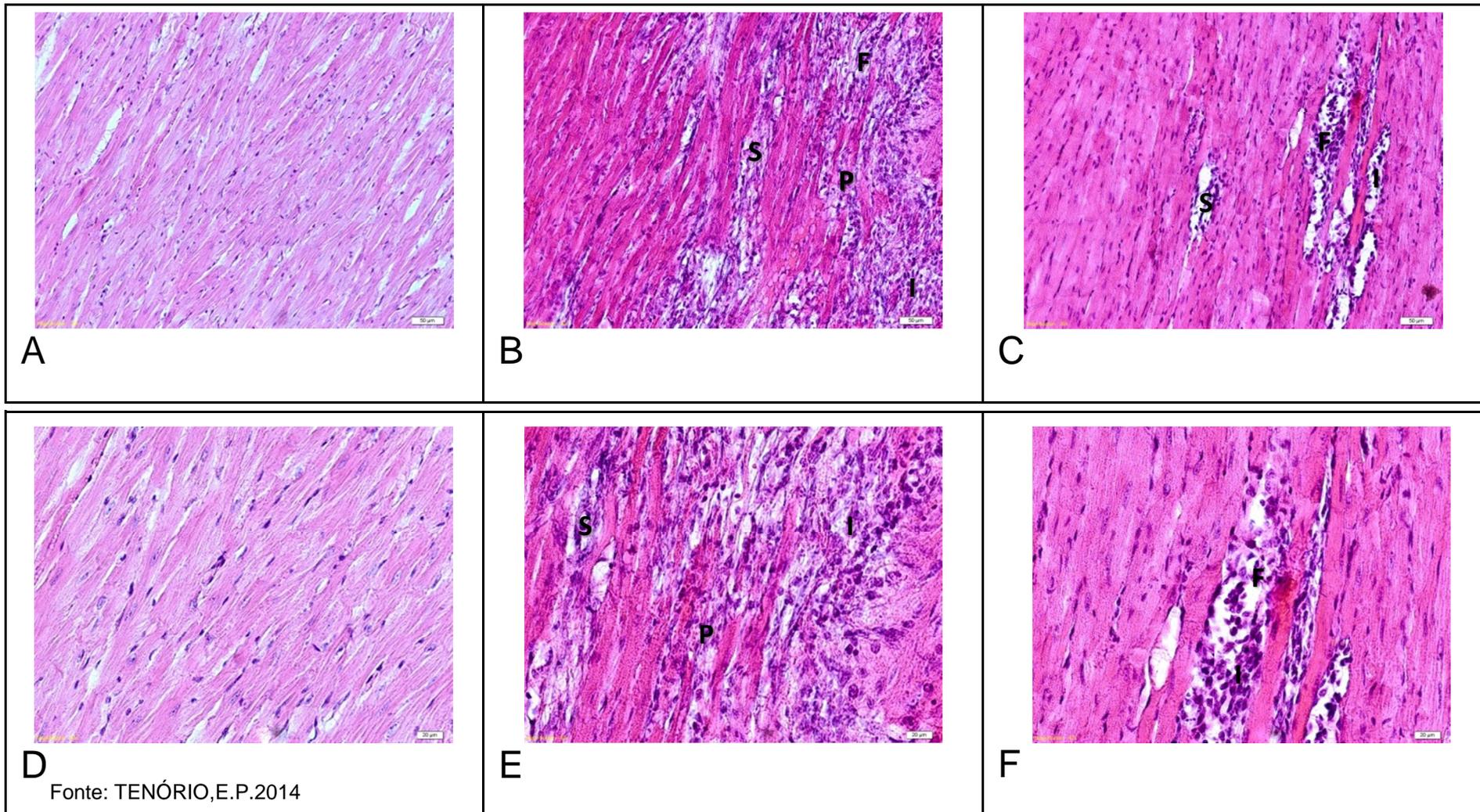
<i>Parametro</i>	<i>CS</i>	<i>ISO</i>	<i>EHAS</i>
<b>Contagem Total de Leucócitos(CTL)</b>	413± 0,7	3.517±4,5 <sup>a</sup>	1.376±2,6 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em Média ± E.P.M em função dos grupos (CS n=3), (ISO n=3) e(EHAS n= 3). A análise estatística paramétrica Análise estatística ANOVA one-way seguido de Newman-Keulse como analise não paramétrica test "t" student. Considerados significativos quando <sup>a</sup>p<0,001(CSvs ISO)<sup>b</sup>p<0,001 (EHASvs ISO)

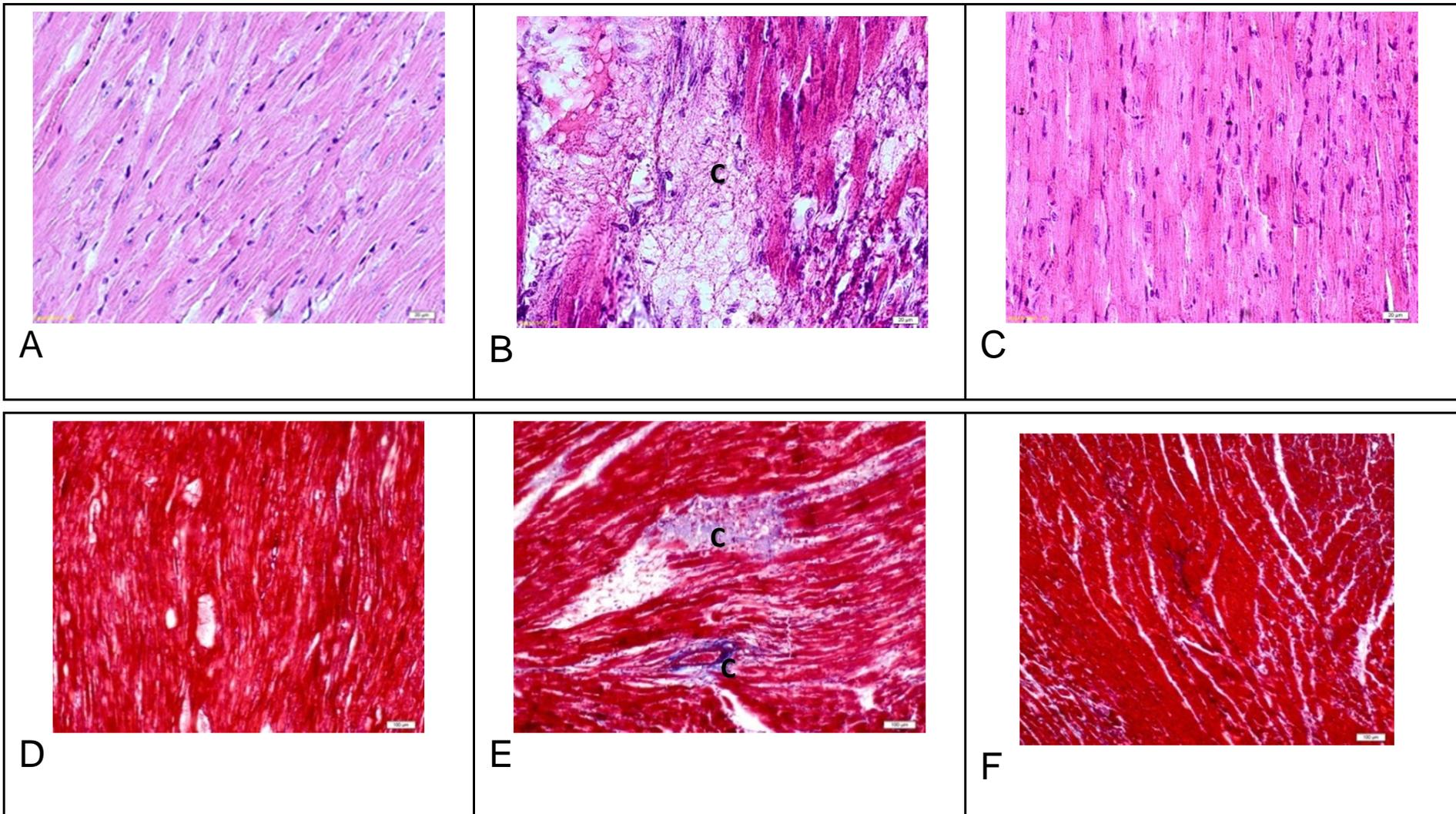
FONTE: TENÓRIO,E.P.2014

Quadro 2- Fotomicrografias de secções histopatológicas(20 e 40x respectivamente)de corações isolados dos grupos experimentais:GRUPO A (A e D) controle salina, GRUPO B (B e E) isoproterenol-ISO (85 mg/kg, s.c), GRUPO C (C e F) tratados com EHAS ( ISO 85 mg/kg 2x s.c + EHAS 300 mg/kg 26 x V.O). As secções do grupo A (A e D) mostram arquitetura cardíaca normal. As secções do grupo B (B e E) revelam focos de mionecrose e infiltrados leucocitários (miocardite). As secções do grupo C (C e F) baixa distribuição e baixa intensidade de mionecrose e infiltrado leucocitário.

