



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes  
Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e  
Experimental**

**Efeito vasodilatador e anti-hipertensivo do extrato  
hidro-alcoólico de caroço de *Euterpe oleracea*  
Mart. (Açaí)**

**Ana Paula Machado da Rocha**

**Rio de Janeiro  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes  
Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e  
Experimental**

**Efeito vasodilatador e anti-hipertensivo do extrato  
hidro-alcoólico de caroço de *Euterpe oleracea*  
Mart. (Açaí)**

**Ana Paula Machado da Rocha**

Tese apresentada ao curso de  
Pós-graduação em Fisiopatologia  
Clínica e Experimental da  
Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro para a obtenção do grau  
de Doutora em Ciências.

**Rio de Janeiro  
2007**

## RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), uma fruta originária da região Amazônica, é largamente consumida no Brasil e rica em polifenóis. Este estudo tem por objetivo determinar o potencial vasodilatador de diferentes extratos hidro-alcoólico de açaí em leito vascular mesentérico de rato pré-contráidos com norepinefrina ou fenilefrina e, a partir do extrato com maior potencial vasodilatador, avaliar os mecanismos moleculares envolvidos, a ação antioxidante e a atividade anti-hipertensiva em quatro modelos experimentais de hipertensão em ratos: ratos espontaneamente hipertensos (SHRs adultos e jovens com idade de 21 dias), hipertensão renovascular (dois rins- 1 clipe; 2K-1C), hipertensão induzida pelo DOCA-sal e pelo L-NAME. A pressão arterial foi avaliada na cauda de rato através de um método não invasivo (pletismografia de cauda). O extrato hidro-alcoólico de caroço de açaí (ASE) apresentou maior potencial vasodilatador. A resposta vasodilatadora do ASE é dependente de endotélio e significativamente reduzida pelo L-NAME, ODQ, KCl (45 mM) e pelos bloqueadores de canais  $K_{Ca^{2+}}$  (ChTx e apamina). Ao associarmos KCl (45mM) e L-NAME a ação vasodilatadora do ASE foi abolida. O ASE reduziu a produção de TBARS em soro de camundongos expostos a fumaça de cigarro, demonstrando que este extrato apresenta atividade antioxidante. Um efeito anti-hipertensivo significativo foi observado nos quatro modelos experimentais de hipertensão 2K-1C, DOCA-sal, L-NAME e SHR. A administração de ASE após o período de amamentação preveniu o desenvolvimento da hipertensão em SHRs. Em SHRs o ASE reduziu a expressão da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), mas em ratos normotensos Wistar essa expressão foi aumentada. O aumento da síntese do NO (óxido nítrico) foi observado em cultura de células endoteliais de veia umbilical. Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que o ASE apresenta uma resposta vasodilatadora dependente de endotélio significativo cujo mecanismo de ação depende da ativação da via NO/cGMP e da produção de EDHF. A ação anti-hipertensiva do ASE é provavelmente mediada pela sua atividade vasodilatadora e pela sua ação antioxidante. Nossos dados pré-clínicos sugerem um potencial terapêutico do ASE em pacientes hipertensos.

## ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea*) a fruit from the Amazon region, largely consumed in Brazil is rich in polyphenols. This study was designed to determine a vasodilator effect of different hydro-alcoholic extracts of açaí in the rat mesenteric vascular bed precontracted with norepinephrine or phenylephrine and, if so, to elucidate the underlying mechanism from highest vasodilator potential extract, anti-oxidant and antihypertensive effects in four established models of experimental hypertension in the rat: spontaneously hypertensive rats (adult and young 21 days old SHR), Goldblatt (2 kidney, 1-clip; 2K-1C), L-NAME and in DOCA-salt-induced hypertension. Blood pressure was measured non-invasively using the tail-cuff method. The Açaí Stone Extract (ASE) demonstrated the highest vasodilator response. ASE induced an endothelium-dependent vasodilatation that was significantly reduced by L-NAME, ODQ, KCl (45mM) and  $K_{Ca+2}$  channel blockers (ChTx plus apamin). The association of KCl (45mM) plus L-NAME abolished the vasodilator effect of ASE. ASE significantly reduced the production of TBARS in serum of mice exposed to cigarette smoke, demonstrating that this extract has anti-oxidant effect. A significant antihypertensive effect of ASE was observed in 2K-1C, DOCA-Salt, L-NAME and SHRs. Administration of ASE just after weaning prevented the development of hypertension in SHR. The expression of eNOS (endothelial nitric oxide synthase) was reduced in SHR by ASE treatment, but it was elevated in Wistar rats. The production of NO was increased in cultured human umbilical vein endothelial cells. In conclusion, ASE induced an endothelium-dependent vasodilator response, which involves activation of NO/cGMP pathway and EDHF production. The antihypertensive effect of ASE is probably mediated via its vasodilator and anti-oxidant actions, and the current preclinical data suggest a potential therapeutic use of ASE in hypertensive patients.

# *Introdução*

---

## **Introdução**

---

O endotélio é uma parede celular que participa de toda a homeostase vascular. Composto por apenas uma camada de células epiteliais pavimentosas, este tecido desempenha uma função endócrina importante no controle da resistência vascular, na coagulação, na adesão plaquetária, na resposta imune, no controle de eletrólitos contidos nos espaços intra e extravasculares e na resistência à insulina. Todos esses efeitos fisiológicos podem ser mediados por estímulos mecânicos, pressão e estresse de cisalhamento (*shear stress*), e estímulos hormonais, que promovem a liberação de substâncias vasodilatadoras, anti-agregantes plaquetárias e antiinflamatórias, como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e peptídeo natriurético do tipo C, inibidor de fator tecidual, ativador de plasminogênio. Esses estímulos podem favorecer a liberação de substâncias vasoconstritoras, pró-agregante e pró-inflamatórias, tais como endotelina-1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), tromboxano A<sub>2</sub> (Tx<sub>2</sub>) e espécies reativas de oxigênio (ROS), molécula de adesão intercelular-1(ICAM-1), molécula de adesão vascular (VCAM-1), E-selectina, NF-κB, fator de von Willebrand, inibidor da ativação do plasminogênio-1. O endotélio também contribui para mitogênese, angiogênese e permeabilidade vascular (Endemann & Shiffrin, 2004).

No entanto, quando há alterações na vasodilatação dependente de endotélio e a desregulação das interações endotélio-células sanguíneas ocorre o que atualmente designamos, como disfunção endotelial. Uma das características

da disfunção endotelial é a redução da biodisponibilidade de NO, substância que possui ação vasodilatadora, anti-agregante plaquetária e antiinflamatória.

Essa perda de função endotelial pode acarretar o aparecimento de algumas doenças tais como a hipertensão, choque séptico, insuficiência renal, diabetes e aterosclerose.

### **I.1.Fisiologia endotelial**

O endotélio atua de forma importante na regulação da resistência vascular, e conseqüentemente, na regulação dos níveis pressóricos. Entre as diversas substâncias secretadas algumas atuam de forma significativa como o NO, a PGI<sub>2</sub>, o EDHF, a Ang II, a ET-1 e as ROS. A atuação de cada uma dessas substâncias na fisiologia endotelial será explicada a seguir.

#### **I.1.1. Óxido nítrico (NO)**

A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS-III) é a isoforma predominante no endotélio e responsável pela produção da maior parte do NO nesta célula. Além da eNOS pode ser também encontrada no endotélio a óxido nítrico sintase indutiva (iNOS ou NOS-II), cuja ativação ocorre em situações fisiológicas particulares, como em processos inflamatórios (Walford & Loscalzo, 2003; Rabelink & Lusher, 2006) . Existe ainda a óxido nítrico sintase neural (nNOS ou NOS-I) que se encontra predominantemente nos tecidos neurais.

O NO promove vasodilatação de todos os tipos de vasos através da ativação da guanilil ciclase solúvel presente na musculatura lisa vascular. Uma vez



ativada há o aumento dos níveis de monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) circulantes, que ativa a quinase dependente de cGMP (proteína quinase G - PKG), reduzindo a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reduzidos favorecem uma diminuição da formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, impedindo a ativação da enzima quinase de cadeia leve da miosina e conseqüente fosforização da cadeia leve da miosina, favorecendo o relaxamento vascular. A redução de fluxo de cálcio ocorre através da inibição dos canais de cálcio voltagem dependente e pela ativação da proteína quinase I, que fosforila as proteínas presentes no retículo sarcoplásmico ocasionando um seqüestro do cálcio intracelular para dentro do retículo, mediada pela ATPase reticular (SERCA). Além disso, o cGMP promove a ativação dos canais de potássio dependentes de cálcio ( $\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$ ), promovendo o efluxo deste íon que favorece a hiperpolarização da célula e o relaxamento muscular (Walford & Loscalzo, 2003).

A ativação da eNOS dá-se por meio de um mecanismo dependente do aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e outro independente de cálcio. Todas as isoformas de NOS são enzimas moduláveis e possuem um domínio C-terminal redutase, na qual se liga a NADPH (nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfatada), o FMN (flavina mononucleotídeo) e a FAD (flavina adenina dinucleotídeo). Ligado ao domínio N-terminal há uma oxigenase presente em outro monômero que carrega um grupo heme protético. No domínio N-terminal liga-se a (6R-)5, 6,7, 8 tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), o oxigênio molecular e o substrato, L-arginina (Figura 1) (Förstermann & Münzel, 2006). A seqüência próxima ao ligante da cisteína do heme está aparentemente envolvida na ligação da  $\text{BH}_4$  e L-arginina. Além disso, a NOS

possui um aglomerado de zínco-tiolados que parecem ter papel fundamental na atividade catalítica da enzima (Förstermann & Münzel, 2006, Münzel et. al., 2005).

Todas as isoformas da NOS catalisam a transferência de elétrons mediada pela flavina a partir da ligação do NADPH à região C-terminal, para o heme na região N-terminal. Os elétrons transferidos para o heme são utilizados para reduzir o O<sub>2</sub> que parece ser catalisado pelo complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina. Para produzir NO a enzima precisa passar por esse ciclo duas vezes. Na primeira etapa a NOS hidrolisa a L-arginina a N<sup>o</sup>-hidroxil- L-arginina, que permanece ligada à enzima. Na segunda etapa, a NOS oxida N<sup>o</sup>-hidroxil- L-arginina a L-citrulina e NO (Förstermann & Münzel, 2006; Münzel et. al., 2005).

A eNOS também pode ser ativada por uma via independente de Ca<sup>2+</sup>. Normalmente a eNOS encontra-se inativa na região dos cavéolos, ligada a uma proteína denominada caveolina-1. Quando há um estresse de cisalhamento, a eNOS se dissocia da caveolina-1 e se associa a calmodulina, ativando a eNOS. O estresse de cisalhamento também promove ativação da enzima fosfoinositideo-3 quinase (PI<sub>3</sub> k) que converte fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) no citosol celular. A elevação dos níveis de PIP<sub>3</sub> é requerida para se ligar a duas quinases dependentes de difosfatidilinositol (PDK1 e PDK2).

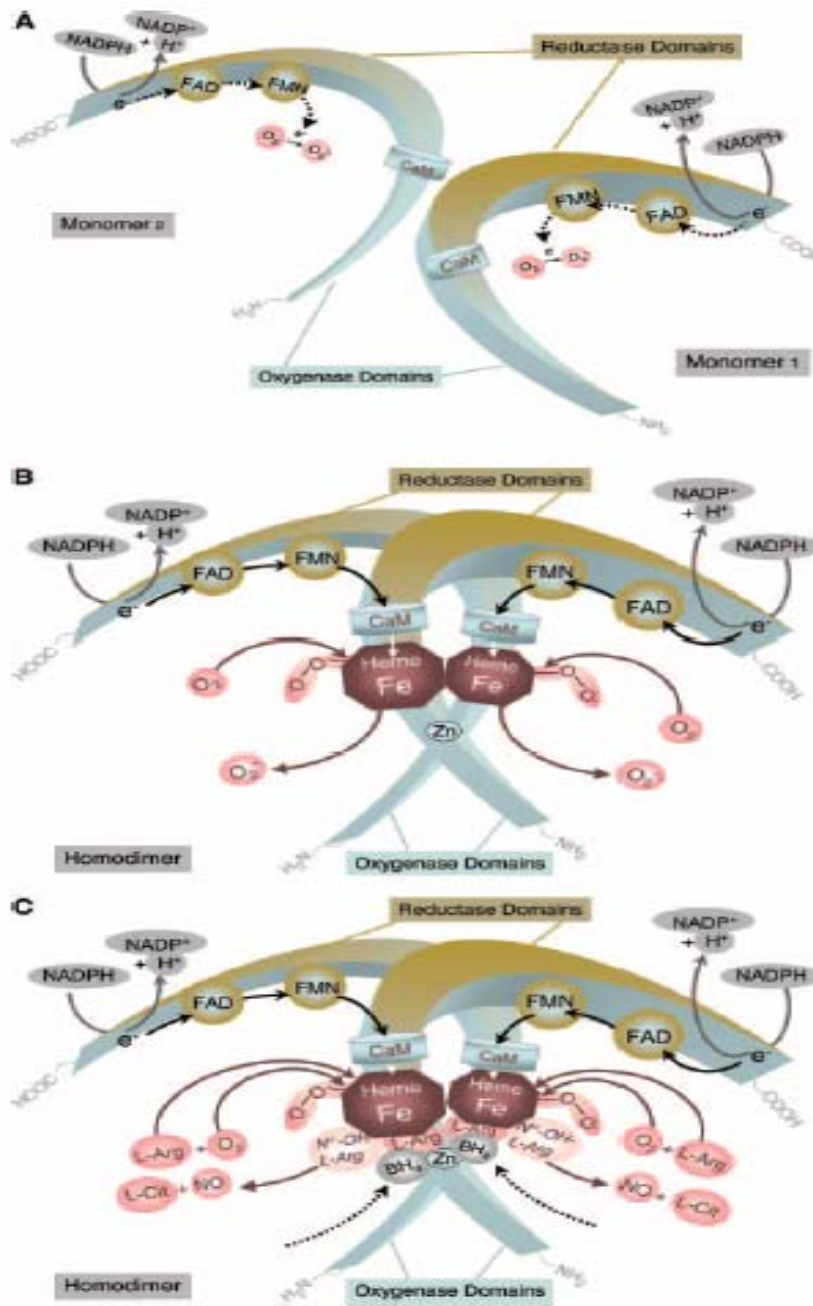


Figura 1. Estrutura básica da eNOS. A) Todas as enzimas NOS são sintetizada como monômeros. Cada subunidade consiste de um domínio redutase e um domínio oxigenase. O monômero e o domínio redutase isolado são capazes de transferir elétrons a partir do NADPH para as flavinas FMN e FAD e possuem uma capacidade limitada de reduzir a molécula de oxigênio. O monômero e o domínio redutase podem se ligar a calmodulina, o qual estimula a transferência de elétrons dentro do domínio redutase. Entretanto, os monômeros são incapazes de se ligar BH<sub>4</sub> ou ao substrato L-arginina e não podem catalizar a produção de NO (B). A presença do heme leva a dimerização da NOS. O heme é essencial para a interação entre os domínios da redutase e da oxigenase e para a transferência de elétrons entre esses domínios. (C) Quando substratos suficientes de L-arginina e o cofator BH<sub>4</sub> estão presentes, os dímeros intactos de NOS juntam seus hemes e reduzem o O<sub>2</sub> para a síntese de NO e L-citrulina. Fonte: Förstermann & Münzel, 2006; fig.1, pp.1709.