F= foco de mionecrose/ S= separação miofibrilar/ I= Infiltrado leucocitário/ P= perda da conformação fusiforme



Quadro 3- Fotomicrografias histopatológica (40x H.E.) e (10 x T.M) de cortes de corações em grupos: (A e D) Controle salina, (B e E) isoproterenol-ISO (85 mg/kg, s.c), (C e F) EHAS ( ISO 85 mg/kg 2x s.c + EHAS 300 mg/kg 26 x V.O). C= colágeno interfibrilar



## 7DISCUSSÃO

Diante do objetivo proposto, avaliamos a atividade cardioprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa* em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio induzido por fármaco simpaticomimético. Foram utilizados testes *post mortem*, tendo em vista a junção de análises laboratoriais, tais quais: macroscopia colorimétrica, com a finalidade de avaliar o surgimento de regiões necróticas em corações, bioquímica, verificando o aumento de biomarcadores de lesões musculares (CK-NAC e CK-MB) e histologia para visualizar possíveis alterações sobre a arquitetura e organização miocelular.

É bem reportado na literatura, que a administração de altas doses de isoproterenol, fármaco simpaticomimético, bem como sua exposição repetida, provoca IAM em ratos (LOBO-FILHO, 2011). Portanto, o modelo experimental de indução do IAM com fármaco simpaticomimético vem sendo utilizada como um método com alta sensibilidade e reprodutibilidade desta patologia, logo, servindo como modelo experimental para busca de novos fármacos capazes de promover proteção cardíaca ao infarto (GENG, 2004).

Já está bem estabelecido, que o isoproterenol é capaz de promover alterações bioquímicas, como aumento dos biomarcadores CK-MB e CK-NAC (enzimas envolvidas na captação de fosfatos de alta energia em processos musculares) após 24 horas de sua administração, mantendo um platô em torno de 3 dias após a indução (ACIKEL, 2005).

Os resultados obtidos neste estudo, do grupo experimental ISO (gráfico 1, pág. 46) foram semelhantes aos encontrados na literatura, houve aumento da liberação dos biomarcadores de lesões musculares associada ao infarto CK-NAC e CK-MB. Assim, comprovamos que houve desenvolvimento do IAM induzido por droga simpaticomimética no grupo controle, conforme a técnica experimental.

Estudos recentes mostram que, altas taxas de CK-NAC (presente em tecidos musculares) e CK-MB (isoforma encontrada em tecidos cardíacos), empregados na utilização de fosfatos de energia em miofibrilas, são considerados clinicamente como marcadores bioquímicos de lesões cardíacas auxiliares no diagnóstico do IAM (HEARSE, 2000), assim como a redução dos níveis destes índices vem sendo

associada ao melhor prognóstico miocárdico isquêmico em ratos submetidos a indução de IAM (THOMES,2010)

No presente estudo, o tratamento prévio com o EHAS reduziu a atividade enzimática dos biomarcadores (CK-NAC e CK-MB) no soro, indicando que a liberação enzimática de creatino fosfoquinase na corrente sanguínea foi significativamente atenuada, estes resultados sugerem proteção cardíaca induzida pelo tratamento crônico com EHAS frente à cardiotoxicidade do isoproterenol.

Estas enzimas são obrigatoriamente intracelulares, sua atividade aumenta na corrente sanguínea, após episódios de lesões sobre o tecido muscular, bem como no IAM originado por necrose. Após degeneração celular, ocasionada pela necrose, há extravasamento do conteúdo citoplasmático e aumento dos níveis séricos, assim diminuição sérica de CK-MB e CK-NAC, são atribuídos há proteção dos miócitos cardíacos (RAJADURAI, 2007).

Assim a redução na atividade enzimática, encontrado no grupo tratado, proporciona observar, que possivelmente houve impedimento da degeneração celular e da formação de lesões necróticas induzidas pelo ISO, havendo integridade das células do tecido muscular cardíaco, bem como normalização no perfil bioquímico e citológico, promovendo melhora no trabalho cardíaco

O isoproterenol pode provocar aumento nos níveis de desidrogenases e transaminases, por desordem no funcionamento celular e injúria miocárdica (SANCHEZ, 1997). Células miocárdicas quando submetidas ao deficiente suprimento de oxigênio ou glicose tendem a sofrer rupturas membranares, promovendo liberação do conteúdo citoplasmático, como complexos enzimáticos: CK-MB e LDH-2, aumentando seus níveis sanguíneos. O modelo experimental isoproterenol possui a capacidade de mimetizar este processo, indicando a formação de processo patológico de injúria (STANELY, 2008).

Porém, a utilização de desidrogenases no diagnóstico do IAM tem sido empregado como biomarcador secundário, devido sua inespecificidade, estes estão presentes na maioria dos órgãos, assim o aumento da LDH pode ser atribuído a lesões de modo generalizado, assim como a redução deste pode não ter significado clinicamente relevantes (ABHILASH,2010)

Os resultados obtidos neste trabalho, mostram que não houve aumento significativo (gráfico 2, pág. 47) nas taxas séricas de lactato desidrogenase no grupo ISO em comparação ao grupo CS, bem como no grupo EHAS, onde também observamos que não houve aumento significativo nas taxas de LDH.

Quanto a enzima aspartato aminotransferase, observamos aumento dos níveis séricos no grupo ISO em relação ao grupo SC, assim como aumento dos níveis enzimáticos no grupo EHAS em relação ao grupo CS (gráfico 3, pág.48). Os resultados da AST, refletem a toxicidade hepática provocada pelo isoproterenol que em altas doses é rapidamente oxidado (VAAGE, VALEN, 1993) e convertido a metabólitos, como: adenocromos e quinonas. Estas são altamente tóxicas, pois promovem ataques eletrofílicos a glutatona. (REMIÃO, 2000). A glutatona é um tripeptídeo linear e encontra-se densamente em hepatócitos, sua função está relacionada a conversão metabólica de xenobióticos, assim ataque a este, inicia sinalização apoptótica, liberando-os na corrente sanguínea (HUBER,2008).

Falhas na manutenção iônica propulsionadas por bombas têm sido consideradas as principais razões na formação patogênica das isquemias e arritmias. Reduções na ativação de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$  poderia ocorrer devido ao aumento da lipoperoxidação (ITHAYARASI, 1997) induzida por radicais livres, assim, o isoproterenol aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente se tornam capazes de elevar os níveis de lipoperoxidação celular, estes por sua vez interrompem a homeostase iônica que afetam as funções cardíacas, como as rupturas celulares e extravasamento citoplasmático (VAJRESWARI, 1992).

O tratamento com EHAS sugere reestabelecimento da homeostase cardíaca, tendo em vista a diminuição nos níveis de CK-MB e CK-NAC, que como citado anteriormente são intracelulares, logo a redução destes, sugerem preservação na homeostase celular miocitária, bem como do conteúdo intracelular.

Deve-se ressaltar ainda que antioxidantes endógeno são capazes de promover melhoras na disfunção celular, pelo impedimento dos ataques eletrofílicos membranares induzidos por isoproterenol e suas formas oxidadas, assim como reduzir o início da apoptose mediada por radicais livres (CHEN, 2002). Recentemente a atividade antioxidante foi descrita para o óleo essencial obtida das

folhas de *Alpinia speciosa*, em testes DPPH (TAWATA,2006). Bem como, efeitos cardioprotetores de produtos antioxidantes descritos na literatura moderna. (PRIOR, CAO, 2000). Assim, a propriedade antioxidante pode participar no reestabelecimento da homeostase cardíaca.

Durante o desenvolvimento do IAM, ocorrem mudanças morfológicas sobre o coração, estas são denominadas hipertrofias, a principal hipertrofia associado ao infarto é a hipertrofia concêntrica, caracterizada pelo aumento de massa celular assim como aumento das espessuras ventriculares miocárdicas (FRANCHINI, 2001).

O isoproterenol induz aumento da frequência cardíaca, das forças cronotrópicas positivas (GOLDMAN, 1995). Estes eventos em exposições repetidas mimetizam: hipóxia, extrusão dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ , aumento das espécies reativas de oxigênio, aumento dos níveis enzimáticos, mudanças na permeabilidade do sarcolema e mudanças degenerativas teciduais, que culmina em mecanismos sinalizadores de necrose e mecanismos reparativos como a hipertrofia miocárdica (KARTHICK, 2006).

Estudos da literatura mostram que o isoproterenol é capaz de promover hipertrofia cardíaca, através da sobrecarga pressórica induzida (SHARMA, 2001) bem como, pela sua interação direta com receptores  $\beta_1$  que aumentam os níveis de TGF- $\beta$  e HIF 1a, estes aumentam a massa cardíaca sem indução de gênese celular (GOLDSTEIN, 1995; TAIMOR, 2001).

Com a finalidade de avaliar a hipertrofia induzida por isoproterenol, realizamos a medida direta das relações de espessuras ventriculares e peso dos corações úmidos, assim como os aumentos relativos e a diferença de crescimento ventricular.

Os resultados morfométricos das relações entre as espessuras ventriculares e massa cardíaca, obtidos neste estudo mostram (tabela 2, pág. 48) que houve desenvolvimento hipertrófico no grupo ISO, em virtude do aumento significativo do peso cardíaco, da espessura ventricular esquerda e o índice de massa cardíaca indicado pela normalização do peso cardíaco pelo peso corporal.

Recentemente, estudos cardioprotetores indicam a necessidade da correlação do peso cardíaco normalizado pelo peso corpóreo, com a finalidade de

observar efeitos hipertróficos (BRAGNOLLO, 2007). Os resultados do grupo EHAS, mostram redução dos parâmetros morfométricos, indicando que o extrato foi capaz de reduzir o remodelamento cardíaco induzido pelo isoproterenol.

É válido ressaltar que em todos os protocolos adotados neste estudo, os animais foram mantidos sem exposição à esforços físicos, sendo assim os resultados mensurativos hipertróficos observados neste trabalho advém da indução patológica simpatomimética

Após o início do IAM, há sinalização de mecanismos reparativos, dentre eles o remodelamento concêntrico. Borges e cols demonstram que em condições normais a massa ventricular, deve se manter na proporção de 0,6 a 1,1% quando relacionado ao peso cardíaco (BORGES, 2001). Como pode ser observado através do gráfico 3, a espessura ventricular foi proporcional ao peso cardíaco não ultrapassando 1,1%, indicando normalização cardíaca e redução da hipertrofia induzida por ISO.

Estudos de Sandmann e colaboradores mostram que bloqueadores de canais para  $Ca^{2+}$  são capazes de impedir o remodelamento cardíaco causado pelo infarto do miocárdio em ratos, havendo redução dos índices morfométricos, semelhantes aos resultados deste trabalho (SANDMANN, 2001). É válido lembrar, que recentemente o óleo essencial obtido das folhas de *Alpinia speciosa*, foi capaz de promover bloqueio dos canais de cálcio do tipo L em átrios e cardiomiócitos isolados (SANTOS, 2011).

Sendo assim, sugere-se que o bloqueio no desenvolvimento da hipertrofia induzida pelo isoproterenol pode ser conferido ao impedimento da excitação cardíaca extenuante, possivelmente pelo bloqueio nas desordens sobre sinalizadores de  $Ca^{2+}$  mediado por canais iônicos, bem como inibição da sobrecarga de cálcio nos miócitos (NAYLER, 1991). Resultando em redução na diminuição da força contrátil e do ritmo cardíaco, bem como abolição do aumento da massa celular que seria induzida pelas desordens gerada a partir do aumento progressivo dos efeitos cronotrópicos e ionotrópicos positivos (RICHARD, 1992)

Não são encontrados na literatura, dados que indiquem que o isoproterenol induza disfunções metabólicas capazes de induzir obesidade ou emagrecimento em

ratos, apesar deste estimular lipólise através de receptores  $\beta_3$  (RAPOSO, 2013). Esta lipólise parece apenas aumentar a disponibilidade e captação de lipídeos em tecidos cardíacos, em decorrência do trabalho cardíaco exaustivo (REMIAO, 2002). Porém, estudos farmacológicos pré-clínicos crônicos, sugerem a importância de monitorar o peso corpóreo dos animais, como medida de avaliação de distúrbios metabólicos moderados ou graves induzidos pela administração de fármacos em período crônico (KIM, 2004).

Quanto à variabilidade do peso corpóreo dos ratos durante o tratamento com o extrato (tabela 1, pág. 46), observa-se que não houve diferença significativa entre os valores em todos os grupos, assim o perfil metabólico *in vivo* do tratamento crônico manteve-se normal, portanto não houve produção de disfunções metabólicas, como obesidade ou emagrecimento nos ratos neste ensaio.

É encontrado na literatura, que o remodelamento cardíaco pós-infarto, histologicamente caracteriza-se, pela síntese de colágeno e inserção deste no espaço intersticial, a razão deste se deve a resposta celular de agressão que leva a sinalização reparativa de dano celular, impedindo a falência cardíaca.

Estudos recentes mostram que a redução do edema e do colágeno inserido no espaço interfibrilar associados aos resultados morfométricos, mostram bloqueio do remodelamento hipertrófico pós-infarto, indicando fenômenos cardioprotetores (KARTHIKEYAN, 2007)

Os resultados apresentados no quadro 3 (pág. 52) mostram que nas lâminas histológicas do grupo ISO, houve a formação de colágeno interfibrilar, caracterizado pela coloração arroxeada apresentada pelo corante tricromio de manson (SENIOR, 2008) As lâminas histopatológicas do grupo tratado com EHAS (quadro 3, pág. 52) não apresentam colorações compatíveis com a inserção de colágeno revelada pelo tricromio de manson. Assim, os resultados do grupo EHAS, mostram que houve impedimento na síntese do colágeno intersiticial.

O IAM produz alterações histológicas como: invasão leucocitária, formação de miocardite, formação de edema, separação de miofibrilas e perda da conformação fusiforme, formação de focos mionecróticos e inserção de colágeno interfibrilar (FRANGOIANNIS, 2002). Em estudos histopatológicos de tecidos cardíacos, o

isoproterenol produz mudanças sobre a arquitetura e sobre os arranjos na organização celular cardíaca, como: miocardite, surgimento de mionecrose em estado de hipercontração, marginalização de cromatina, edema, perda de conformação muscular e inserção de colágeno interfibrilar (LOBO-FILHO, 2011). A formação de edema caracteriza o primeiro mecanismo fisiopatológico de reparo às lesões musculares em especial cardíacas (ISOYAMA, 1992) e inicia a sinalização do remodelamento pós-infarto que culmina na inserção de colágeno nos espaços necróticos (SINGAL, 1982).

Os resultados histopatológicos deste trabalho (quadro 2, pág. 51) mostram que a administração do isoproterenol, foi capaz de induzir as alterações acima descritas. O grupo tratado com EHAS mostra redução nos parâmetros qualitativos, tais quais: focos mionecróticos, regiões com bordas delimitadas por miofibrilas em meio a zonas com perda da conformação fusiforme e presença de infiltrados de células leucocitárias. Edema, caracterizado pela formação de gotículas de secreção que apresenta-se transparente ao microscópio em áreas onde não há presença de miofibrilas.

Enzimas expressas em membranas, como fosfolipases iniciam um importante papel na regulação do transiente normal iônico em miócitos, algumas alterações nas propriedades destas enzimas, como lipoperoxidação podem afetar a função cardíaca, e podem gerar miocardite por induzir a cascata inflamatória dependente do ácido araquidônico (PADMAVATHY, 1996).

É relatado na literatura que o IAM, produz miocardite, a qual inicia-se com redução da oxigenação, esta hipóxia induz a cascata inflamatória, mediada por quimiotaxia induzida por TNF- $\alpha$ , esta miocardite é caracterizada pela invasão de células inflamatórias mononucleares (NIIJIMA, 1991)

O modelo isoproterenol é capaz de induzir este processo, pela interação direta com receptores  $\beta_1$  que iniciam sinalização apoptótica via extrínseca, induzindo quimiotaxia e invasão tecidual de células leucocitárias (OLIVETTI, 2000).

Os resultados deste trabalho mostram que houve aumento significativo na contagem total de leucócitos no grupo ISO (tabela 3, pág. 50), refletindo a

capacidade do isoproterenol em induzir miocardite, conforme descrito na literatura (PATEL, 2012)

O tratamento com EHAS foi capaz de reduzir significativamente (tabela 3, pág. 50) a contagem total de leucócitos, indicando que o extrato hidroalcoólico de *Alpinia speciosa* foi capaz de diminuir a miocardite induzida por isoproterenol, assim, os resultados revelam que o tratamento com EHAS foi capaz de promover proteção inflamatória miocárdica associada ao IAM induzido por fármaco simpaticomimético

A redução do infiltrado leucocitário indica redução de processos patológicos pró-inflamatórios como o infarto, em resposta à sinalização por hipóxia e liberação enzimática, que induz a formação de necrose tecidual (KISS, 2010). O IAM caracteriza-se pela insuficiência e necrose instalada no coração, provas necropsiais, utilizam o cloreto de trifeniltetrazólio para visualizar a formação de áreas necróticas nos corações *post mortem* (MORAIS, 2009)

Recentemente, esta técnica tem sido utilizada na literatura, para avaliação de produtos ou fármacos cardioprotetores, devido à capacidade de visualização de redução nas áreas de necrose, quando comparados os grupos infartados e tratados (TIWARI, 2009). Atualmente, estudos de IAM induzido por droga simpaticomimética como isoproterenol, tem acoplado a técnica colorimétrica ao método, utilizando-se dela para demonstrar as regiões de necrose desenvolvida em corações. Isto se deve a propriedade redox do cloreto de trifeniltetrazólio, assim como, alterações em desidrogenases induzida pelo isoproterenol (PRABHU, 2006).