Estas por sua vez podem ativar duas fosfoquinases A e C. Uma vez ativadas estas enzimas fosforilaram a Akt quinase que por sua vez irá fosforilar o aminoácido serina 1177 da eNOS, para a conseqüente formação de NO. A ativação desta via ocorre devido à inativação da Rho-quinase (Boo & Jo, 2003).

Nas células endoteliais a Rho-quinase e as quinases associadas a Rho (ROCKs) atuam na regulação da atividade da NOS e possivelmente na sua expressão. Nas células endoteliais a ativação da Rho quinase e das ROCKs é dependente da síntese de farnesilpirofosfato (FPP) e geranylgeranylpirofosfato (GGPP), a partir de um lipídio denominado isoprenoide, que se ligam à proteína G e pequenas proteínas de ligação ao GTP pertencentes à família Ras, Rho, Rap e Rab GTPases. A isoprenilação é crítica para que haja o funcionamento das proteínas de ligação ao GTP. Uma vez ativas as ROCKs inibem a fosforilação da Akt quinase via  $PI_3$  quinase reduzindo a biodisponibilidade de NO (Rikitake & Liao, 2005; Noma et al., 2006).

Caso o substrato L-arginina ou o cofator  $BH_4$  não estiverem ligados a eNOS, esta estará desacoplada. Durante as etapas da redução do oxigênio na região do heme, íon ferroso a superóxido-férrico, pode ocorrer a dissociação do superóxido (na falta da  $BH_4$ ) ou do  $H_2O_2$  (na falta da L-arginina) (Rabelink e Luscher, 2006; Kalinowski & Malinski, 2004).

Assim, a atividade da NOS pode ser inibida pelo decréscimo de L-arginina, decréscimo dos cofatores como  $Ca^{2+}$ , calmodulina e  $BH_4$ ; inibição do fluxo de elétrons pela NADPH e flavina, inibição da expressão de NOS, inibição da ligação dos substratos à NOS e seqüestro da NOS (Yetic-Anacak & Catravas, 2006).

A NOS também parece ser modulada alostericamente por uma chaperona, hsp90, que atuaria aumentando a afinidade da NOS a calmodulina. Essa proteína permitiria a ligação de outras proteínas reguladoras, quinases e fosfatases, importantes na ativação da NOS (Yetic-Anacak & Catravas, 2006).

O óxido nítrico está envolvido com uma série de eventos fisiológicos que incluem vasodilatação, inibição a agregação plaquetária, inibição da multiplicação celular, inibição de respostas pró-inflamatória. No entanto, quando a produção de NO coincide com a produção de superóxido, estes se associam formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) um íon altamente oxidante, que acarreta uma disfunção nos processos de sinalização celular induzindo a morte celular por apoptose ou necrose. Assim, a formação de peroxinitrito parece estar relacionada com diversas patologias como choque circulatório, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca crônica, diabetes, doenças inflamatórias crônicas, câncer e desordens neurodegenerativas (Kalinowski & Malinski, 2004; Yetic-Anacak & Catravas, 2006; Elahi et al., 2007).

O peroxinitrito também leva a um aumento na produção de fatores pró-apoptóticos, tais como citocromo c e fator de indução de apoptose (AIF) a partir da mitocôndria, que modula a via apoptótica dependente e independente de caspase. O peroxinitrito, juntamente com outras substâncias oxidantes, promove quebras no DNA, ativando a enzima nuclear Poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1) e a maquinaria de reparo do DNA. O excesso oxidativo e os danos no DNA induzidos por estresse nitrosativo estimulam as PARPs iniciando um ciclo de consumo energético excessivo pela transferência de unidades de ADP-ribose a partir do

NAD<sup>+</sup> para as proteínas nucleares. Isto resulta em uma rápida depleção das reservas de NAD<sup>+</sup> e ATP, desaceleração na taxa de glicólise e fosforilação oxidativa, favorecendo a disfunção celular e morte. A hiperativação PARP também facilita a expressão de uma variedade de genes inflamatórios, que favorecem o aumento da inflamação e do estresse oxidativo, facilitando a progressão da disfunção cardiovascular e insuficiência cardíaca. (Yetic-Anacak & Catravas, 2006)

### **I.1.2. Prostacilinas**

Além de promover uma redução da biodisponibilidade de NO, a disfunção endotelial também reduz a síntese de prostaciclina no endotélio vascular. A deficiência de prostaciclina ou do receptor para prostaciclina contribui para o desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, trombose, isquemia miocárdica e hipertensão pulmonar (Fetalvero et al., 2007).

A prostaciclina ou prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) é um lipídio que possui 20 carbonos derivados do ácido araquidônico. Este ácido é convertido pela ciclooxigenase-2 (COX-2) em prostaglandina H<sub>2</sub>, que, posteriormente, é convertido pela prostaciclina sintase em PGI<sub>2</sub>. Uma vez produzido, esse autacóide atua principalmente na musculatura lisa vascular e nas plaquetas.

O receptor para PGI<sub>2</sub> está acoplado a proteína G, que modula a ativação da adenilato ciclase, e a consequente produção de cAMP. O cAMP ativa a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) que reduz os níveis de Ca<sup>2+</sup> do citoplasma e diminui a sensibilidade do aparelho contrátil da musculatura lisa vascular ao cálcio,

promovendo, assim, o relaxamento do vaso. Além disso, a PGI<sub>2</sub> promove a abertura de canais de K<sup>+</sup> ATP-dependente (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), ocasionando uma hiperpolarização na célula, inibindo assim o influxo de íons Ca<sup>2+</sup> através de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem. Altas concentrações de PGI<sub>2</sub> também ativam os receptores nucleares PPAR $\alpha$  e PPAR $\delta$  induzindo a angiogênese. Além desses efeitos, esse autacóide também atua como anti-agregante plaquetário e inibe a proliferação e a migração celular (Fetalvero et al., 2007; Parkington et al., 2004).

A redução dos níveis de PGI<sub>2</sub> na disfunção endotelial parece estar associada ao estresse oxidativo. Essa redução decorre da nitração mediada pelo peroxinitrito na molécula de prostacilina sintase, que inibe a síntese de PGI<sub>2</sub> (Parkington et al., 2004).

### **I.1.3. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio**

Além do NO e da PGI<sub>2</sub>, outro fator atua no controle da homeostase, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Este fator promove uma hiperpolarização da membrana da musculatura lisa vascular que inibe os canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes, promovendo assim relaxamento muscular. Embora a presença do EDHF pareça ser bem evidente, até o momento ele ainda não foi identificado.

Diversos estudos fisiológicos demonstraram que o relaxamento vascular é acompanhado por uma hiperpolarização das células musculares lisas através de um mecanismo mediado pelo endotélio (Bolton et al., 1984; Féféton & Vanhotte, 1988; Nakashima et al., 1993). A existência de uma substância ou fator capaz de promover relaxamento muscular independente de NO e PGI<sub>2</sub> foi demonstrado por

Scotland e colaboradores (2005). Esses autores demonstraram que camundongos knockout para eNOS e ciclooxigenase-1 mantinham um mecanismo de hiperpolarização mediado pela acetilcolina que promovia relaxamento vascular.

A resposta vasodilatadora mediada pelo EDHF pode ser inibida por duas toxinas, a caribdotoxina, um inibidor de canais de  $K^+$  ativado pelo  $Ca^{2+}$  de condutância intermediária ( $IK_{Ca^{2+}}$ ) e alta ( $BK_{Ca^{2+}}$ ), e apamina, um bloqueador de canais de  $K^+$  ativado pelo  $Ca^{2+}$  de baixa condutância ( $SK_{Ca^{2+}}$ ) encontrados na musculatura lisa e nas células endoteliais. O uso dessas duas toxinas aboliu o efeito relaxador derivado da hiperpolarização não dependente de NO e  $PGI_2$ , possivelmente inibindo a ação do EDHF (Matoba & Shimokawa, 2003)

As estruturas propostas para o EDHF são amplas, e variam entre a ácido epoxieicosatrienóico (EETs), o peróxido de hidrogênio, o próprio íon  $K^+$  e o NO (Figura 2) (Matoba & Shimokawa, 2003; Fleming, 2004)

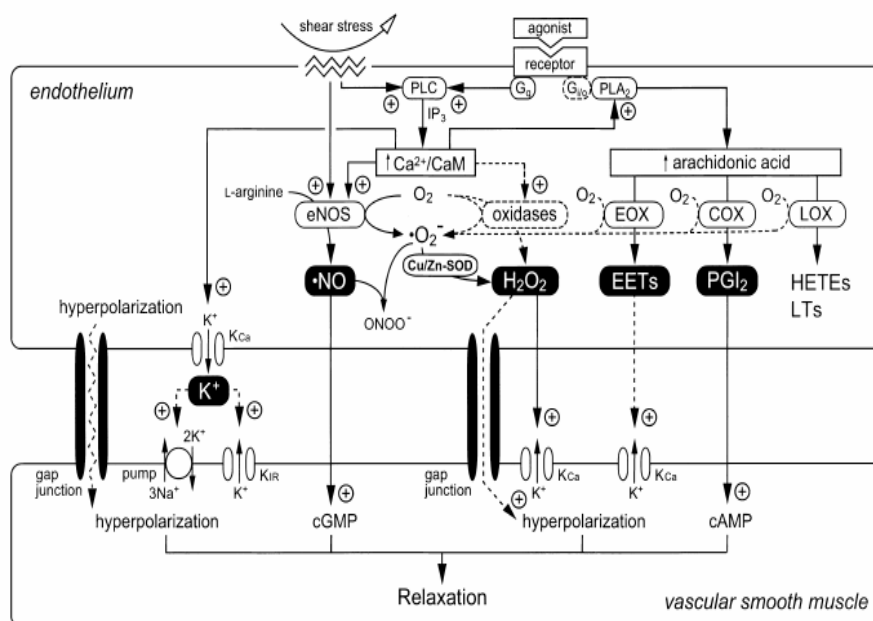


Figura 2. Múltiplos fatores derivados do endotélio. Fonte: Matoba & Shimokawa, 2003.



Uma das hipóteses sustenta que o EDHF é oriundo da oxidação do ácido araquidônico pelo citocromo P450 epoxigenase a EETs, em particular 5,6-,11,12- e 14,15-EETs. Os EETs atuam ativando os canais de  $K^+$  dependentes de cálcio ( $K^+_{Ca^{2+}}$ ), acarretando uma hiperpolarização na musculatura lisa vascular e, conseqüentemente, o relaxamento do vaso. A expressão do citocromo P450 epoxigenase não é constitutiva nas células endoteliais, mas estímulos físicos (estresse de cisalhamento) ou farmacológicos podem estimular sua síntese (Fleming, 2004). Um dos principais problemas dessa hipótese é o fato dos EETs serem lipofílicos, logo sua difusão para um meio com baixo gradiente de concentração seria tão devagar que não poderia promover uma rápida hiperpolarização na célula muscular lisa (Fleming, 2004).

O mecanismo de relaxamento mediado pelo EDHF é inibido pela catalase, um inibidor específico do  $H_2O_2$ , o que sugere que as espécies reativas de oxigênio (ROS) possam atuar como EDHF. A acetilcolina promove a síntese de  $H_2O_2$  nos vasos mesentéricos acarretando hiperpolarização na musculatura lisa vascular através da abertura de canais de  $K^+_{Ca^{2+}}$ . O  $H_2O_2$  seria sintetizado a partir da eNOS e/ou a partir da Cu, Zn-superóxido dismutase endotelial (Shimokawa & Morikawa, 2005; Shimokawa & Matoba, 2004; Morikawa et al., 2004).

Uma outra hipótese sustenta que o EDHF seria uma “nuvem de potássio” capaz de reduzir a ação hiperpolarizante do  $K^+$  derivado do endotélio pela efetiva saturação da  $Na^+/K^+$  ATPase e de canais de  $K^+$  retificação interna ( $K_{IR}$ ). Tal saturação permitiria uma maior movimentação do  $K^+$  para fora da célula muscular

lisa, resultando na sua hiperpolarização. Esta “nuvem de potássio” seria formada com a indução da contração muscular lisa, que ocorre com a despolarização mediado pela abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$  voltagem dependentes. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  resultaria na contração muscular, que é finalizada com a repolarização mediada pelo efluxo do  $\text{K}^+$  através de canais de  $\text{K}^+$  voltagem dependente e/ou sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula o transporte antiporte de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , reduzindo assim as concentrações internas de  $\text{Ca}^{2+}$  e elevando as concentrações de  $\text{Na}^+$ . A combinação desse transporte juntamente com a ação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases poderia favorecer a redução das concentrações internas de  $\text{Ca}^{2+}$ , relaxando a musculatura lisa. No entanto, quando a célula endotelial promove o efluxo de íons  $\text{K}^+$  por meio da ação dos canais de  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  e  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , há uma elevação das concentrações de basais de  $\text{K}^+$  para 5 mM, formando assim uma “nuvem de potássio”. (Savage et al., 2003; Edwards & Weston, 2004).