O teste *post mortem* colorimétrico TTC 1%, se baseia na propriedade indicadora do potencial REDOX, aplicado aos fluidos e tecidos biológicos. O TTC ou cloreto de trifenil tetrazólio é comumente empregado na diferenciação entre células inativas e células metabolicamente ativas (ALTMAN, 1976). Isto acontece em função do cloreto de trifenil tetrazólio ser reduzido enzimaticamente à TPF (1,3,5-trifenilformazan), o que promove a formação de precipitados vermelhos nas células pelo formazan, enquanto células inativas não convertem o TTC à TPF, formando áreas brancas ou amareladas, indicando áreas de necrose (RAMKISSON, 1996).

Os resultados macroscópico colorimétrico deste trabalho (quadro 1, pág49) mostram que no grupo ISO há presença de zonas amareladas, indicando a área de

necrose induzida por isoproterenol. Quanto ao grupo EHAS, podemos observar que não houve formação de zonas amareladas e há impregação do formazan, indicado pela coloração vermelho intensa, mostrando que não houve desenvolvimento de necrose

Recentemente, foi descrito na literatura a capacidade cardioprotetora de *Zingiber officinale*, conhecida popularmente como “gengibre” o qual é pertencente a família *Zingiberaceae*, os resultados deste trabalho indicam redução nos níveis de biomarcadores enzimáticos (CK-MB, LDH, AST e ALP) e aumentou dos níveis antioxidantes (SOD, CAT, GSH e TBARS) redução dos aspectos histopatológicos como invasão leucocitária e regiões de mionecrose (ANASARI, 2006).

De modo semelhante à espécie *Alpinia chinensis* foi testada quanto às propriedades cardioprotetoras de uma formulação ayurvédica a qual era composta por esta espécie pertencente ao gênero *Alpinia*, foram observadas reduções dos biomarcadores enzimáticos e melhora no perfil inflamatório do miocárdio (TIWARI, 2012).

Estes estudos fornecem subsídios técnico-científico que amparam os resultados encontrados em nosso estudo, devido a capacidades destes extratos reduzirem alterações as alterações patológicas associadas ao infarto semelhante aos resultados obtidos nestes trabalho, demonstrando assim que o pré-tratamento com o EHAS provê indícios de induzir atividade cardioprotetora.

A capacidade efetiva de prevenir as alterações anteriormente relatadas fornece a manutenção da integridade tecidual e organizacional, favorecendo a homeostase, e isto pode ser definido como cardioproteção (WEIR, 2003).

Desta maneira, o uso de fármacos ou agentes farmacológicos capazes de prevenir o infarto promovem efeitos cardioprotetores (PRINCE, 2011). Em revisão, o tratamento com EHAS, foi capaz de: reduzir os níveis de biomarcadores do infarto (CK-NAC, CK-MB), reduziu índice morfométricos cardíacos relacionados ao processo hipertrófico (Peso cardíaco, espessura ventricular esquerda, normatização do peso cardíaco em razão do peso corpóreo, aumentos relativos e diferença do crescimento ventricular), reduziram índices histológicos (infiltrados leucocitários,

edema, separação de fibras musculares, focos de mionecrose e colágeno interfibrillar) e impediu a formação de regiões de necrose em teste macroscópico.

É mencionado na literatura que a espécie estudada apresenta atividade antioxidante, bloqueadora de canais de cálcio tipo L, vasorelaxante endotélio dependentes, anti-hipertensiva. Estas atividades em conjunto podem provavelmente serem responsáveis pelo efeito cardioprotetor do extrato. Entretanto, estudos futuros serão necessários para avaliar tais mecanismos intrínsecos a este efeito.

## 8 CONCLUSÃO

No presente trabalho podemos concluir que o tratamento prévio com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Alpinia speciosa*, apresentou um potencial cardioprotetor significativo e pode servir como um adjuvante no tratamento e profilaxia do infarto do miocárdio através de preparações caseiras como chás.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P.A cols. **Cardioprotective effects of aqueous extract of *Oxalis corniculata* in experimental myocardial infarction.** Experimental Toxicology and Pathology. 2010.
- ACKIEL,M.cols. **Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: biochemical and histological findings.** International Journal of Cardiology.Vol.98 p. 389–394.2005.
- AGRAWAL, M. cols. **Herbal remedies for treatment of hypertension.** International journal of pharmaceutical sciences and research, v.1.p.1-21. 2010.
- ALTMAN,F.P.**Tetrazolium salts and formazans.** Progress in Histochemistry and Cytochemistry.Vol.9 p.1–51.1976.
- ALVES, H.M. **A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Cadernos temáticos de química nova na escola.** nº. 3. p.10-15.2001.
- AMIN JK, XIAO L, PIMENTAI DR, PAGANO PJ, SINGH K, SAWYER DB, COLUCCI WS **Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes.**Journal of Molecular and Cellular Cardiology vol.33:p.131-139.2001.
- ANAND, S.S. et al. **Differences in risk factors, atherosclerosis, and cardiovascular disease between ethnic groups in Canada: the study of health assessment and risk in ethnic groups.** Lancet.356:279-84.2000.
- ANSARI.N.M. **Ethanollic *Zingiber officinale* R. extract pretreatment alleviates isoproterenol induced oxidative myocardial necrosis in rats.** Indian journal of experimental biology.Vol44.p.892-897.2006.
- ARETZ, H.T. **The dallas criteria.** Human pathology, vol.18 p.619-624.1987.
- ARYA, D.S et al. **Effect of *Piper betle* on cardiac function, marker enzymes, and oxidative stress in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats.**Toxicol Mech Methods.p.564-571. 2010.

BARCELOS, F.F.; OLIVEIRA, M.L.; GIOVANINNI, N.P.B. **Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. em ratos.** N° 1. Rev. Bras. Pl. Med. Vol.12. p.48-56. 2010.

BARUZZI, A.C.A. **Infarto agudo do miocárdio exige rapidez no tratamento.** Prática hospitalar. Ano V, nº 28. 2003.

BATLOUNI, M. **Farmacologia e terapêutica cardiovascular.** 2ª ed. São Paulo. Atheneu. 2004.

BENINI, E.B. cols. **Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico.** Revista destaques acadêmicos, ano 2, n. 3- ccbs/univates.2010.

BERGAMASCHI, C.T.; BIANCARDI, V.C.; LOPES, O.U.; CAMPOS, R.R. **Effects of angiotensin blockade in the rostral ventrolateral medulla on maintenance of hypertension induced by chronic L-NAME treatment.** Brain Res. Vol.927.p.195-199.2002.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. **Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats.** J Steroid Biochem Mol Biol. Vol.93.p.43-48.2005.

BEZERRA, M.A.C. et al. **Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum.** Phytotherapy research.p.549-551.2000.

BINDOLI A, RIGOBELLO MP, DEEBLE DJ **Biochemical and toxicological** Biology and Medicine vol.13:p.391-405.1992.

BLOOM FE **Neurotransmission and the central nervous system.** In:

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

BOLIS, L.; GOVON, S.; DEKKE, M. **Handbook of the autonomic nervous system in the health and disease.** Informa health care.2002.

BORGES, M.K. cols. **Cardiac morphometry for the diagnosis of cardiopathies in dogs.** Arq.ciênc.vet. zool. UNIPAR;vol.4.p.181-188. 2001.

BRADAMENTE,S. cols. **Cardiovascular Protective Effects of Resveratrol.** Cardiovascular Drug Reviews Vol.22, p. 169–188. 2004.

BRAGAGNOLLO, E.A.cols. **Papel relativo da remodelação geométrica do ventrículo esquerdo, morfológica e funcional do miocárdio na transição da hipertrofia compensada para a falência cardíaca em ratos com estenose aórtica supravalvar.** Arq.Bras.Cardiol.vol.88. 2007.

BRUTSAERT, D.L.& SONNENBLICK, E.H. **Cardiac muscle mechanisms in the evaluation os myocardial contractily and pumps functions: Problems, conceptions and directions.** Prog. Cardiovasc.Disc. vol.16 p.337.1973.

CAMPBELL,C.L.;SMYTH,S;MONTALESCOT,G;STEINHUBL,S.R. **Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review.**JAMA.vol.278.p.2018-2024.2007.

CANTO,J.G;SHLIPAR,M.G;ROGERS,W.J;FREDERICK,P.D;LAMBREW,C.T.**Prevalence, clinical characteristics and mortality among patients with myocardial infarction presenting without chest pain.**JAMA.Vol.283.p.3223-3229.2000.

CARLSON, S.H. cols. **Neurohumoral regulation of the sympathetic nervous system: new insights into central mechanisms of action.** Current hypertension reports. Vol.10. p.233-240.2008.

CASTELLANO, O.**Introdução à Fitoterapia. Serviço de Arte Gráfica da Coordenadoria de Atividades Culturais .EDUSP.USP-SP.1981.**

**Catecholamine-induced cardiomyopathy.** In: Acosta, D (ed.) Cardiovascular Toxicity. Raven Press, New York p 269-318.2001.