A hiperpolarização da membrana muscular lisa mediada pela liberação de uma substância derivada do endotélio parece envolver intercomunicações entre as células endoteliais e a musculatura lisa vascular. Nas artérias existem umas junções mioendotelial *gap* pequena (menor que 100 nm) cuja incidência é inversamente proporcional ao diâmetro do vaso e número de células musculares lisas na media (Rummary and Hill, 2004). A presença dessas junções mioendoteliais sugere uma participação na regulação na resistência do tônus vascular, pois ao se inibir essa comunicação entre células com peptídeos miméticos a conexina (Gap 26 e 27) e com derivados de ácido glicerritínico ocorre uma atenuação da hiperpolarização da musculatura lisa. A princípio o relaxamento

ocorre por meio de uma deflagração elétrica do endotélio hiperpolarizado via junções mioendoteliais. A hiperpolarização endotelial se inicia com a abertura de canais de  $K^+_{Ca^{2+}}$  e é sustentado pela depleção dos estoques de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (Griffth et al., 2004; Zhang et al., 2006).

O NO também pode hiperpolarizar, ou repolarizar, a célula muscular lisa vascular pela ativação de canais  $K_{ATP}$ ,  $BK^+_{Ca^{2+}}$ ,  $K_{IR}$  e/ou canais de  $K^+$  voltagem dependentes, via cGMP dependente e independente. O NO também pode interferir no potencial de membrana das células musculares lisas vasculares ao interagir com canais catiônicos e canais para íons cloreto (Bolontina et al., 1994; Félétou & Vanhotte, 2006).

#### **I.2.4. Angiotensina II**

A Ang II é o peptídeo mais ativo da família das angiotensinas e é derivado de uma globulina plasmática, denominada angiotensinogênio, em duas etapas enzimáticas. Primeiramente, a renina, uma enzima secretada pelas células justaglomerulares renais, cliva o angiotensinogênio na porção aminoterminal em um decapeptídeo, angiotensina I (Ang I). Posteriormente, a enzima conversora de angiotensina (ACE), também denominada de cininase II, remove o dipeptídeo carboxiterminal da Ang I para produzir um octapeptídeo Ang II e promove redução do metabolismo da bradicinina reduzindo os níveis plasmáticos do peptídeo. A Ang II é degradada por peptidases a angiotensina III, angiotensina IV e angiotensina (1-7).

A Ang II age diretamente no seu receptor tipo I (AT1), promovendo contração da musculatura lisa vascular e também ocasiona vasoconstrição indireta através da produção de ROS e sequestro de NO (Toda et al., 2007). A ação da Ang II na produção de ROS parece estar diretamente relacionada com a fosforilação da subunidade p47phox da NADPH oxidase, que favorece a sua ativação gerando a formação de superóxido (Das et al., 2004). A produção de ROS mediado pela Ang II promove uma série de efeitos deletérios como hipertensão, hipertrofia cardíaca, hipertrofia da musculatura lisa vascular, proliferação e migração, formação de matriz extracelular, trombose, infiltração celular, aterosclerose e reações inflamatórias (Gasparo, 2002; Toda et al., 2007).

Em 2000, outra enzima associada com a geração de angiotensina foi descoberta: enzima conversora de angiotensina II, (ACE2), uma carboxipeptidase muito similar a cininase II. A ACE2 não promove a formação de Ang II, mas sim de um heptapeptídeo denominado angiotensina (1-7), que têm efeito vasodilatador e inibitório de crescimento (Donogue et al., 2000; Schimieder et al., 2007).

### **1.2.5. Endotelina-1**

A endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo de 21 aminoácidos que possui uma potente ação vasoconstritora, tem efeito pro-inflamatório, propriedades mitogênicas, influencia na homeostase do sal e água, estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso autônomo simpático. Embora haja outras isoformas como ET-2 e a ET-3, o mecanismo de ação destas, ainda não

está claro, mas parecem ter um efeito importante durante o período embriogênico (Shan, 2007).

A ET-1 é produzida pelas células endoteliais, a partir da conversão de uma endotelina imatura a endotelina-1, pela enzima conversora de endotelina. Em baixas concentrações a ET-1 promove vasodilatação ao ativar receptor endotelial ET<sub>B</sub>, o qual ocasiona a formação de NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF. Em altas concentrações a ET-1 se liga ao receptor ET<sub>A</sub>, presente na musculatura lisa vascular, promovendo vasoconstrição. A síntese desse peptídeo é estimulada por vários hormônios como a adrenalina, Ang II e arginina-vasopressina (Schini & Vanhoutte, 1991).

Um grande estimulador da produção de endotelina-1 nas células endoteliais são as ROS (Kahler et al., 2000). Por outro lado, a endotelina-1 ativa a NADPH oxidase na musculatura lisa vascular e nos vasos sanguíneos (Schiffrin, 2005). No entanto, a fonte de ROS mediada pela ET-1 pode variar entre as espécies. Em camundongos, a princípio a ET-1 atua estimulando diretamente a NADPH oxidase (Amiri et al., 2004). Em rato e humanos a principal fonte parece ser a xantina oxidase (XO) e a mitocôndria (Touyz et al., 2004)

### **I.2.6. Espécies reativas de oxigênio**

O endotélio produz vários tipos de espécies reativas de oxigênio (ROS) como por exemplo o superóxido, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e radicais peroxil. O produto básico da produção enzimática das ROS é o anion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o qual é transformado rapidamente em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela superóxido desmutase (SOD). As células vasculares são

capazes de sintetizar ROS a partir de diversas fontes, as quais incluem a NADPH oxidase, xantina oxidase (XO), eNOS desacoplada, citocromo P450 e a cadeia respiratória mitocondrial (Lehoux, 2006).

Nas células endoteliais a principal enzima envolvida na síntese de ROS é a NADPH oxidase. A NADPH oxidase utiliza a NADPH/NADH como doador de elétrons para reduzir o oxigênio em superóxido. Para promover a produção de ROS a NADPH oxidase depende da presença das subunidades citosólicas (p47phox, p67phox ou homólogos) e das subunidades ligadas à membrana (gp91phox, Nox1, Nox4 e p22phox) para formar o complexo enzimático ativo. No endotélio esse complexo enzimático está parcialmente unido e pode ser ativado através da atuação de hormônios, como a Ang II, ou por estímulos mecânicos, como o estresse de cisalhamento. O estresse de cisalhamento aumenta a expressão das subunidades gp91phox (Nox2) e Nox4 e as subunidades Nox1 e p22phox têm sua expressão elevada com a produção de superóxido. No entanto, a p47phox parece regular a produção de ROS pela NADPH oxidase, uma vez que a ausência dessa subunidade reduz a produção de superóxido (Lehoux, 2006; Paravicini & Touyz, 2006).

Além da NADPH oxidase, a XO parece contribuir de forma significativa na produção de ROS. A XO é uma metaloenzima que oxida a hipoxantina em xantina para formar superóxido. Altas concentrações de superóxido e  $H_2O_2$  inibem a xantina desidrogenase favorecendo a ativação da XO. Além disso, o NADPH parece ser importante para manter os níveis de XO. (Lehoux, 2006; Paravicini & Touyz, 2006)

A eNOS também pode contribuir na produção de ROS, como já foi descrito anteriormente, uma vez que estejam ausentes um de seus co-fatores como a BH<sub>4</sub> e a L- arginina (Figura 3).

Para contrabalançar o aumento do estresse oxidativo algumas enzimas auxiliam na redução de ROS como a SOD, catalase, glutathiona peroxidase, tioredoxina ((Trx) e o heme oxigenase (HO-1) (Lehoux, 2006)

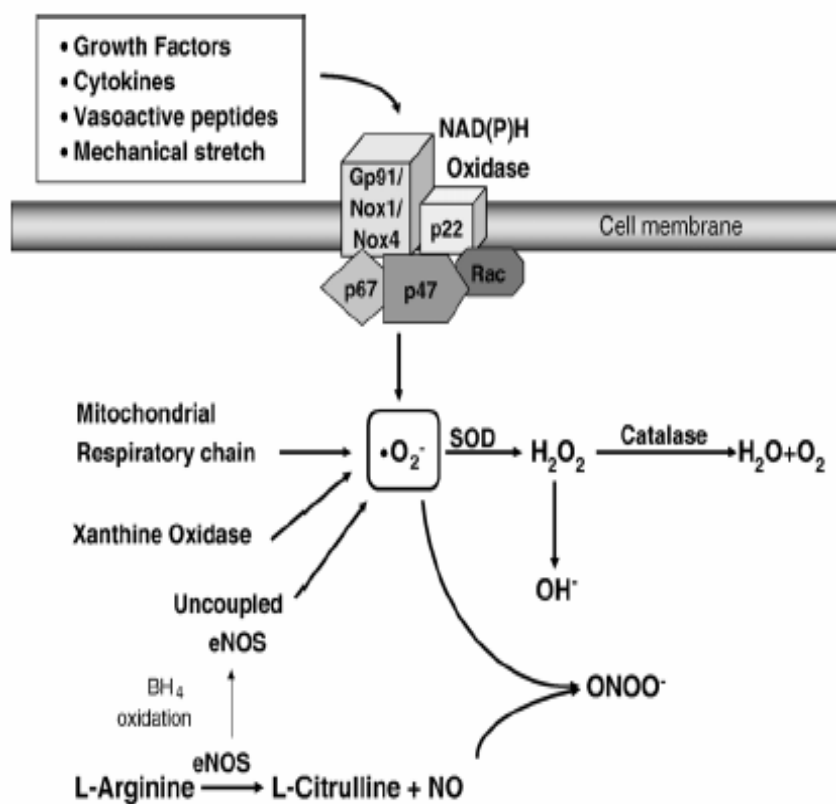


Figura 3. Geração de superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células endoteliais. Fonte: Paravicini & Touyz, 2006

A perda, pelo endotélio, da capacidade de regular de forma satisfatória os mecanismos moleculares capazes de promover vasodilatação e de regular sua

interação com as células sanguíneas, favorece o desenvolvimento de patologias cardiovasculares, como por exemplo à hipertensão.

## **I.2. Hipertensão**

No mundo, as doenças cardiovasculares são responsáveis pela morte prematura de 600 milhões de pessoas, sendo 7,1 milhões por hipertensão arterial (WHO, 2002-2003). Só no Brasil, a hipertensão arterial atinge cerca de 17 milhões de pessoas, com uma prevalência estimada em 35% da população acima dos 40 anos. (Ministério da Saúde, 2005). Os gastos no tratamento da doença em 2004 foram de 56 milhões, mas em 2005 os gastos superaram a ordem de 93,2 milhões, apenas com a compra de 3 medicamentos: hidroclorotiazida 25 mg, captopril 25 mg, propranolol 45mg (Ministério da Saúde, 2005).

A grande incidência de mortes prematuras ocasionadas pela hipertensão arterial decorre de complicações médicas favorecidas por essa doença como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, aumento no volume cardíaco, insuficiência renal e acidente vascular cerebral.

Muitas são as causas da hipertensão arterial, dentre elas podemos citar as decorrentes de alguma desordem renal, que acarreta um acúmulo de sal e água em função de complicações no processo de filtração ou em função do aumento da liberação de angiotensina; da Síndrome de Cushing; de tumores na hipófise e na adrenal que ocasionam um aumento nos níveis de cortisol, adrenalina e aldosterona favorecendo o desenvolvimento da hipertensão arterial. Outras



condições que podem ocasionar hipertensão arterial são o uso de alguns medicamentos, desordens na glândula tiroideana, alcoolismo, gravidez e disfunção endotelial.

Por ser uma doença que apresenta diferentes fatores causais, diferentes modelos experimentais de estudo da hipertensão em animais, genéticos e não genéticos, foram desenvolvidos com o objetivo de melhor compreender a doença. Alguns desses modelos experimentais de estudo serão salientados à seguir.

### **I.2.1. Modelos experimentais de estudo da hipertensão**

#### **I.2.1.1. Hipertensão renovascular (2R-1C)**

Harry Goldblatt e colaboradores (1934) desenvolveram o primeiro modelo de estudo de hipertensão em animais ao promover a constrição da artéria renal em cachorros (Dois rins um clipe; 2R-1C). Esta metodologia foi repetida por outros cientistas em diferentes animais como ratos, camundongos, coelhos, porcos e macacos, e como no cachorro a pressão desses animais elevou-se rapidamente. Em ratos, esta obstrução promoveu o desenvolvimento de uma hipertensão crônica, ocasionando a perda de 10-20% dos animais após duas semanas (Pinto et al., 1998).

A hipertensão observada neste modelo é particularmente dependente da abertura do clipe, da idade do rato e do tempo de uso do clipe. Além disso, este procedimento promove uma série de modificações morfológicas em diferentes órgãos, como disfunção endotelial, hipertrofia cardíaca (aumento de 20-50 % no

tamanho cardíaco) e hipertrofia do rim contralateral exposto à hipertensão (Lerman et al., 2005).

O aumento da pressão arterial neste modelo experimental decorre de um aumento dos níveis plasmáticos de renina, resultante do rim com estenose da artéria renal e, conseqüentemente, de Ang II e aldosterona (Lerman et al., 2005). Além disso, a atividade da ACE (Sharifi et al., 2003) e do receptor AT1 (Cervenca et al., 2002) e a ativação do sistema autônomo simpático (Faber et al., 1984) aumentam com o desenvolvimento da hipertensão em ratos 2R-1C. O aumento dos níveis de Ang II favorece a ativação da enzima NADPH oxidase e da XO elevando os níveis de ROS. O anion superóxido reage com o NO, formando peroxinitrito, reduzindo a biodisponibilidade de NO (Das et al., 2004; Lerman et al., 2005). Estes efeitos contribuem para a disfunção endotelial e remodelamento vascular, assim como para hiperplasia cardíaca.

#### **I.2.1.2. Hipertensão induzida por DOCA-sal**

A aldosterona é um mineralocorticóide sintetizado pela zona glomerulosa da adrenal, em resposta a redução da volemia sanguínea, a elevação dos níveis de potássio no líquido extracelular ou em resposta a Ang II. O aldosteronismo primário (Síndrome de Conn) é uma das muitas causas da hipertensão. O aumento na produção de aldosterona acarreta uma elevação inapropriada na concentração de sódio no líquido extracelular e retenção de água. Secundariamente, a aldosterona eleva a excreção urinária de magnésio e potássio ocasionando um desequilíbrio eletrolítico, aumentando os riscos de uma arritmia ventricular,

remodelamento do miocárdio, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (Tan et al., 2004).

Assim, com a administração de um mineralocorticoide (deoxicorticosterona) associada a um aumento na ingestão de sal (DOCA-sal) foi possível criar um modelo de hipertensão similar ao observado no aldosteronismo primário (Hebert-Carrington et al., 1949). Os animais uninefrectomizados submetidos ao tratamento com DOCA-sal apresentam um aumento no volume sanguíneo, aumento no débito cardíaco, aumento da massa cardíaca em cerca de 30%, disfunção endotelial, proteinúria, glomeruloesclerose (Lerman et al., 2005), redução dos níveis de Ang II, ACE (Wong & Zimmerman 1982; Wada et al., 1995) e um aumento dos níveis de endotelina-1 (Matsumara et al., 2000; Yu, et al. 2001). Além disso, observa-se que há uma redução na fosforilação dos aminoácidos serina 1179 e 635 da eNOS e, conseqüentemente, uma diminuição dos níveis de NO/cGMP (Sasser et al. 2004). A condutividade dos canais de  $K_{ATP}$  apresenta-se reduzida na musculatura lisa vascular dos ratos DOCA-sal (Ghosh et al., 2004).

O aumento da atividade da endotelina-1, atuando no receptor  $ET_A$ , parece ser o responsável pelo aumento na atividade de NADPH oxidase e na produção de ROS desses ratos (Wu, et al., 2001; Li et al., 2003; Sun et al., 2006; Paravicini & Touyz, 2006).

### **I.2.1.3. Hipertensão induzida pelo L-NAME**

A NG-nitro-L-argina metil ester (L-NAME) é um inibidor de NO-sintase e capaz de induzir hipertensão em ratos (Ribeiro et al.; 1992; Baylis et al., 1992). A

hipertensão promovida pelo L-NAME ainda não foi completamente elucidada, mas possivelmente deve ser decorrente da redução dos níveis de NO (De Gennaro et al., 2005), aumento da atividade simpática (Sakuma et al., 1992) e aumento da ativação do sistema renina-angiotensina (Zanchi et al., 1995) ocasionando uma vasoconstrição que promove o aumento na resistência vascular. Um aumento no estresse oxidativo em razão da elevação da atividade da NADPH oxidase também parece estar envolvida na hipertensão promovida pelo L-NAME (Toba et al., 2005; Kitamoto et al., 2000).

#### **I.2.1.4. Hipertensão espontânea**

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foi obtida por Okamoto e Aoki (1963) a partir de ratos Wistar. A pressão desses ratos eleva-se a partir da 5-6 semanas de idade e atinge os valores sistólicos de 180-200 mm Hg. É comum observar hipertrofia cardíaca (aumento de 30%), insuficiência cardíaca entre 18-24 meses e redução na resposta vasodilatadora dependente do endotélio a partir da 13-15 semanas de idades. Lesões renais, proteinúria e redução no clearance da creatinina, são comumente observadas (Pinto et al., 1998).

Os mecanismos envolvidos na hipertensão dos SHRs ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns trabalhos têm demonstrado que a Ang II parece ter um importante papel na promoção da hipertensão desses ratos, visto que ao tratá-los com inibidores de ACE, há uma redução significativa da pressão arterial desses animais, bem como uma normalização da função endotelial e uma redução da mortalidade (Linz et al., 2006; Nakano et al., 2006).

A nível vascular a expressão da eNOS e da iNOS está aumentada nos SHR em relação aos ratos Wistar, além de elevar-se com a idade (Chou et al. 1998; Vaziri et al., 2002; Piech et al., 2003). Embora a eNOS esteja aumentada aparentemente ela não está acoplada, uma vez que ao se tratar SHRs com BH<sub>4</sub> observa-se uma redução na pressão arterial (Yang et al., 2003; Paravicini & Touyz, 2006). O desacoplamento da eNOS juntamente com o aumento da atividade da XO favorece nos SHRs, um aumento na produção de ROS que contribuem para a disfunção endotelial observada nesses ratos (Ulker et al., 2003; Paravicini & Touyz, 2006; Li et al., 2006; Bevers et al., 2006). O efeito vasoconstritor observado nos SHR parece ser favorecido pelo superóxido e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os quais regulam a concentração intracelular de cálcio no leito vascular mesentérico desses ratos (Tabet et al., 2004; Paravicini & Touyz, 2006).

### **I.3. Polifenóis**

Embora, no tratamento da hipertensão, a abordagem terapêutica seja bem ampla, a terapia anti-hipertensiva geralmente não é dirigida para uma causa específica. Por esta razão, tratamentos prolongados com alguns fármacos anti-hipertensivos podem concorrer para o desenvolvimento de uma série de complicações inerentes à própria toxicidade farmacológica. Assim, um dos grandes desafios da farmacologia é oferecer uma terapia anti-hipertensiva eficaz, consistente, de baixa toxicidade e de baixo custo para o paciente.

Diversos estudos epidemiológicos sugerem que o alto consumo de polifenóis está associado com a redução dos riscos cardiovasculares (Stoclet et

al., 2004). O mais famoso exemplo dessa associação tem sido observado na França, “Paradoxo Francês”, que apresenta um índice de risco de doenças coronarianas baixo, apesar do alto consumo de gordura saturada acompanhado pelo consumo regular de vinho (Vita, 2005; Zern & Fernandes, 2005). Este efeito benéfico pode estar relacionado à ação antioxidante desses polifenóis (Frenkel et al., 1993) que aumentam a biodisponibilidade de NO (Fitzpatrick et al., 2000), favorecendo uma ação vasodilatadora (Fitzpatrick et al., 2000) e propriedades anti-hipertensivas (Diebold et al., 2001; Soares de Moura et al., 2002; Kubota et al., 2006).

Os polifenóis são substâncias redutoras, divididos em três classes principais: os flavonóides, os taninos e as antraquinonas. Os taninos condensados, da mesma forma que os taninos hidrolisáveis e a lignina, são polifenóis de elevado peso molecular, cuja função na planta é a defesa contra herbívoros, principalmente. Quimicamente são formados pela ligação de unidades de flavonóides, geralmente flavan-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis, proveniente do metabolismo dos flavonóides. Eles são formados pela hidroxilação no C-3 de uma flavanona, seguida por redução (Figura 4) (Falkenberg et al., 2003).

Os flavonóides constituem um grupo de pigmentos vegetais, amplamente distribuído, que parece estar relacionado com funções de defesa e atração de polinizadores. Quimicamente os flavonóides contêm dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6) (Figura 4) (Falkenberg et al., 2003).

As antraquinonas podem ser formadas via ácido chiquímico e acetato ou totalmente via acetato (acilpolimalonato). O ácido chiquímico reage com o  $\alpha$ -cetoglutárico produzindo o ácido  $\gamma$ -succinilbenzóico que ao associar com ácido mevalônico forma uma antraquinina (Falkenberg et al., 2003).

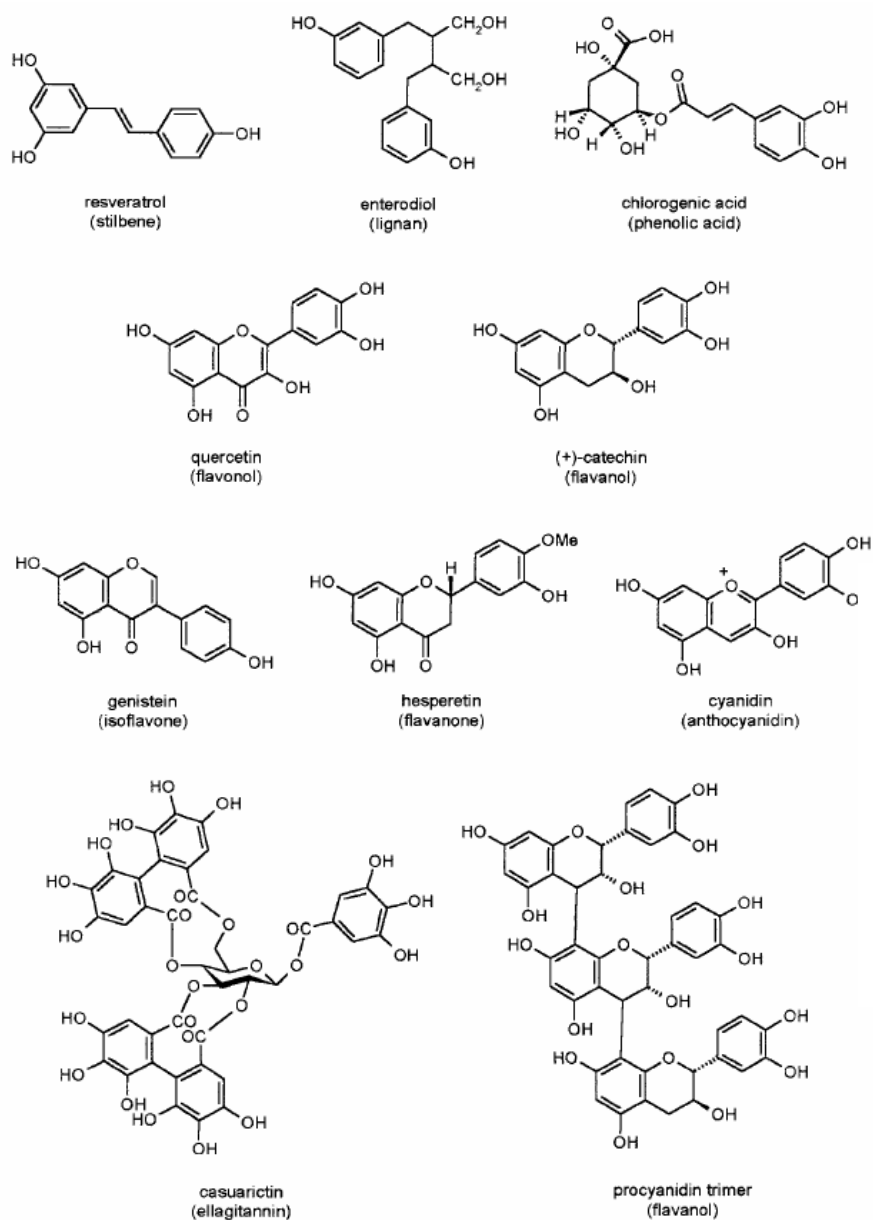


Figura 4. Estrutura química de algumas classes de polifenóis. Fonte: Scalbert & Williamson., 2000.

Estas moléculas podem estar presentes em sua forma livre ou polimerizada, ou seja, ligada a outro não-flavonóide, flavonóide, molécula de açúcar ou uma combinação desses, formando por exemplo, os taninos condensados ou hidrolisados e os compostos fenólicos combinados.

#### **1.4. *Euterpe oleracea* Mart. - Açaí**

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira cujos estipes atingem de 2 a 30 metros de altura, possui folhas longas e segmentadas, flores em espiga, frutos drupáceos e gomo terminal longo e macio que constitui o chamado palmito. Na região norte apresenta várias denominações como açaí do Pará, açaí touceira, açaí do estuário, juçara ou jiçara. Nas Guianas é conhecida como pinot, pelos franceses, *Euterpe palm*, pelos ingleses e manacá pelos venezuelanos (Santos, 2001).

Planta típica dos trópicos, o açaí está amplamente difundido na região Amazônica, principalmente nos Estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. Nessas regiões o fruto fornece, através de despulpamento manual ou mecânico, o suco, também conhecido como “vinho do açaí”, que também é utilizado na feitura de picolés, sorvetes e sucos congelados (Calzavara, 1972; Santos, 2001). Aproximadamente 10000 toneladas de polpa do fruto são consumidos no Brasil e 1000 toneladas são exportadas para muitos países, tais como Japão, Estados Unidos, Holanda e Itália (Embrapa, 2004).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o açaí é rico em antocianidinas (cianoidina 3-O-arabinosídeo, cianoidina 3-O-glucosídeo, cianoidina 3-O-rutinosídeo)



e outros polifenóis como epicatequinas, catequina homo-orientina, orientina, isovitexina e taxifolina deoxihexose (Bobbio et al., 2000; Pozo-Isfran et al., 2004; Gallori et al., 2004) e que esses polifenóis possuem um efeito antioxidante (Lichtenhaler et al., 2005; Rodrigues et al., 2006).

Estas informações nos mostram que quimicamente, até certo ponto, o açaí se assemelha ao vinho, pois ambos são ricos em polifenóis contendo grandes quantidades de catequina, epicatequinas e cianidinas. Como estas substâncias parecem participar intensamente das propriedades farmacodinâmicas do vinho e dos extratos de uvas, considerando ainda que o açaí é largamente consumido no Brasil nas mais diversas formas, mas principalmente sob a forma de um concentrado líquido da polpa de açaí, nos perguntamos se o açaí não teria também propriedades farmacológicas úteis para um possível uso terapêutico.

# *Objetivos*

---

### **I.5. Objetivo geral**

O presente projeto tem dois objetivos principais a saber:

- a) Determinar o mecanismo do efeito vasodilatador do extrato hidro-alcoólico obtido do caroço de açaí (ASE)
- b) estudar um possível efeito anti-hipertensivo do ASE.