CATELLI, M;FELDMAN,J.**Protective effects of centrally acting sympathomodulatory drugs on myocardial ischaemia induced by sympathetic overactivity in rabbits.**Brazilian journal of medical and biological research.Vol.36.p.85-95.2003.

CAUFIELD,M.P;BIRDSAEL,N.J.M. **XVII classification of muscarinic receptors pharmacological reviews.**International union pharmacology.Vol.80.p.279-290.1998.

CHEN,D.R. cols.**Antioxidant Effects of Resveratrol and its Analogues against the Free-Radical-Induced Peroxidation of Linoleic Acid in Micelles.**Chemistry - A European Journal Vol. 8, p.4191–4198. 2002.

CHIDAMBARA, M cols.**Antioxidant Activities of Grape (Vitis vinifera) Pomace Extracts.**J. Agric. Food Chem. Vol.50 p 5909–5914.2002.

CHOU, Y. **The functional assessment of *Alpinia pricei* on metabolic syndrome induced by sucrose-containing drinking water in mice.**Phytoteraphy research.V.23. p. 558-563. 2008.

COMMUNAL,C;SINGH,K.**Norepinephrine stimulate apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation  $\beta$ -adrenergic pathway.**Circulation.vol.98.p.1329-1334.1998.

CRUZ, I.B.M. DA et al. **Prevalência de obesidade em idosos longevos e sua associação com fatores de risco e morbidades cardiovasculares.** Rev Assoc Med Bras. V.50(2) p.172-177.2005.

SILVA, C.P. DA. **Papel do 17 $\beta$ -estradiol no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol em ratas.** Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.UFRRJ. 2009.

DAMPNEY,R.A;HORIUCHI,J;TAGAWA,T;FONTES,M.A;POTTS,P.D;POLSON,J.W. **Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone.** Acta Physiol Scand. Vol.177 p.209-218.2003.

ARAÚJO, F.Y.R DE. et al. **Central nervous system effects of the essencial oil of the leaves of *Alpinia zerumbet* in mice.**Journal of Pharmacy and Pharmacology.V.61.p.1521-1527.2009.

ARAÚJO, P.F DE. et al. **Antinociceptive effects of the essencial oil of *Alpinia zerumbet* on mice.**Phytomedicine.V.12. p. 482-486. 2005.

WINTER,R.J DE ;LIJMER,J.G;KOSTER,R.W;HOEK,F.J.**Diagnostic accuracy of myoglobin concentration for the early diagnostic of acute myocardial infarction.** Ann Emerg. Med. Vol.35.p.113-120.2000.

DHALLA NS, SASAKI H, MOCHIZUKI S, DHALLA KS, LIU X, ELIMBAN V  
DI STASI, L. C. (Org). **Plantas Mediciniais: arte e ciência.** Unesp, São Paulo, p. 15-68. 1996.

DIBONA, G.F.**The sympathetic nervous system and hypertension:Recent development.**Hypertensionvol.43.p.147-150.2004.

DICKSTEIN, K; KJEKSHUS,J.**Effects of losantan and captopril on mortality and morbidity in hight-risk patients after acute myocardial infarction: The OPTIMAAL randomized trial. Opitimal trial in myocardial infarction with angiotensin II antagonist.**Vol.360.p.752-760.2002.

DOBACZEWSKI,M. cols. **Smad3 Signaling Critically Regulates Fibroblast Phenotype and Function in Healing Myocardial Infarction.**Circulation Research.vol.107p.418-428.2010.

DOHADWALLA, A. N.**Naturalproduct pharmacology: strategies in search of leads for new drug designs.***TiPS* 6: 49-53. 1985.

DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicado às ciências médicas.** 6ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2006.

DUNFORD, A, & ELDIN, S. **Fitoterapia na atenção primária à saúde.** Ed. Manole. São Paulo. 2001.

EBENSPERGER,R cols. **Selective Increase in Cardiac IGF-1 in a Rat Model of Ventricular Hypertrophy.** Biochemical and Biophysical Research CommunicationsVol. 243.p 20–24.1998.

EISENHOFER,G;FRIEBERG,P.**Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure**.Circulation.vol.93.p.1667-1676.1996.

ELIZABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O.(Org.) et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ªed. rev.ampl.Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC,cap. 6. P.107-123. 2004.

ELPO,E.R.S.**Zingiber officinale ROSCOE: ASPECTOS BOTÂNICOS E ECOLÓGICOS**.Visão Acadêmica.vol.. 5. p. 27-32.2004.

ENGELHARD,S;HEIN,L;KELLER,U;KLAMBT,K;LOHSE,M.J. **Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice**. Circ Res. Vol 90.p.814-819.2002.

FALKENBERG,M.B. **Introdução à análise fitoquímica**.In: SIMÕES, C.M.O.(Org.) et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ªed. rev.ampl.Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC,cap. 6. P.107-123. 2004.

FELDER,R.B;FRANCIS,J;ZHANG,Z.H;WEI,S.G;WEISS,R.M;JOHNSON,A.K.**Heart failure and the brain: new perspectives**.Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.vol.284.p.259-276.2003.

FISHBEIN, M.C. MAC LEAN, D. MAROKO, D.R. **The histopathologic evolution of myocardial infarction**.Ches, vol. 73 p.843-849. 1978.

FISHER,J.P;FADEL,P.J. **Therapeutics strategies for targeting excessive central sympathetic activation in human hypertension**. Experiental physiology.Vol.95.p.572-580.2010.

FOZZARD, H.A.**Heart excitation-contraction coupling**. Ann. Rev. Physiol., vol. 39, p.201.1977.

FRAGA, C.A.M. **O uso de produtos naturais como matéria-prima vegetal para a síntese e planejamento de fármacos**.In: SIMÕES, C.M.O.Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ªed. rev.ampl.Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, Cap. 8 p.148-210. 2004.

FRANCIS, G.S. **Neurohumoral activation and progression of heart failure.** J Cardiovasc Pharmacol. vol.32.p.16-21.1998.

FRANCIS, J.; WEI, S. G.; WEISS, R. M.; FELDER, R. B. **Brain angiotensin-converting enzyme activity and autonomic regulation in the heart failure.** Am J Physiol heart circ Physiol. vol.287.p.138-146.2004.

FRANGOGIANNIS, N. G.; SMITH, C. W.; ENTMAN, M. L. **The inflammatory response in myocardial infarction.** Cardiovasc Res. Vol.53.p.31-57.2002.

FYHRQUIST, F. SAIJONMAA, O. **Renin-angiotensin system revisited.** Journal of internal medicine. Vol 264.p.224-236.2008.

GENG, B. cols. **Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol.** Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol 318 p 756–763.2004

GINTER, E. cols. **Garlic (Allium sativum L.) and cardiovascular diseases.** Bratislavske Lekarske Listy. vol.111p.452-456.2010.

GODOY, M. F. cols. **A troponina como um marcador de injúria celular miocárdica.** Arq Bras Cardiol. Vol.71. nº 4.p.629-633.1998.

GODOY, M. F. et al. **Mortalidade por doenças cardiovasculares e níveis socioeconômicos na população de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil.** Arq Bras Cardiol. 88(2).p.200-206.2007.

GOLDMAN, M. D. **Autosomal Recessive Catecholamine- or Exercise-Induced Polymorphic Ventricular Tachycardia.** Circulation. Vol.103p.2822-2827. 2001

GOLDSTEIN DS STRESS, **Catecholamines and Cardiovascular Disease.** Oxford University Press, Oxford, 1995.

GOYAL, S. N. **Preventive effect of crocin of Crocus sativus on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats.** Phytomedicine Vol 17, p. 227–232.2010.

GRASSI, G. **Sympathetic and baroreflex cardiovascular control in hypertension-related left ventricular disfunctions.** Hypertension. Vol.53.p.205-209.2009.

GRASSI,G.**Counteracting the sympathetic nervous system in the essential hypertension.**Curr Opin Nephrol. Hypertens.Vol.13 p.513-519.2004.

GRIMM D, EISNER D, SCHUNKERT H, PFEIFER M, GRIESE D, BRUCKSCHLEGEL G, MUDERSF, RIEGGER GA, KRAMER EP **Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system.** Cardiovascular Research vol.37p.:91-100.1998.

GUTIERRES,P.S; AIELLO, V.D; HIGUCHI, M.L. **Coração** In: BOGLIOLO, L. Patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2006.

GUYTON, A.C. & HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.**11ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2006.

HAMILTON,K.L. **Antioxidants and cardioprotection.** Med Sci Sports.Vol.39.p.1544-1553.2007.

HARVEY A. **Strategies for the discovering drugs from previously unex-plored 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.

HEARSE, D.J. **Experimental models for the study of cardiovascular functions and disease.** Pharmacol Res. Vol.41.p:597-603. 2000.

HOFFMAN, B.B. **Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos.** In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 11ª ed. Mc Grau Hill. Rio de Janeiro. 2006.