### **I.6. Objetivos Específicos**

- a) Estudar a participação de endotélio no efeito vasodilatador do ASE no leito mesentérico isolado do rato;
- b) estudar a participação do NO e do EDHF (Fator hiperpolarizante derivado do endotélio) no efeito vasodilatador do ASE em leito mesentérico isolado do rato e avaliar a formação de NO a partir de células endoteliais em cultura;
- c) estudar a participação da guanilato ciclase solúvel no efeito vasodilatador do ASE, em leito mesentérico isolado do rato;
- d) avaliar a contribuição dos canais de potássio no efeito vasodilatador do ASE em leito mesentérico isolado do rato;
- e) verificar o possível envolvimento de receptores de membrana, do tipo muscarínico, histaminérgico, alfa-adrenérgico e da bradicinina no efeito vasodilatador do ASE, em leito mesentérico isolado do rato;

- f) verificar se há alteração nos parâmetros cardiovasculares, tais como frequência cardíaca, pressão sistólica, diastólica e média em ratos normotensos e hipertensos tratados com ASE.
- g) havendo efeito anti-hipertensivo, verificaremos se o ASE interfere na expressão da eNOS em vasos mesentéricos isolatos de ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR).

# *Discussão*

---

## **Discussão**

---

O presente trabalho demonstrou que os extratos hidroalcoólicos do açaí apresentam um efeito vasodilatador dependente de dose. Diferentemente do observado com ACh e NG, a vasodilatação mediada pelos extratos não possui um efeito reversível, mas sim uma ação prolongada sugerindo uma farmacodinâmica diferente entre esses vasodiladores e os extratos hidroalcoólicos do açaí. Dentre os diferentes extratos avaliados, o extrato hidroalcoólico de caroço (ASE) foi o mais potente sugerindo que podem haver compostos diferentes no caroço e na casca ou a maior concentração de polifenóis totais observado no ASE possa também justificar a maior potência desse extrato em relação aos demais.

Diversos trabalhos têm salientado que os polifenóis têm uma ação vasodilatadora significativa (Fitzpatrick et al., 2000; Soares de Moura et al., 2002; Soares de Moura et al., 2005; Stoclet et al., 2004). Os extratos hidroalcoólicos de caroço e de casca apresentaram percentuais elevados de polifenóis totais, 25% e 18% respectivamente. Alguns trabalhos têm reportado que o açaí é rico em antocianidinas, epicatequinas, catequina homo-orientina, orientina, isovitexina e taxifolina deoxihexose (Bobbio et al., 2000; Pozo-Isfran et al., 2004; Gallori et al., 2005), os quais muitos também podem ser encontrados nos extratos de uva e de vinho, que apresentam ação vasodilatadora e anti-hipertensiva (Fitzpatrick et al., 2000; Soares de Moura et al., 2002; Soares de Moura et al., 2004; Stoclet et al., 2004). Possivelmente a ação vasodilatadora dos extratos hidroalcoólicos do açaí possa ser explicada em função da presença desses polifenóis.

Embora não tenhamos certeza dos compostos fenólicos presentes no ASE, cineticamente o grau de absorção, biodisponibilidade e excreção varia bastante entre os compostos. Os polifenóis que apresentam melhor taxa de absorção são o ácido gálico e as isoflavonas, seguido pelas catequinas, flavanonas e quercetinas glucosídeos. Já as proantocianidinas e as antocianidinas apresentam baixa capacidade de absorção. Dependendo do polifenol, a taxa de excreção urinária pode variar de 0,3% a 43% da dose ingerida (Manach et al., 2005). Alguns estudos têm mostrado que o resveratrol apresenta biodisponibilidade extremamente baixa em função do alto metabolismo (Wale et al., 2004; Wenzel & Somoza, 2005). No entanto, a absorção desses compostos parece aumentar quando estão conjugados a um glicídio, e aparentemente, há também um aumento na biodisponibilidade dos polifenóis. Uma vez que os extratos de plantas apresentam taxas relativamente altas de polifenóis conjugados, o real grau de absorção desses compostos deve variar bastante entre os diferentes extratos vegetais (Rush et al., 2007; Scalbert & Williamson, 2000). Logo, a administração *in bolus* e via oral desses extratos podem representar a real ação desses extratos nos meios fisiológicos.

Dentre os diferentes extratos hidroalcoólicos estudados, o extrato hidroalcoólico de caroço de açaí foi significativamente o mais potente. Por esta razão os estudos farmacodinâmicos foram todos realizados com o ASE. O mecanismo de ação vasodilatadora do ASE ainda não está totalmente esclarecido, mas o endotélio tem um importante papel, uma vez que o efeito vasodilatador é significativamente reduzido ao se retirar quimicamente a camada endotelial

através da ação do ácido deoxicólico. Essa redução do efeito vasodilatador pela ação do ácido deoxicólico também pode ser observado com ACh, que tem seu mecanismo dependente da presença do endotélio (Moore et al., 1990; Parsons et al., 1994). O mesmo não foi observado com a NG, cuja vasodilatação independe da presença das células endoteliais. O ácido deoxicólico atua como um detergente retirando a camada de células endoteliais sem interferir com a camada muscular lisa vascular. A utilização da NG como controle positivo visa justamente confirmar a integridade desse tecido através da ativação da via cGMP (Shibata et al., 1992; Khan et al., 1992).

Nossos resultados também demonstraram que o efeito vasodilatador do ASE é independente da estimulação dos receptores muscarínicos, histaminérgicos, alfa-2 adrenérgico e da bradicinina, uma vez que seus respectivos inibidores, atropina, pirilamina, ioimbina e HOE 140, não modificaram a sua resposta. Embora o ASE não os estimule, o extrato poderia estar interferindo na síntese de fatores de relaxamento derivado do endotélio, como a PGI<sub>2</sub>, NO e EDHF.

A conversão do ácido araquidônico pela enzima COX-2 favorece a síntese da PGI<sub>2</sub>. Esse autacóide induz uma hiperpolarização na célula muscular lisa ao promover a abertura de canais de K<sub>ATP</sub>, que inibe o influxo de íons Ca<sup>2+</sup> através de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem, favorecendo o relaxamento vascular. Ao inibirmos a COX com seu inibidor, indometacina, a resposta vasodilatadora do ASE não foi modificada. Assim, aparentemente a PGI<sub>2</sub> não está envolvida no mecanismo vasodilatador do ASE.



A participação dos canais voltagem dependente de  $K^+$  e  $K^+_{ATP}$  no efeito vasodilatador promovido pelo ASE parece improvável, visto que os inibidores dos respectivos canais, 4-aminopiridina e glibenclamida (Choquet & Korn, 1992; Aguilar-Bryan et al., 1995), não modificaram a resposta do extrato.

A eNOS é a isoforma predominantemente encontrada nas células endoteliais e responsável pela síntese do NO. O NO promove vasodilatação através da ativação da guanilil ciclase solúvel presente na musculatura lisa vascular, que eleva os níveis de cGMP circulantes. O cGMP, por sua vez, inibe os canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependentes e favorece o sequestro do  $Ca^{2+}$  intracelular para dentro do retículo sarcoplasmático, ocasionando o relaxamento vascular, uma vez que diminui a formação do complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, importante para a fosforilação da cadeia leve da miosina. O cGMP também promove a ativação dos canais  $K^+_{Ca^{2+}}$ , favorecendo o efluxo deste íon e a hiperpolarização da célula (Walford & Loscalzo, 2003; Waldman & Murad, 1987; Tare et al., 1990).

O L-NAME, um inibidor da NO sintase, reduz de forma significativa a resposta vasodilatadora da ACh, mas não interfere na resposta da NG (Rees et al., 1989). Isto ocorre porque a resposta vasodilatadora da ACh é, em parte, dependente da síntese de NO (Vanhoutte & Mombouli, 1996). O efeito vasodilatador do ASE é reduzido pelo L-NAME, sugerindo que o NO tem uma importante participação no mecanismo de relaxamento vascular mediado por este extrato. Esta observação foi confirmada pela cultura de células endoteliais de veia umbilical tratadas com ASE, na qual houve um aumento significativo da síntese

de NO. No entanto, esta resposta foi abolida quando estas células foram tratadas com L-NA.

A participação da via NO-cGMP no mecanismo de relaxamento vascular do ASE foi confirmada com a utilização do ODQ, um inibidor de guanilil ciclase, que reduziu de forma significativa sua resposta vasodilatadora.

O EDHF tem um importante papel na regulação da resistência vascular. Embora o EDHF ainda seja uma substância desconhecida, sabe-se que ele atua promovendo uma hiperpolarização celular através da abertura de canais de  $K^+$  (Chen et al.; 1988; Félétou & Vanhoutte, 1988). Diversos trabalhos têm demonstrado que inibidores de canais  $K^+_{Ca^{2+}}$ , como a caribdotoxina e a apamina, são capazes de inibir a ação do EDHF (Matobo & Shimokawa, 2003), bem como a hiperpolarização promovida pelo aumento das concentrações de  $K^+$  em soluções fisiológicas.

A ação vasodilatadora promovida pelo ASE parece ser também dependente da produção do EDHF. Ao utilizarmos uma solução fisiológica com altas concentrações de  $K^+$  ou os inibidores caribdotoxina e apamina a resposta vasodilatadora promovida pelo ASE foi reduzida de forma significativa. No entanto, somente quando associamos o L-NAME a solução com  $K^+$  a 45 mM, o relaxamento vascular promovido pelo ASE foi abolido, sugerindo que a resposta vasodilatadora do ASE é dependente de NO e EDHF.

De forma geral, a grande maioria dos extratos de plantas ricos em polifenóis, que apresentam uma ação vasodilatadora, parecem ter suas ações dependentes de endotélio, via NO/cGMP (Benito et al., 2002; Ozgová et al., 2003;

Taubert et al., 2002; Soares de Moura et al., 2004; Stoclet et al., 2004; Dell'Agli et al., 2004; Soares de Moura et al., 2005; Kubota et al., 2006). Alguns estudos têm sugerido que os polifenóis promovem a ativação da via PI<sub>3</sub> quinase/Akt quinase ocasionando a fosforilação da eNOS e, conseqüentemente, um aumento na biodisponibilidade de NO (Dimmeler et al., 1999; Ndiaye et al., 2004; Anselm et al., 2007)

Uma possível ação hipertensiva foi também estudada, visto que o ASE possui uma potente ação vasodilatadora e diversos trabalhos tem relatado que extratos ricos em polifenóis também podem apresentar uma ação anti-hipertensiva (Soares de Moura et al., 2002; Stoclet et al., 2004). Para tanto, escolhemos quatro modelos experimentais de hipertensão para avaliarmos esse possível efeito: 2R-1C; DOCA-sal, L-NAME e SHR. Em todos os modelos o ASE demonstrou ter uma ação anti-hipertensiva.

O modelo de hipertensão renovascular (2R-1C) caracteriza-se pela estenose da artéria renal por um clipe de prata, que favorece a ativação do sistema renina-angiotensina, com o intuito de aumentar o fluxo sanguíneo na região glomerular, que se encontra reduzido (Pinto et al., 1998; Lerman et al., 2005). Além disso, a atividade da ACE (Sharifi et al., 2003), do receptor AT-1 (Cervenca et al., 2002) e do sistema nervoso autônomo simpático (Faber et al., 1984) encontram-se aumentados. O aumento de Ang II favorece a ativação da NADPH oxidase (Paravavicini & Touyz, 2006) e, conseqüentemente, do aumento do estresse oxidativo. O efeito anti-hipertensivo do ASE neste modelo de hipertensão pode ter sido favorecido pela redução da resistência periférica

mediada pela ação vasodilatadora do ASE e pela ação antioxidante desse extrato. Diversos trabalhos têm demonstrado que o uso de substâncias antioxidantes, como tempol, um mimético da superóxido desmutase, podem reverter a elevação da pressão arterial nesse modelo de hipertensão através da redução do estresse oxidativo (Welch et al., 2003).

A ação antioxidante do açaí têm sido demonstrada em alguns estudos (Lichtenhaler et al., 2004; Rodrigues et al., 2006) e confirmada no presente trabalho. Diversos trabalhos têm demonstrado que os polifenóis apresentam efeito antioxidante (Deckert et al., 1997; Ozgová et al., 2003; Stoclet et al., 2004; Wei et al., 2004; Ying et al., 2004; Pignatelli et al., 2006). Esse efeito parece envolver a redução da expressão da NADPH oxidase (Wei et al., 2004; Ozgavá et al., 2003; Ying et al., 2004; ; Sarr et al., 2006; Pignatelli et al., 2006; Jiménez et al., 2007) e o aumento da expressão de catalase (Ying et al., 2004), reduzindo o estresse oxidativo.

A ação do ASE não parece envolver a inibição da ACE, visto que no modelo DOCA-sal, renina independente, o extrato foi igualmente efetivo. Neste modelo de hipertensão o mineralocorticóide inibe a produção de Ang II, mas apresenta uma elevação da retenção líquida, o que favorece o aumento da pressão arterial (Tan et al., 2004). Além disso, esse modelo apresenta uma baixa disponibilidade de NO, possivelmente em razão do estresse oxidativo que se encontra elevado em função da ativação da NADPH oxidase, possivelmente pela endotelina-1 (Wu et al., 2001; Li et al., 2003; Sun et al., 2006; Paravicini & Touyz, 2006). Provavelmente o efeito anti-hipertensivo do ASE no modelo DOCA-sal possa ser

devido à sua ação vasodilatadora, que como já visto com a hidralizina, pode reduzir a pressão arterial nesse modelo (Cuman et al., 1994). Além disso, o ASE aumenta a síntese de NO em células endoteliais de veia umbilical como já comentado, bem como a expressão de eNOS em ratos normotensos. Possivelmente o ASE pode ter aumentado a disponibilidade do NO favorecendo o efeito anti-hipertensivo. Somado a isto, a ação antioxidante do ASE pode ter auxiliado a inibição da elevação da pressão arterial. A hipertensão induzida pelo DOCA-sal promove uma séria de modificações morfológica dos tecidos cardíaco, renal e vascular que favorecem a redução da sobrevida dos ratos submetidos à esse tratamento (Lerman et al., 2005). Os ratos DOCA-sal tratados com ASE tiveram um aumento da sobrevida de cerca de um mês quando comparados aos ratos DOCA-sal controle. Os polifenóis já demonstraram que inibem a NADPH oxidase e reduzem a expressão de ET-1 e (Jiménez et al., 2007), assim como o uso de agentes antioxidantes reduziram o remodelamento vascular em ratos DOCA-sal, atenuando os efeitos deletérios do mineralocorticóide e aumentando a sobrevida destes (Park et al, 2002). Possivelmente a ação antioxidante do ASE pode ter favorecido o aumento na sobrevida dos ratos.