HOYER,D;MAESTRIB,R.**Autonomic response to cardiac disfunctions in chronic heart failure: a risk predictor based an autonomic information flow.**Pacing and clinical electrophysiology.vol.31.p.214-220.2008.

HUBER,P.C. cols.**Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes.** Quím.Nova.vol.31.p. 1170-1179.2008.

IANZER, D.cols. **Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography.**Peptides Vol 25,p.1085–1092.2004.

ISHISE,H. ANASOI,H.**Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular disfunctions in conscious dogs with heart failure.**Journal of applied physiology.vol.84.p.1234-1241.1998.

ISOYAMA, S.**Collagen deposition and the reversal of coronary reserve in cardiac hypertrophy.**Hypertension.vol20p.491-500.1992.

ITHAYARASI, A.P.**Effect of  $\alpha$ -tocopherol on lipid peroxidation in isoproterenol induced myocardial infarction in rats.** Indian J Physiol Pharmacol.vol.41 p.:369-376.1997.

JAFFE,A.S;RAVKILDE,J;ROBERTS,S;NASLUND,U;APPLE,F.S;GALVANI,M.**It's time for a change a troponin I standard.**nº11. Circulation.vol.102 p.1216-1220. 2000.

JAYACHANDRAN, K.S cols. **Flavonoid Rich Fraction of Dioscorea bulbifera Linn. (Yam) Enhances Mitochondrial Enzymes and Antioxidant Status and Thereby Protects Heart from Isoproterenol Induced Myocardial Infarction.** Curr Pharm Biotechnol. p. 887-894(8). 2010.

JOHANSON, E.A. & LIEBERMAN, M. **Heart: Excitation and contraction.** Ann. Rev. Physiol. Vol. 33. P. 479. 1971.

JOLES,J.A;KOOMANS,H.A. **Causes and consequences of increases sympathetic activity in renal disease.** Hypertension.vol.43.p.699-706.2004.

JORGE, P.A.R, CURTI,H.V.METZE,K. **A microcirculação coronária na reperfusão miocárdica. O fenômeno da reperfusão.**Arq.Bras.Card.vol 56 p. 471-476, 1991.

JOUKAR, S et al .**The effect of saffron consumption on biochemical and histopathological heart indices of rats with myocardial infarction.**Cardiovascular Toxicology. p. 66-71. 2010.

JOUKAR,S.cols.**Protective effects of saffron (*Crocus sativus*) against lethal ventricular arrhythmias induced by heart reperfusion in rat: A potential anti-arrhythmic agent.**Pharmaceutial biology. Vol.51.2012.

JUNIOR,W;FRANCHINI,K. **Influência de fatores ambientais e genéticos na hipertrofia e remodelamentos cardíacos na hipertensão arterial.** Rev Bras Hipert. Vol.8 p.414-424.2001.

K, K. et al. **Anxiolytic effect and tissue distribution of inhaled *Alpinia zerumbet* essencial oil in mice.**Nat Prod Commun. p. 143-146. 2010.

KAISER, S.E. **Aspectos epidemiologicos nas doenças coronariana e cerebrovascular.** Revista da SOCERJ. V.17 nº 1.2004.

KAKIMUMA,Y;AKIYAMA,T.**Cardiomyocytes produces acetylcholine in response to muscarinic receptor stimulation:a possible mechanism for amplification cardioprotective effects of cardiac vagal nerve.**Circulation.vol.118.p.538-545.2008.

KALRA,D.M.D. cols. **Angiotensin II Induces Tumor Necrosis Factor Biosynthesis in the Adult Mammalian Heart Through a Protein Kinase C–Dependent Pathway.**Circulation vol.105 p.2198-2205.2002.

KARTHICK, M cols.**Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats.**Journal of Pharmacy and Pharmacology.Vol. 58p. 701–707.2006.

KARTHIKEYAN, K.**Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats.**International Journal of Cardiology vol.115 p. 326–333.2007.

KATARE,R.G;ANDO,M.**Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transitions pore independent of the bradycardiac effect.**The journal of thoracic and cardiovasc.Surgery.vol.137.p.223-231.2009.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.**9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2005.

KAWADA,T;YAMAZAKI,T.Vagal **stimulation suppresses ischaemia induced myocardial interstitial norepinephrine release**.Life science.vol.78.p.882-887.2006.

KIM,M.S. **Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase**.Nature medicine. vol.10.p.727-733.2004.

KIRSTEIN,S.L;INSEL,P.A. **Autonomic nervous system pharmacogenomics: a progress report**.Pharmacol rev. vol.56.p.31-52.2004.

KISS, I cols. **Enhancement of organ regeneration in animal models by a stem cell-stimulating plant mixture**.Journal Med Food.p.599-604. 2010.

KOCH,W.K. cols. **Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor**.Science 2 Vol. 268p.1350-1353.1995.

KUMARAN, K.S. cols. **Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage**.Cell Stress Chaperones.p.791-806.2010.

KUMARAN, K.S. cols.**Preventive effect of caffeic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats**.Journal Biochemistry Molecular Toxicology. p. 115-122. 2010.

KURACHI, Y.**G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channels**. American Journal of physiology. Vol.269.p.821-830.1995.

LAHIOU, S. **Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats**.Fundamental & Clinical Pharmacology.V.17.p. 323- 330. 2003.

LAHIOU, S. **Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats**.Fundamental & Clinical Pharmacology.V.17.p. 323- 330. 2003.

LAHIOU, S. **Cardiovascular effects of the essential oil *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in rats: role of the Autonomic Nervous System**.Planta med. V. 68. p.1097-1102. 2002.

LAPA, A.J. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. .In: SIMÕES, C.M.O.(Org.) et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 6ªed. rev.ampl.Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC,cap. 6. P.107-123. 2004.

LEAL-CARDOSO, J.H. et al. **Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve**. *Brazilian Journal of medical and biological research*. V. 34. P. 1337-1340. 2001.

LEIFERT,W.R.cols. **Cardioprotective actions of grape polyphenols**. *Nutrition Research* Vol.28, p. 729–737.2008.

LEVER, A.M, LEVER, D.J.**The role of nitric oxide and cells adhesion molecules on the microcirculation is ischaemia-reperfusion**.*Cardiovasc.Res*. Vol 32 p.743-754, 1996.

LI,Y. cols. **Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells**.*Cardiovasc Res* vol 45 p. 1035-1045.2000.

LI,Y.F;PATEL,K.P.**Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in the hearts failure: the altered inhibitory mechanisms**.*Acta Physiol Scand*.vol.7.p.17-26.2003.

LI,Y.**Guanilil Cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A**. Receptor-mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart.*Circulation*.vol.106 p.1722-1728.2002.

LIN, L. ***Alpinia zerumbet* potentially elevates High-Density Lipoprotein Cholesterol level in hamsters**.*J. Agric. Food Chem*. V.58.p.4435-4443. 2008.

LOBO-FILHO,H.G. cols. **Modelo experimental de infarto do miocárdioinduzido por isoproterenol em ratos**.*Rev Bras Cir Cardiovasc* vol.26p.469-476.2011.

LOHSE,M.J;ENGELHARD,S;ESCHENHAGEN,T. **Whats is the role of beta-adrenergic signaling in the heart failure?**. *Circ. Res*. Vol.93.p.896-906.2003.

LUSTGARTEN, D.L;KEANE,D.**Cryothermal ablation: Mechanism of tissue injury and current experience in the treatment of tachyarrhythmias**.*Progress in Cardiovascular Diseases*.Vol. 41, p. 481–498.1999

MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. **Ocorrência do Uso de Plantas Medicinais por Moradores de um Bairro do Município de Marília-SP.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas, v. 28, n. 1, p. 123-128. 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares.** Química Nova, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.

MAGOS, G.A et al. **Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from Guazuma umifolia bark in normotensive and hypertensive rats.** Journal of ethnopharmacology. v.177. p.58-68.2008.

MANFREDI, B. cols. **Procyanidins from Vitis vinifera seeds display cardioprotection in an experimental model of ischemia-reperfusion damage.** Drugs Under Experimental and Clinical Research vol.29 p.207-216.2003.

MANFRINE, O; MORGANI, M. **Changes in autonomic nervous system activity: spontaneous versus balloon induced myocardial ischaemia.** European Journal. vol.25. p.1502-1508.2004.

MANN, D.L; KENTR, L. **Adrenergic effects on the biology of the adult mammalia cardiocyte.** Circulation. vol.85. p.790-804.1992.

MASTAN, S.K. **Cardioprotective effect of methanolic extract of Syzygium cumini seeds on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats** Der Pharmacia Lettre1 vol.1p.143-149.2009.

MATOS-SOUZA, J.R; FRANCHINI, K.G; JUNIOR, W.N. **Hipertrofia ventricular esquerda: o caminho para insuficiência cardíaca.** Rev Bras Hipert. Vol.15 p.71-74.2008.

Mc KEIGUE, P.M. et al. **Association of early-onset coronary heart disease in south Asian men with glucose intolerance and hyperinsulinemia.** Circulation. 87: 152-61. 1993.