No modelo L-NAME a hipertensão é favorecida pela inibição crônica da NO sintase (Ribeiro et al., 1992; Baylis et al., 1992), que parece favorecer o aumento da estimulação simpática (Sakuma et al., 1992), do sistema renina-angiotensina (Zanchi et al., 1995) e do estresse oxidativo (Toba et al., 2005; Kitamoto et al., 2000). Trabalhos anteriores têm demonstrado que vasodilatadores, como a hidralazina (Okazaki et al., 2006) e antioxidantes como o tempol (Kopkan & Majid,

2005) são capazes de reverter a hipertensão ocasionada pelo L-NAME. O ASE apresenta não apenas uma ação vasodilatadora, mas também antioxidante, que pode ter contribuído para a ação anti-hipertensiva desse extrato, neste modelo de hipertensão.

Outro modelo estudado foi o SHR. Esses ratos são geneticamente hipertensos e apresentam a elevação da pressão arterial a partir da 5-6 semana de idade (Lerman et al., 2005). Os mecanismos que levam a este aumento ainda não estão totalmente claros, mas acredita-se que o aumento do estresse oxidativo nesses ratos seja um dos principais mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial. O estresse oxidativo favorece o desacoplamento da eNOS reduzindo a biodisponibilidade de NO (Yang et al., 2003; Ulker et al., 2003; Tabet et al., 2004; Paravicini & Touyz, 2006; Li et al., 2006; Bevers et al., 2006). Essa redução do NO biologicamente ativo contribuiria para um aumento na expressão da eNOS (Chou et al., 1998; Varizi et al., 2002; Piech et al., 2003). O uso de antioxidantes já demonstrou ser efetivo na redução da pressão arterial do SHR (Schnackenberg et al., 1996; Varizi et al., 2000), bem como da expressão da eNOS (Varizi et al., 2002). Alguns trabalhos também tem demonstrado que os polifenóis, em SHRs, não aumentam a expressão da eNOS, mas reduzem de forma significativa a atividade da NADPH oxidase, favorecendo a redução da pressão arterial e a disfunção endotelial (Sanchez et al., 2006 ;Kubota et al., 2006; Rush et al., 2007; Negish et al., 2007). Nosso trabalho, demonstrou que o ASE tem ação anti-hipertensiva no SHR e promove uma redução significativamente da expressão da eNOS em SHRs tratados com ASE em relação aos não tratados. A

ação do ASE nos SHRs deve envolver não só sua ação vasodilatadora, mas principalmente seu efeito antioxidante. Possivelmente ao reduzir a síntese de ROS, o ASE pode estar favorecendo o acoplamento da eNOS e reduzindo a formação de peroxinitrito, aumentando a disponibilidade de NO. Com o aumento dos níveis de NO pode estar ocorrendo uma redução da expressão da eNOS através de um mecanismo *feedback* negativo. A redução do estresse oxidativo anterior ao início da hipertensão pode ter favorecido a não elevação da pressão arterial dos SHRs quando tratados com ASE a partir do desmame (21 dias de idade).

# *Conclusão*

---



## **Conclusão**

---

- ✓ O extrato hidro-alcoólico de caroço de açaí apresenta um efeito vasodilatador mais potente que os extratos hidro-alcoólicos da casca de açaí e da polpa da fruta.
- ✓ O efeito vasodilatador do ASE é dependente de endotélio com a ativação da via NO/cGMP e a produção de EDHF.
- ✓ Os receptores muscarínicos, histaminérgicos,  $\alpha$ 2- adrenérgicos e da bradicinina não participam do mecanismo de ação do ASE.
- ✓ A PGI<sub>2</sub> parece não ter qualquer participação na resposta vasodilatadora do ASE.
- ✓ Em cultura de células endoteliais de veia umbilical de humano tratadas com ASE houve um aumento significativo na síntese de NO.
- ✓ O ASE apresenta uma ação anti-oxidante.
- ✓ O ASE apresenta um efeito anti-hipertensivo quando foi avaliado nos modelos 2R-1C, DOCA-sal, L-NAME e SHR.
- ✓ A expressão da eNOS é aumentada em ratos Wistar tratados com ASE, mas em SHR tratados com ASE essa expressão é reduzida.
- ✓ A ação anti-hipertensiva do ASE parece estar relacionada com a ação vasodilatadora e anti-oxidante.

- ✓ Nossos estudos pre-clínicos indicam que o ASE poderia ser utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares e na hipertensão.

# *Referências Bibliográficas*

---

## ***Referências Bibliográficas***

---

Aguilar-Byan, L.; Nichols, C.; Wechsler, S.; Clement, J.; Boyd, A.; Gonzales, G.; Herrera-Sosa, H.; Nguy, K.; Nelson, D.A. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. 1995; 268: 423-26.

Alselm, E.; Chataigneau, M.; Ndiaye, M.; Chataigneau, T.; Schini-Kerth, V.B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt- dependent activation of eNOS. *Cardiovasc. Res*. 2007; 73 (2): 404-13.

Amiri, F.; Viridis, A.; Fritsh Neves, M. Myocardis fibrosis in DOCA-salt hypertension rats: effects of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation*. 2004; 110:2233-40.

Baylis, C.; Mitruka, B.; Deng, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest*. 1992; 90(1):278-81.

Benito, S.; Lopez, D.; Saiz, M.P.; Buxaderas, S.; Sanchez, J.; Puig-Parellada, P.; Mitjavila, M.T. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br. J. Pharmacol*. 2002; 135(4):910-6.

Bevers, L.M.; Braam, B.; Post, J.A.; van Zonneveld, A.J.; Rabelink, T.J.; Koomans, H.A.; Verhaar, M.C.; Joles, J.A. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decrease NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2006; 47: 87-94.

Bobbio, F.O., Druzian, J.I., Abrão, P.A., Bobbio, P.A., Fadelli, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2000; 20(3): 388-90.

Bolotina, V.M.; Najibi, S.; Palacino, J.J.; Pagano, P.J.; Cohen, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994; 368 (6474): 850-3.

Bolton, T.B.; Lang, R.J.; Takewaki, T. Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J.Physiol*. 1984; 351: 549-72.

Boo, Y.C.; Jo, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2003; 285: C499 - C508.

Calzavara, B.B.G. As possibilidades do açaízeiro no estuário amazônico. FCAP, Belém. 1972; 103.

Cervenca, L.; Horacek, V.; Vannekova, I.; Hubacek, J.A.; Oliverio, M.L.; Coffman, T.M.; Navar, G. Essential role of AT<sub>1A</sub> receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension*. 2002; 40:735-41.

Chen, G.; Suzuki, H.; Weston, A.H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDHF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 95: 1165-74.

Choquet, D.; Korn, H. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 1992; 217-40.

Chou, T.C.; Yen, M.H.; Li, C.Y.; Ding, Y.A. Alteration of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension rats. *Hypertension*. 1998; 31: 643-8.

Cuman, R.K.N.; Nigro, D.; Carvalho, M.H.C.; Scivoletto, R.; Fortes, Z.B. Influence of hydralazine treatment on the vascular reactivity of DOCA-salt hypertension rats. *Endothelium*. 1994; 2: 105-11.

Das, D.K.; Maulik, N.; Engelman, R.M. Redox regulation of angiotensin II signaling in the heart. *J. Cell Mol. Med.* 2004; 8: 144-52.

De Gennaro, Colonna, V.; Rigamonti, A.; Floretti, S.; Bonomo, S.; Manfredi, B.; Ferrario, P.; Bianchi, M.; Berti, F.; Muller, E.E.; Rossoni, G. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2005;516(3):253-9.

Decker, V.; Persgol, L.; Viens, G.; Athias, A.; Lallemant, C.; Gambert, P.; Lagrost, L. Inhibition of arterial relaxation among components of human low-density lipoproteins. Cholesterol derivatives oxidized in position 7 are potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation. *Circulation.* 1997; 95: 723-31.

Dell'Agli, M.; Busciatá, A.; Bosisio, E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc. Res.* 2004; 63: 593-602.

Dielbalt, M.; Bucher, B.; Andriantsitihaina, R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilation, and induce gene expression. *Hypertension.* 2001; 38: 159-65.

Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R.; Zeiher, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999; 399 (6736): 601-5.

Donogue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosslein, M.; Stagliano, N.; Conavan, M.; Woolf, B.; Robinson, K.; Jeyaseelan, R.; Breibart, R.e.; Acton, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. 2000; Circ. Res. 87(5):E1-9.

Edwards, G.; Weston, A.H. Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarization. Pharmacol. Res. 2004; 49: 535-41.

Elahi, M.M.; Naseem, K.M.; Matata, B.M. Nitric oxide in blood: the nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. FEBS J. 2007; 274: 906-23.

Embrapa - [http://www.embrapa.br/noticias/banco\\_de\\_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra\\_noticia](http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra_noticia), 2004.

Endermann, D.H.; Schiffrin, E.L. Endothelium dysfunction. J.Am.Soc. Nephrol. 2004; 15 (8): 1983-92

Faber, J.E.; Brody, M.J. Central nervous system action of angiotensina during onset of renal hypertension in awake rats. Am. J.Physiol. Heart Circ.Physiol. 1984; 247: H349-H360.



Falkenberg, M.b.; Santos, R.I.; Simões, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; gosmann, g.; Mello, J.C.P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre: UFRGS editora 2003, pp. 237-9.

Féletou, M.; Vanhoutte, P.M. Endothelium–dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 93: 515-24.

Féletou, M.; Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Where are you now? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 1215-25.

Fetalvero, K.M.; Martin, K.A.; Hwa, J. Cardioprotective prostacilin signaling in vascular smooth cell. *Prostaglandins & Others Lipids Mediators.* 2007; 82: 109-18.

Fitzpatrick, D.F, Fleming, R.C., Bing, B., Maggi, D.A., O'Malley, R.M. Isolation and characterization of endothelium–dependent vasorelaxion compounds from grape stones. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 6384-90.

Fleming, I. Cytocrome P450 epoxygenases as EDHF synthase (s). *Pharmacol Res.* 2004; 49: 525-33

Förstermann, U.; Münzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Circulation*, 2006; 113: 1708-14.

Frankel, E.N., Kanmer, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* . 1993; 341:454-7.

Gallori, S., Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Barbosa, W.L.R., Vincieri, F.F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). *Cromatographia*. 2004; 59(11/12): 739-43.

Gasparo, M. Angiotensin and nitric oxide interaction. *Heart Fail. Rev.* 2002; 7: 347-58.

Goldblatt, H.; Lynch, J.; Hanzal, R.F.; Summerville, W.W. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 1934; 59: 347-79.

Gosh, M.; Hanna, S.T.; Wang, R.; McNeil, R. Altered Vascular reactivity and  $K_{ATP}$  channel currents in vascular smooth muscle cells from deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; 44: 525-31.

Griffith, T.M.; Chaytor, A.T.; Edwards, D.H. The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. *Pharmacol. Res.* 2004; 49: 551-64.

Herbert-Carrington, J.R.; Magaldi, J.B.; Prado, J.L. Hipertensão por acetato de deoxicorticosterona em ratos. Efeito da interrupção do tratamento. *Ciência e Cult.* 1949; 2: 282-3.

Jiménez, R.; López-Supulveda, R.; Kadmiri, M.; Romero, M.; Vera, R.; Sanchez, M.; Vargas, F.; O'valle, F.; Zarzuelo, A.; Duenãs, M.; Santos-Buelga, C.; Duarte, J. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43 (3): 462-73.

Kahler, J.; Mendel, S.; Weekmuller, J. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2001; 32: 1429-37.

Kalinowski, L. & Malinski, T. Endothelial NADPH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. *Acta Bioch. Polon.* 2004; 51: 459-69.

Khan, M.T.; Jothianandan, D.; Matsunaga, M.; Furchgott, R.F. Vasodilation induced by acetylcholine and by glycerltrinitrate in rat aortic and mesenteric vasculature. *J.Vasc.Res.* 1992; 29: 20-8.

Kitamoto, S.; Egashira, K.; Kataoka, C.; Usui, M.; Koyanagin, M.; Takemoto, M.; Takeshita, A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via action of angiotensin II. *J Hypertension* 2000;18: 1795-1800.

Kopkan, L.; Majid, D.S.H. Superxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. *Hypertension.* 2005;46:1026-31.

Kubota, Y.; Tanaka, N.; Nakamura, K.; Umegaki,K.; Shinozuka, K. Effects of Ginkgo biloba on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in spontaneously hypertension rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006; 58 (2): 243-9.

Lehoux, S. Redox signilling in vascular responses to shear and stretch. *Cardio. Res.* 2006; 71: 269-79.

Lerman, L.O.; Chade, A.R.; Sica, V.; Napoli, C. Animal models of hypertension: an overview. 2005; 146: 160-73.

Li, H.; Witte, K.; August, M.; Brausch, I.; Gödtel-Armbrust, U.; Habermeier, A.; Closs, E.I.; Oelze, M.; Münzel, T.; Förstermann, U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J.Am.Coll. Cardiol.* 2006; 47 (12): 2536-44.

Li, L.; Watts, S.W.; Banes, A.K.; Galligan, J.J.; Fink, G.D.; Chen, A. F. NADPH-oxidase derived superoxide augments endothelin-1-induced venoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 2003; 42: 316-21.

Lichtenthäler, R; Rodrigues, R.B.; Maia, J.G.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) fruits. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2005; 56(1):53-64.

Linz, W.; Schafer, S.; Afkhan, F.; Gerl, M.; Schmidts, H.L. Vasopeptidases inhibition prevents target organ damage and improves survival in spontaneously hypertensive rats. *JRAAS.* 2006; 7: 155-61.

Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Dusterhoft, T., Baumann, G., Stangl, V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-Kinase,

camp-dependent protein kinase, and Akt-dependent pathway and leads to endothelium dependent vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 6190-5.

Ludmer, PL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315:1046.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 81(suppl): 230S-242S.