MEHDIZADEH, R. cols. **Cardioprotective Effect of Saffron Extract and Safranal in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Wistar Rats.** Iran J Basic Med Scivol.16 p.56-63.2013.

MEHTA, P.K. COLS. **Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system.**American Journal of Physiology - Cell PhysiologyPublishedVol. 292no. p.82-9, 2007.

MENDES, M. **Controle da função cardíaca.**In: DOUGLAS, C.R. Tratado de fisiologia aplicado às ciências médicas. 6ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan cap.42 p.548-579. 2006.

MENDONÇA, V.L.M. et al. **Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*.**MemInst Oswaldo Cruz. V.86, p. 93-97. 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos,** Fonseca, C. D., 1. ed. 2001.

MORAIS, S.S.P.A.C.**Diagnóstico precoce de enfarte agudo do miocárdio utilizando técnicas imunohistoquímicas, sua aplicação forense.** Dissertação de mestrado :faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.2009.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica.**2ª ed.2011.

MOURA, R.S cols.**Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract.** Journal of Pharmacy and Pharmacology vol. 54, p.1515–1520.2002.

MOURA, R.S. et al. **Antihypertensive and endothelium dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant.**J cardiovasc pharmacol . v. 46, nº 3.p.323-330. 2005.

MOURA,R.S. cols. **Mechanism of the Endothelium-Dependent Vasodilation and the Antihypertensive Effect of Brazilian Red wine.** Journal of Cardiovascular Pharmacology:Vol. 44.p 302-309.2004.

MPALATINOS, M.A. et al. **Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Apinia zerumbet*.**Phytotherapy research.V.12.p.442-444. 1998.

NAKAYAMA,H.**The IP3 receptor regulates cardiac hypertrophic in response to select stimuli.**Circulation research.Vol.107.p.659-66.2010.

National heart, Lung and blood statistics(NHLBI). **Morbidity and mortality:2009. Chart book on cardiovascular, lung and blood diseases.** Bethesda, MD: National Institute of Health.2009.

NAMES,V. **Vitis vinifera.** Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Vol 6.2013.

NASCIMENTO, N.R.F. et al. **Terpine-4-ol: mechanisms of relaxation on rabbit duodenum.**Journal of Pharmacy and Pharmacology.V.57. p.467-474.2010.

NATAJARAN,M;MORISON,S.F.**Sympathoexcitatory CVLM neurons mediate responses to caudal pressor area stimulation.**Am J Physiol Regu Integr Comp Physiol.vol.279.p.364-374.2000.

NAVARRO.E.cols. **Cardiovascular activity of a methanolic extract of Digitalis purpurea spp. Heywoodii.**Journal of Ethnopharmacology Vol.71,p. 437–442.2000.

NAYLER,W.G.**Basic Mechanisms Involved in the Protection of the Ischaemic Myocardium.**Drugs.Vol.42, p.21-27.1991.

NIETO, F.J. **Cardiovascular disease and risk factor epidemiology: a look back at the epidemic of the 20th century.**Am J Public Health. 89:282-94. 1999.

NIIJIMA, A; HORI,T;AOU,S.OOMURA,Y. **The effects of interleukin-1 on the activity of adrenal, splenic and renal sympatetic nerves in the rats.**J Auton Nerv Syst. Vol.36.p.183-192.1991.

NOGUEIRA,J.B.**Left ventricular hypertrophy in systemic hypertension.**Benefits of its reversal.Arquivos brasileiros de cardiologia. Vol.73 p.103-112.1999.

OCARANZA MP, DIAZ-ARAYA G, CHIONG M, MUNOZ D, RIVERAS JP, EBENSPERGER R,SABAT S, IRARRÁZVAL P, JALIL JE, LAVANDERO **SIsoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis.**Journal of CardiovascularPharmacology vol.40 p.246-254.2002.

OHJA, S.K.**Protective effect of hydroalcoholic extract of Andrographis paniculata on ischaemia-reperfusion induced myocardial injury in rats.** Indian J Med Res.vol.135:p.414-421.2012.

OJHA,SK;NANDAV,E.M;NARAN,G.R;ARYA,D.S.**Chronic administration of Tribulus terrestris Linn. Extract improves cardiac function and attenuates myocardial infarction in rats.**IntJPharmacol.Vol4 p.1-10.2008.

OKTAR, S. et al. **Effects of caffeic acid phenethyl ester on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats.**Anadolu Kardiyol Derg. p.298-302. 2010.

OLIBONI,R.S.**Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (Vitis labrusca var. Bordo) on Wistar rat tissues.** An. Acad. Bras. Ciênc.vol.83. 2011.

OLIVEIRA, R.G.Blackbook: clínica médica. 1ª ed. 2007 .

OLIVETTI G, CIGOLA E, MAESTRI R, LAGRASTA C, CORRADI D, QUAINI F **Recent advances in cardiac hypertrophy.**Cardiovascular Research vol.45p.68-75.2000.

ORALLO,F. cols.**The Possible Implication of trans-Resveratrol in the Cardioprotective Effects of Long-Term Moderate Wine Consumption.**Molecular Pharmacology. vol. 61 p 294-302.2002.

OWEN,P.L.**Antioxidants in Medicines and Spices as Cardioprotective Agents in Tibetan Highlanders.**Pharmaceutical biology. Vol. 40 p. 346-357.2002.

PADMAVATHY, V.N cols. **Effect of  $\alpha$ -tocopherol on isoproterenol induced myocardial infarction in rats electrocardiographic biochemical and histological evidences.**Indian J Physiol Pharmacol.vol.40 p. 297-302.1996.

PARK,S.cols.**Methanolic extract of onion (Allium cepa) attenuates ischemia/hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes via antioxidant effect.**European Journal of Nutrition Vol. 48, p 235-242.2009.

PATEL, D.K.**Cardioprotective effect of Coriandrum sativum L. on isoproterenol induced myocardial necrosis in rats.**Food and Chemical Toxicology vol.50 p.3120–3125.2012.

PAVLOV,V.A;WANG,H;CZUZA,C.J;FRIEDMAN,S.G;TRACEY,K.J.**The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation.** Mol Med. Vol.9.p.25-34.2003

PAVLOVIC,M.**Beta-blockers in cardioprotection after acute myocardial infarction.** The scientific facta universitatis.vol.7.p.11-17.2000.

PIEGAS, L cols. **Aspectos epidemiológicos do infarto agudo do miocárdio no Brasil.**Tópicos em epidemiologia p.93-96.2005.

PORTER,T.M;ECKBERG,D.L.**Autonomic pathophysiology in the heart failure patients: sympathetic-cholinergic interrelations.** The journal of clinical investigations.vol.85.p.1362-1371.1990.

PRABHU,S. cols.**Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats.** Journal of Ethnopharmacology.Vol. 107, p 126–133.2006.

PRINCE, P.S et al. **Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats.**European Journal Pharmacology.p.142-148. 2010.

PRINCE,P.S.M cols.**The cardioprotective effects of a combination of quercetin and  $\alpha$ -tocopherol on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats.**Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.Vol.25, p.28–40, 2011.

PRIOR, R.L; CAO,G. **Analysis of Botanicals and Dietary Supplements for Antioxidant Capacity: A Review.** Journal of AOAC International, Vol. 83, p. 950-956.2000.

PUNITHAVATHI, V.R et al. **Protective effects of rutin on mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiotoxic rats: an in vivo and in vitro study.**Cardiovascular Toxicology. p. 181-189. 2010.

RAJADURAI, M., Stanely Mainzen Prince, P. **Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences.** Toxicology 228, 259–268. 2006.

RAMCHANDRA,R;BARRET,C.J;MALPAS,S.C. **Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure.**Clin Exp.Pharmacol Physiol.vol.32.p.440-446.2005.

RAMKISSOON, R.A..**Macroscopic identification of early myocardial infarction by dehydrogenase alterations.**J. Clin.Pathol. Vol.19 p.479–481.1996.

RAPOSO,H.F.cols. **Estudo dos mecanismos envolvidos na redução de adiposidade de camundongos que super-expressam a proteína de transferência de colesteril éster (CETP).**Dissertação: Unicamp, Brasil,2013.

REMIÃO F, CARMO H, CARVALHO F, BASTOS ML **Cardiotoxicity studies properties of the oxidation products of catecholamines. Free Radical using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**vol. 37p.1-4.2001

REMIÃO F, CARVALHO M, CARMO H, CARVALHO F, BASTOS ML **Cu<sup>2+</sup>-Induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes.**Chemical Research in Toxicology vol.15;p.861-869.2002

REMIÃO,F.M.G.**Cardiotoxicidade do isoproterenol e dos produtos da sua oxidação: estudos mecanísticos em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato adulto.** Tese de doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto,Portugal.2002.

REN,G.cols.**Protective effects of steroids from Allium chinense against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in rat cardiac H9C2 cells.**Phytotherapy Research.Vol.24, p. 404–409, 2010.

RENISUS, **Lista de Plantas medicinais de interesse ao sistema único de saúde.**2009.

RIBEIRO,H.B.**Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supraavalvar.** Arquivos brasileiros de cardiologia.vol.81.p.552-568.2003.

RIETZ, B. cols. **Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion.** Molecular and Cellular Biochemistry Vol. 119, Issue p 143-150.1993.

RITCH, M.D cols. **Treatment of Acute Myocardial Infarction.**The American Journal of Geriatric Cardiology.Vol.10, p. 328–336, 2001.

ROMANO, M; MACIEL, B. **Alterações cardíacas decorrentes da hipertensão arterial.**Rev Soc.Vol.2 p.169-174.2008.

RONA, G. **Catecholamine cardiotoxicity.** J. Mol. Cell. Cardiol. 17, 291–300. 1985.

S, M. et al. **Effects of the essential oil from leaves of *Alpinia zerumbet* on behavioral alterations in mice.**Nat Prod Commun.p.129-132. 2009.

S, N. **Inhibitory effects of *Alpinia speciosa* K. SCHUM on the porphyrin photooxidative reaction.** J. Dermatol. p.312-317.2000.

SANCHES VCD, HERNÁNDEZ-MUNOZ R, LÓPEZ-BARRERA F, YANEZ L, VIDRIO S, SUÁREZ J, COTA-GARZA MD, ARANDA-FRAUSTRO A, CRUZ D **Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study.**Canadian Journal of Physiology and Pharmacology vol.75p.1300-1311.1997.

SANDMANN, S. et al. **Calcium Channel Blockade Limits Cardiac Remodeling and Improves Cardiac Function in Myocardial Infarction–Induced Heart Failure in Rats.** Journal of Cardiovascular Pharmacology Vol 37 p.64–77. 2001.

SANTOS, B.A. **Cardi depressive effects elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca<sup>2+</sup> current blockade.**Phytomedicine.Vol18.p.539-543.2011.

SARAVANAN, G. cols. **Effect of garlic (*Allium sativum*) on lipid peroxidation in experimental myocardial infarction in rats.**Journal of Ethnopharmacology Vol. 94, p 155–158.2004.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre angina instável e infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST.** Arq. Bras. Cardiol. Vol 89 p 89-131, São Paulo. 2007.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). **III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio.** Arq. Bras. de Cardiol. - Volume 83, Suplemento IV, São Paulo. 2004.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). **IV Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST.** Arq. Bras. de Cardiol. - Volume 93, São Paulo. 2009.

SCHALAICH, M.P.; KAYE, D.M. **Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy.** Circulation. vol.108.p.560-565.2003.

SCHDEVA, J. **Crocus sativus L. (saffron) attenuates isoproterenol-induced myocardial injury via preserving cardiac functions and strengthening antioxidant defense system.** Experimental and Toxicologic Pathology. Vol. 64, p.557-564.2012.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos.** In: SIMÕES, C.M.O.(Org.) et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ªed. rev.ampl. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, cap. 15. P.371-400. 2004.

SEMENZA, G.L. cols. **Hypoxia, HIF-1, and the Pathophysiology of Common Human Diseases.** Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 475, p123-130.2002.

SENIOR, J.M. **The usefulness of endomyocardial biopsy in heart failure syndrome.** Acta Med Colomb vol.33. 2008.

SHAIK, A.H. **Cardioprotective effect of HPLC standardized ethanolic extract of Terminalia pallida fruits against isoproterenol-induced myocardial infarction in albino rats.** Journal of Ethnopharmacology vol.141 p.33- 40.2012

SHEIK,A.H.cols. **Cardioprotective effect of HPLC standardized ethanolic extract of Terminalia pallida fruits against isoproterenol-induced myocardial infarction in albino rats.**Journal of Ethnopharmacology Vol.141, p. 33–40.2012.

SHUKLA,S.cols.**Terminalia arjuna augments cardioprotection via antioxidant and antiapoptotic cascade in isoproterenol induced cardiotoxicity in rats.**Asian Pacific Journal.2012.

SHULTZ, Jo.cols. **TGF- $\beta$ 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II.**J Clin Invest.vol.109 p.787–796.2002.

SI, K cols **Caulophine protects cardiomyocytes from oxidative and ischemic injury.**Jounal Pharmacology Science.p.368-377. 2010.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ªed. Porto Alegre/Florianopolis.editora UFSC. 2004.

SINGAL PK, KAPUR N, DHILLON KS, BEAMISH RE, DHALLA NS.**Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy.**Can J Physiol Pharm 1983;60:1390–7.

STANELY,P. **Cardioprotective effects of " maruthan" a polyherbal formulation on isoproterenol induced myocardial infarction in wistar rats.**Fitoterapia. Vol. 79 p.433-438.2008.

STEFANINI,E.; MATSUSHITA,A.M.; GIL.M.A. **Síndromes coronarianas agudas: Angina instável e o infarto agudo do miocárdio.**In: STEFANINI, E. cols. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar de cardiologia.UNIFESP/EPM. Manle.Barueri-SP. 2004.

SUN, W;PANNETON,W.M.**Defining projections from the caudal pressor area of the caudal ventrolateral medulla.** J. comp neurol.vol.482.p.273-293.2005.

TAGGART,P;SUTTON,P.**Effect of adrenergic stimulation on action potential duration restitution in humans.**Circulation. vol.107.p.285-289.2003.

TAIMOR G, SCHLUTER K-D, PIPER HM. **Hypertrophy-associated gene induction after beta-adrenergic stimulation in adult cardiomyocytes.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology vol.33p.503-511.2001.

TANG,XI cols. **The Cardioprotective Effect of Protocatechuic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury.** Journal of Pharmacological Sciences. Vol.125 p. 176-183.2014.

TAWATA, S. et al. **Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm.** Food chem.p.1648-1653. 2007.

TAWATA, S. et al. **Essencial oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. and their antioxidant activity.** Food chem. p.486-494. 2006.

TENDERA, M. **The epidemiology of the heart failure.** n<sup>o</sup> 5. J Renin Angiotensin Aldosterone System. Vol.1.p 2-6. 2004.

TENG, C.M. et al. **Antiplatelet action of dehydrokawain derivatives isolated from *Alpinia speciosa* rhizome.** Chin J Physiol.p.41-48.1990.

THOMES P. cols. **Cardioprotective activity of Cladosiphon okamuranus fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats.** Phytomedicine.p.52-57. 2010.

TIWARI, R et al. **Cardioprotective Potential of Myricetin in Isoproterenol-induced Myocardial Infarction in Wistar Rats.** Phytother.Res. Vol.23, p.1361–1366.2009.

TIWARI,P;PATEL,R.K. **Cardioprotective activity of ashwagandharishta on isoproterenol induced on myocardial infarction.** Res. Journal of pharmacology.vol.4.p.294-298.2012.

VAAGE,J ; VALEN, G. **Pathophysiology and mediators of ischaemia-reperfusion injury with special reference to cardiac surgery.** Sci. J. Cardiovasc. Surg. Vol.41.p. 1-18.1993.

VAJRESWARI,A. cols.**Effect of dietary fats on some membrane-bound enzyme activities, membrane lipid composition and fatty acid profiles of rat heart sarcolemma.**Lipids.Vol.27, p.339-343.1992.

VICTÓRIO, C.P. et al. **Chemical composition of the fraction of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M. Sm. and antimicrobial activity.**Brazilian journal of pharmacognosy.V.19. p. 697-701. 2009.

VICTÓRIO, C.P. et al. **Detection of flavanoids in *Alpinia purpurata*(Vieill.) K. Schum. Leaves using high-performance liquid chromatography.** Rev. Bras. Pl. Med. V.11, nº 2. p. 147-153. 2009.

WEIR,C.J.**Serum Urate as an Independent Predictor of Poor Outcome and Future Vascular Events After Acute Stroke.**Stroke.Vol 34p.1951-1956.2003.

WONG, L.F. et al. **Antioxidant and antimicrobial activities of some *Alpinia* species.**Journal of food biochemistry. V. 33. p. 835-851. 2009.

XIAO,R.P;ZHU,W;ZHENG,M;CHAKIR,K;BOND,L;LAKATTA,E.G;CHENG,H.**Subtype-specific beta-acrenoceptor signalling pathways in the heart and their potential clinical implications.**Trends Pharmacol sci.vol.25.p.358-365.2004.

YAO,Z;GROSS,G.J. **Role of nitric oxide, muscarinic receptors and the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mediating the effects os acetylcholine to mimic preconditioning in dogs.** Circulation res.vol.73.p.1193-1201.1993.

ZIPES,D.P; WELLENS,H.J.J.**Sudden cardiac death.**Circulation.vol.98p.2334-2351.1998.

ZORNOFF,L.A.M cols.**infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo.**Arq Bras Cardiol.vol.93 p. 434-440. 2009.

ZUCKER, I.H cols. **Sympatho-excitation by central ang II: The roles for AT1 receptor up regulation and NAD (P) H oxidase in the RVLM.**Am physiological soc. P. 2271-2279.2005.