Matoba, T.; Shimokawa, H. Hydrogen peroxide is a endothelium-derived hyperpolarization factor in animals and humans. *J. Pharmacol. Sci.* 2003; 92:1-6.

Matsumura, Y.; Kuro, T.; Konishii, F.; Takaoka, M.; Gariépy, C.E.; Yanagisawa, M. Enhanced blood pressure sensitivity to DOCA-salt treatment in endothelin ET<sub>B</sub> receptor-deficient rats. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 129: 1060-62.

Ministério da Saúde -

([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude\\_brasil\\_novembro.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude_brasil_novembro.pdf).) pp5 edição 115, revista saúde Brasil, novembro de 2005,

Moore, P.K.; Al-Swayeh, A.O.; Chong, N.W.S.; Evans, R.A.; Gibson, A. L- $N^G$ -nitro-argini (L-Noarg), a novel , L-arginine-reversible inhibitor of endothelium dependent vasodilation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 99: 408-12.

Morikawa, K.; Fujuki, T.;Matoba, T.; Kubota, H.; Hatonaka, M.; Takahashi, S.; Shimokawa, H. Important role of superoxide dismutase in EDHF-mediated response of human mesenteric arteries. *J. Cardiovasc. Phamacol.* 2004; 44: 552-56.

Münzel, T.; Daibers, A.; Ullrich, V.;Mülsch, A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthases uncoupling for the activity and expression of soluble guanylyl ciclase and cGMP-dependent protein kinase. 2005; 25:1551-57.

Nakano, D.; Ogura, K.; Miyakoshi, M.; Ishii, F.; Kawanishi, H.; Kurumazuka, D.; Kwak, C.J.; Ikemura, K.; Takoaka, M.; Morigushi, S.; Iino, T.; Kusumoto, A.; Asami, S.; Shibata, H.; Kiso, Y.; Matsumura, Y. Antihypertensive effect angiotensine I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006; 70 (5): 1118-26.

Nakashima, M.; Mombouli, J.V.; Taylor, A.A.; Vanhoutte, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin inhuman coronary arteries. *J. Clin. Invest.* 1993; 92 (6): 2867-71.

Ndiaye, M.; Chataigneau, T.; Andriantsitohaina, R.; Stoclet, J.C.; Schini-Kerth, V.B. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 42 (7): 1131-6.

Negish, H.; Xu, J. W.; Ikeda, K.; Njekela, M.; Nara, Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 2004; 134: 38-42.

Noma, K.; Oyama, N.; Liao, J.K. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006; 290: C661-C668

Okakomoto, Y.; Aoki, K. Development of strain of spontaneously hypertensive rat. *Jap. Circ J.* 1963; 27: 282-93.

Okazaki, H.; Minamino, T.; Tsukamoto, O.; Kim, J.; Okada, K.; Myoishi, M.; Wakeno, M.; Takashima, S.; Mochizuki, N.; Kitakase, M. Angiotensin II type receptor blocker prevents atrial structural remodeling in rats with hypertension induced by chronic nitric oxide inhibition. *Hypertens. Res.* 2006; 29: 277-84.



Ozgová, S.; Hermanek, J.; Gut, I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66 (7): 1127-37.

Paravicini, T.M.; Touyz, R.M. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71: 247-58.

Park, J.B.; Schiffrin, E.L. Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone infused rats: role of endothelin-1. *Am.J. Hypert.* 2002; 15: 164-9.

Parkington, H.C.; Coleman, H.A.; Tare, M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol. Res.* 2004; 19: 509-14.

Parsons, S.J.W.; Hill, A.; Waldron, G.L.; Plane, F.; Garland, C.J. The relative importance of nitric oxide and nitric oxide –independent mechanisms in acetylcholine-evoked dilatation of the rat mesenteric bed. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 113: 1275-80.

Piech, A.; Dessy, C.; Havaux, X.; Feron, O.; Balligand, J.L. Differential regulation of nitric oxide and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 2003; 57: 456-67.

Pignatelli, P.; Di Santo, S.; Buchetti, B.; Sanguigni, V.; Brunelli, A.; Violi, F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J.* 2006; 20 (8): 1082-9.

Pinto, Y.M.; Paul, M.; Ganten, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39: 77-88.

Pozo-Isfran, D.D., Brenes, C.H., Talcoot, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 1539-45.

Rabelink, T.J. & Lusher, T.F. Endothelium nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26:267-71.

Rees, D.D.; Palmer, R.M.J.; Hodseon, H.F.; Moncada, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.* 1989; 96: 418-24.

Ribeiro, M.O.; Antunes, E.; de Nucci, G.; Lovisolo, S.M.; Zatz, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992; 20(3):298-303.

Rickitake, Y.; Liao, J.K. Rho GTPases, statins and nitric oxide. *Cir. Res.* 2005; 97: 1232-35.

Rodrigues, B.B; Lichtenthaler, R.; Zimmermann, B.F.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F.; Maia, J.G.; Almeida, O. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *Agric. Food Chem.* 2006; 54 (12): 4162-7.

Rummery, N.M.; Hill, C.E. Vascular gap junctions and implications for hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004; 31: 659-67.

Rush, J.W.; Quadrilatero, J.; Levy, A.S.; Ford, R.J. Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Exp. Biol.Med.(Maywood)*. 2007; 232 (6): 814-22.

Sakuma, I.; Togashi, H.; Yoshioka, M.; Tamura, M.; Kobayashi, T.; Yasuda, H.; Gross, S.S.; Levi, R. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ. Res.* 1992; 70(3):607-11.

Santos, G.B. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.): aspectos químicos e farmacológicos. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2001; 151p.

Sanchez, M. Galisteo, M.; Vera, R.; Villar, I.C.; Zarzueira, A.; Tamargo, J.; Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2006; 24 (1): 75-84.

Sarr, M.; Chataigneau, M.; Martins, S.; Schott, C.; El Bedoui, J.; Oak, M.H.; Muller, B.; Chataigneau, T.; Schini-Kerth, V.B. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71 (4): 794-802.

Sasser, J.M.; Sullivan, J.C.; Elmarakby, A.A.; Kemp, B.E.; Pollock, D.M.; Pollock, J.S. Reduced NOS3 phosphorylation mediates reduced NO/cGMP signaling in mesenteric arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 2004; 43: 1080-85.

Savage, D.; Perkins, J.; Lim, C.H.; Bund, S.J. Functional evidence that K<sup>+</sup> is non-nitric oxide, non-prostanoid endothelium-derived relaxing factor in rat femoral arteries. *Vasc. Pharmacol.* 2003; 40: 23-8.

Scalbert, A., Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 2000; 130: 2073S-2085S.

Schiffrin, E. L. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc. Pharmacol.* 2005; 43: 19-29.

Schimieder, R.E.; Hilger, K.F.; Schlaich, M.P.; Schmidt, B.M.W. Renin angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet.* 2007; 369: 1208-19.

Schini, V.B.; Vanhoute, P.M. Endothelin-1: a potent vasoactive peptide. *Pharmacol. Toxicol.* 1991; 69: 1-7.

Schnackenberg, C.G.; Welch, W.J.; Wilcox, C.S. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension.* 1998; 32: 59-64.

Scotland, R.S.; Madhani, M.; Cauhan, S.; Moncada, S.; Andresen, J.; Nilsson, H.; Hobbs, A.J.; Ahluwalia, A. Investigation of vascular response in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation.* 2005; 111:796-803.

Shan, R. Endothelins in health and disease. *Eur. J.Int.Med.* 2007; 18: 272-82.

Sharifi, A.M.; Akbarloo,N.; Heshmatian, B.; Ziai, A. Alteration of local ACE activity and vascular reponsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Phamacol. Res.* 2003; 47: 201-9.

Shibata, T.; Ogawa, K.; Ito, T.; Hashimoto, H.; Nakagawa, H.; Satake, T. Role of cyclic GMP of canine vascular smooth muscle in relaxation by organic nitrates. *Jpn. Circ. J.* 1986: 50: 1091-99.

Shimokawa, H.; Matoba, T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol. Res.* 2004; 49: 543-49.

Shirokawa, H, Morikawa, K. Hydorgen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J. Mol.Cell. Cardiol.* 2005; 39: 725-32.

Soares de Moura, R., Costa Viana, F.S., Souza, M.A., Kovary, K., Guedes, D.C., Oliveira, E.P., Rubenich, L.M., Carvalho, L.C., Oliveira, R.M., Tano, T., Gusmão Correia, M.L.. Antihypertensive, vasodilator, and antioxidant effects of vinifera grape skin extract. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54: 1515-20.

Soares de Moura, R.; Miranda, D.Z.; Pinto, A.C.A.; Sicca, R.F.; Souza, M.A.V.; Rubenich, L.M.S.; Carvalho, L.C.R.M.; Rangel, B.M.; Tano, T.; Madeira, S.V.F.; Resende, A.C. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; 44 (3): 302-9.

Soares de Moura, R.; Emiliano, A.F.; Carvalho, L.C.R.M.; Souza, M.A.; Guedes, D.C.; Tano, T.; Madeira, S.V.F.; Resende, A.C. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2005; 46(3):288-94.

Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M. Oak, M.H., Bedoui, J.E., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500: 299-313.

Sun, Y.; Ahokas, R.A.; Bhattacharya, S.K.; Gerling, I.V.; Carbone, L.D.; Weber, K.T. Oxidative stress in aldosteronism. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71: 300-9.

Tabet, F.; Savoia, C.; Schiffrin, E.L.; Touyz, R.M. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; 44: 200-8.

Tan, L.B.; Scholoshan, D.; Barker, D. Fiftieth anniversary of aldosterone: from discovery to cardiovascular therapy. *Int. J. Cardiol.* 2004; 96: 321-33.

Tare, M.; Parkington, H.C.; Coleman, H.A.; Neild, T.O.; Dusting, G.J. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature.* 1990. 5: 69-71.

Taubert, D.; Berkels, S.; Klaus, W.; Roesen, R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002; 40 (5): 701-13.

Toba, H.; Nakagawa, Y. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory. *Hypertension Res.* 2005, 28:689-700.

Toda, N.; Ayajiki, K.; Okamura, T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacol. Rev.* 2007; 59:54-87.

Touyz, R.M.; Yao, G.; Viel, E.; Amiri, F.; Schiffrin, E.L. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* 2004; 22: 1141-



Ulker, S.; McMaster, D.; McKeown, P.P.; Bayraktutan, U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59 (2): 488-500.

Vanhoutte, P.M.; Mombouli, J.V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1996; 39: 229-38.

Vaziri, N.D.; Ni, Z.; Oveisi, F.; Trnavsky-Hobbs, D.L. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 36: 957-64.

Vaziri, N.D.; Wang, X.Q.; Ni, Z.N.; Kivlinghn, S.; Shahinfar, S. Effect of aging and AT-1 receptor blockage on NO synthase expression and renal function in SHR. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1592: 153-61.

Vita, J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 81 (Suppl.): 292S-7S.

Wada, T.; Kanagawa, R.; Ishumura, Y.; Inada, Y.; Nishikawa, K. Role of angiotensin II in cerebrovascular and renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens.* 1995; 13 (1): 113-22.

Waldman, S.A.; Murad, F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.* 1987; 39:163-96.

Wale, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M.H.; Oatia, J.E.; Walle, U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 2004; 32: 1377-82.

Walford, G. & Loscalzo, J. Nitric oxide in vascular biology. *J.Thromb. Haemot.* 2003; 1: 2112-18.

Welch, W.J.; Mendonça, M.; Aslam, S.; Wilcox, C.S. Role oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxyntionin the postclipped 2K-1C kidney. *Hypertension.* 2003; 41: 692-6.

Wenzel, E.; Somoza, V.. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49(5):472-81.

Wei, I.H.; Wu, Y.C.; Wen, C.Y.; Shich, J.Y. Green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate attenuates the neuronal NADPH-d/nNOS expression in the nodose ganglion of acute hypoxic rats. *Brain Res.* 2004; 999 (1): 73-80.

WHO

[http://www.wrongdiagnosis.com/h/hypertension/stats.htm#medical\\_stats](http://www.wrongdiagnosis.com/h/hypertension/stats.htm#medical_stats), 2002-2003.

Wong, P.C.; Zimmerman, B.G. Dependent of renal vasodilator effect of catopril on prevailing plasma rennin in the dog: influence of DOCA-salt treatment. Clin. Sci. (Lond). 1982; 63: 355-60.

Wu, R.; Millete, E.; Wu, L.; de Champlain, J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. J. Hypertension. 2001; 19: 741-48.

Yang, D.; Levens, N.; Zhang, J.N.; Vanhoute, P.M.; Félétou, M. Specific potentiation of endothelium-dependent contractions in SHR by tetrahydrobiopterin. Hypertension. 2003; 41: 136-42.

Yetic-Anacak, G. & Catravas, J.D. Nitric oxide and endothelium: history and impact on cardiovascular disease. Vasc. Pharmacol. 2006; 45: 268-76.

Ying, C.J.; Sun, X.F.; Zhang, S.L.; Mao, L.M.; Zuo, X.Z.; Yao, P. ROS-related enzyme expression in endothelial cells regulated by tea polyphenols. Biomed. Environ. Sci. 2004; 17 (1): 33-9.

Yu, M.; Gopalakrishnan, V.; McNeill, R. Role of endothelin and vasopressin in DOCA-salt hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 132: 1447-54.

Zanchi, A.; Schaad, N.C.; Osterheld, M.C.; Grouzmann, E.; Nusseberger, J.; Brunner, H.N.; Waeber, B. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am. J. Physiol.* 1995; 268:H2267-H2273.

Zern, T.L.; Fernandez, M.L. Cardioprotective effect of dietary polyphenols. *J.Nutr.* 2005; 135: 2291-4.

Zhang, Y.; Tazzeo, T.; Chu, V.; Janssen, L.J. Membrane potassium current in human radial artery and their regulation by nitric oxide donor. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71:383-92.

## Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat

A.P.M. Rocha<sup>a</sup>, L.C.R.M. Carvalho<sup>a</sup>, M.A.V. Sousa<sup>a</sup>, S.V.F. Madeira<sup>c</sup>, P.J.C. Sousa<sup>b</sup>,  
T. Tano<sup>a</sup>, V.B. Schini-Kerth<sup>c</sup>, A.C. Resende<sup>a</sup>, R. Soares de Moura<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Psychobiology, IBRAG, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, UFPA, Belém, Brazil

<sup>c</sup> UMR CNRS 7175, Pharmacologie et Physico-Chimie, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Illkirch, France

Received 5 September 2005; received in revised form 16 May 2006; accepted 1 August 2006

### Abstract

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) a fruit from the Amazon region, largely consumed in Brazil is rich in polyphenols. Experiments were undertaken to determine whether hydro-alcoholic extract obtained from stone of açaí induces a vasodilator effect in the rat mesenteric vascular bed precontracted with norepinephrine (NE) and, if so, to elucidate the underlying mechanism. Açaí stone extract (ASE, 0.3–100 µg) induced a long-lasting endothelium-dependent vasodilation that was significantly reduced by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and [<sup>3</sup>H]-[1,2,3] oxadiazolo [4,4-a] quinoxalin-L-one (ODQ) and abolished by KCl (45 mM) plus L-NAME. In vessels precontracted with NE and KCl (45 mM) or treated with K<sub>Ca</sub><sup>2+</sup> channel blockers (charybdotoxin plus apamin), the effect of ASE was significantly reduced. However this effect is not affected by indomethacin, glybenclamide and 4-aminopyridine. Atropine, pyrilamine, yohimbine and HOE 140 significantly reduced the vasodilator effect of acetylcholine, histamine, clonidine and bradykinin, respectively, but did not change the vasodilator effect of ASE. In cultured endothelial cells ASE (100 µg/mL) induced the formation of NO that was reduced by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NA, 100 µM). The present study demonstrates that the vasodilator effect of ASE is dependent on activation of NO-cGMP pathway and may also involve endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) release. The vasodilator effect suggest a possibility to use ASE as a medicinal plant, in the treatment of cardiovascular diseases.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Açaí; *Euterpe oleracea* Mart.; Vasodilation; EDHF; NO

### 1. Introduction

The plant *Euterpe oleracea* Mart. also known by the popular name of açaí, is widely diffused in Amazon region especially in the Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá states of Brazil. The skins of the fruits of açaí are commonly used to make juice, ice-cream, sweets, and is largely consumed in Brazil. Approximately 10,000 ton of frozen aqueous extract are consumed in Brazil and 1,000 ton are exported to many

countries, as Japan, United States, Netherlands and Italy (Embrapa, 2004). Chemical studies have shown that açaí is rich in anthocyanic compounds (cyanidin 3-*O*-arabinoside, cyanidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-rutinoside) and other polyphenols as epicatechine, catechine homoorientin, orientin, isovitexin and taxifolin deoxyhexose (Bobbio et al., 2000; Pozo-Isfran et al., 2004; Gallori et al., 2004). Many evidences suggest that diet rich in polyphenols might be involved in protection against cardiovascular risk (Stoclet et al., 2004). This beneficial effect of polyphenols may be due to many actions as antioxidant (Frankel et al., 1993) that increases bioavailability of nitric oxide (Fitzpatrick et al., 2000), vasodilation (Fitzpatrick et al., 2000) or antihypertensive (Soares de Moura et al., 2002a,b, 2004) properties. Therefore, experiments were undertaken to determine whether extracts obtained from fruits of açaí induce a

\* Corresponding author. Department of Pharmacology and Psychobiology, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87, Rio de Janeiro — R.J. 20551-030, Brazil. Tel.: +55 21 2587 6399; fax: +55 21 2587 6808.

E-mail address: [demoura@uerj.br](mailto:demoura@uerj.br) (R. Soares de Moura).

vasodilator effect in the rat mesenteric vascular bed (MVB) and, if so, to elucidate the underlying mechanism.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of extracts

*Euterpe oleracea* Mart. fruits were obtained from the Amazon Bay (Pará State, Brazil). Three extracts were studied. A frozen aqueous extract used to make juice, ice cream and other beverages was obtained from food stores. Shortly this extract (prepared in the North of Brazil) is obtained adding a certain amount of water to the fruits and then minced with rotatory spatula in order to separate the stones which are discharged. Once obtained, the concentrated aqueous extract of the skins is frozen until use for preparation of the beverages. Once in our laboratory, the aqueous extract was filtered through a Whatman n°. 1 filter paper, evaporated at low pressure until reduction of approximately 50% of the original volume and then lyophilized and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Hydro-alcoholic extracts were obtained from decoction of skins or stones of the fruits. Fruits were washed in tap water and the skins were separated from the stones. Approximately 100 g of skins or 200 g of stones of açai were boiled in 400 ml of water for 5 min, grinded for 2 min and then boiled again for another 5 min. The decoction was allowed to cool at room temperature, extracted with 400 of ethanol, shaken for 2 h and then kept in dark bottles inside a refrigerator ( $4^{\circ}\text{C}$ ) for 10 days. After maceration period, the hydro-alcoholic extracts of açai were filtered through Whatman n°. 1 filter paper and the ethanol was evaporated under low pressure at  $55^{\circ}\text{C}$ . The extracts were then lyophilized and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The concentration of polyphenols in açai stone extract (ASE) and açai skin extract, measured by analysing for total phenol by the Folin–Ciocalteu procedure (Singleton and Rossi, 1965) were 25 and 18%, respectively. Usually 100 g of stones or skins yields, respectively, 5 g and 3.2 g of lyophilized extract.

### 2.2. Isolated mesenteric vascular bed

All experiments were reviewed and approved by the Ethics Committee of Animal Experiments of the State University of Rio de Janeiro. Male Wistar rats were killed with inhaled  $\text{CO}_2$  and the superior mesenteric vascular bed (MVB) was cannulated (McGregor, 1965) and perfused at a flow rate of  $4\text{ ml min}^{-1}$  with a physiological salt solution (PSS) by pulsatile pump (Lifecare Model 4, Abbott Shaw). The PSS had the following composition (mM): NaCl 118, KCl 4.7,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25, EDTA 0.02, and glucose 11. The PSS ( $37^{\circ}\text{C}$ ) was bubbled with 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ . Perfusion pressure (PP) was measured with transducer connected to a preamplifier and chart recorded. Drugs were either dissolved in PSS and perfused at the desired concentration, or were administered as bolus injections directly into the perfusion stream (volume  $<300\ \mu\text{l}$ ).

The preparations were left to equilibrate for 30 min, and then injections of  $120\ \mu\text{mol}$  KCl, were administered every 10 min until consistent responses were obtained. The basal PP after the equilibration period was  $24.8 \pm 1\ \text{mmHg}$  ( $n = 164$ ). Different doses

of extracts ( $0.1$ – $3000\ \mu\text{g}$ ) were injected after the PP had been elevated ( $80$ – $100\ \text{mmHg}$ ) with norepinephrine (NE;  $6$ – $30\ \mu\text{M}$ ) or phenylephrine (PE;  $30\ \mu\text{M}$ ) added to the perfusion fluid. Acetylcholine (ACh;  $10\ \text{pmol}$ ) and nitroglycerin (NG;  $1\ \text{nmol}$ ) were also injected to test the endothelium-dependent and -independent responses before dose-responses curves to different extracts (açai stone extract (ASE), açai skin extract and aqueous extract of the hole fruit) were obtained. As ASE showed the most potent vasodilator effect comparing to açai skin extract and aqueous extract, pharmacodynamic study were performed only with ASE.

The vasodilator effect of ASE, ACh and NG were studied after perfusion with deoxycholic acid ( $2.5\ \text{mM}$ ) dissolved in PSS for 3 min to chemically remove the endothelium or after perfusion with  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME,  $0.3\ \text{mM}$ ), an inhibitor of NO-synthase, 1H-[1,2,3] oxadiazolo [4,4-a] quinoxalin-L-one (ODQ;  $10\ \mu\text{M}$ ), an inhibitor of guanylyl cyclase (GC), charybdotoxin (ChTx;  $0.1\ \mu\text{M}$ ) plus apamin ( $0.1\ \mu\text{M}$ ), inhibitors of  $\text{K}_{\text{Ca}}^{2+}$  channel. In addition, the vasodilator effect of ASE, ACh

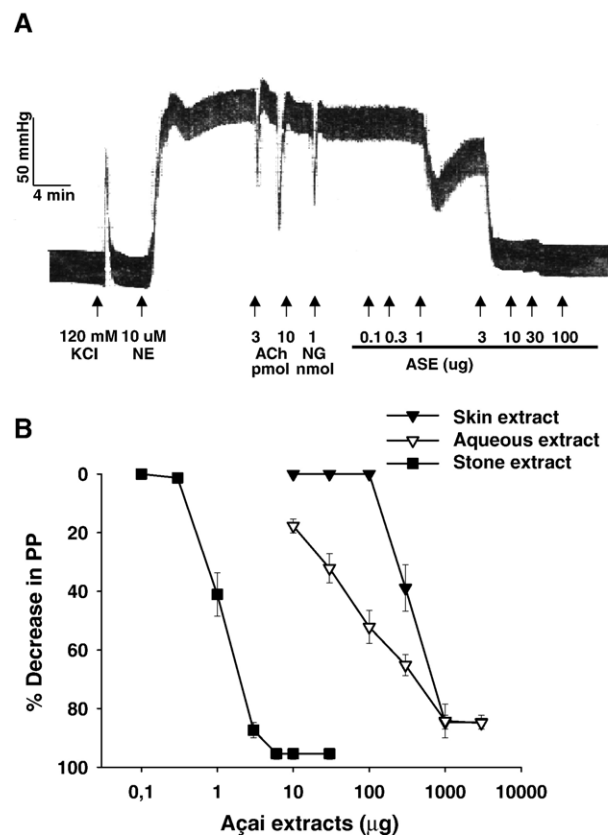


Fig. 1. Vasodilation effect of *Euterpe oleracea* Mart. extract in MVB of the rat. The MVB were pre-contract with NE ( $10\ \mu\text{M}$ ) added to the perfusion fluid. Acetylcholine (ACh;  $10\ \text{pmol}$ ) and nitroglycerin ( $1\ \text{nmol}$ ) were also injected to test the endothelium-dependent and independent responses before dose-responses curves to extracts were obtained. A. Trace illustrates the response of ASE. Arrows indicate injections of ACh ( $3$  and  $10\ \text{pmol}$ ), NG ( $1\ \text{nmol}$ ) and ASE ( $0.1$  to  $100\ \mu\text{g}$ ). B. Vasodilation effect of extracts obtained from stones, skins and fruits in MVB. Different doses of the extract were injected in bolus: stones ( $0.1$ – $100\ \mu\text{g}$ ), skins ( $10$ – $1000\ \mu\text{g}$ ) and aqueous ( $10$ – $3000\ \mu\text{g}$ ). Each line is presented as mean  $\pm$  SEM.  $n = 6$  rats/group.

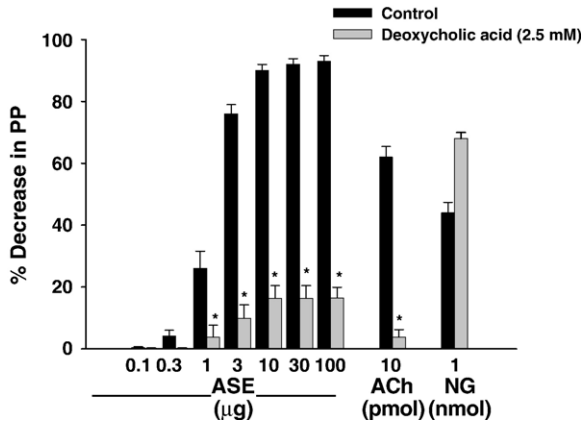


Fig. 2. Effect of endothelial removal by deoxycholic acid on the vasodilator effects induced by ASE, ACh, and NG in vessels precontracted with NE. Ordinate: vasodilation (%), expressed as a percentage decrease of the vasoconstriction induced by NE. Abcissa: doses of ASE, ACh, or NG. Each bar is presented as mean±SEM. n=6 rats/group. \*Significantly different from the corresponding control group (p<0.05).

and NG was studied in vessels perfused with high K<sup>+</sup> solution (45 mM) or in vessels perfused with L-NAME (0.3 mM) plus high K<sup>+</sup> solution (45 mM).

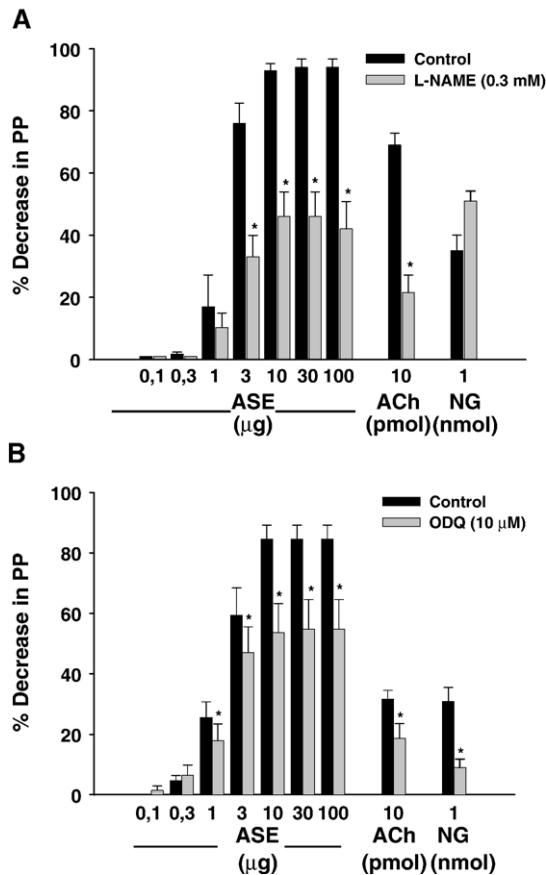


Fig. 3. Effects of L-NAME (A) and ODQ (B) on the vasodilator effects induced by ASE, ACh, and NG in the MVB precontracted with NE. Ordinate: vasodilation (%), expressed as a percentage decrease of the vasoconstriction induced by NE. Abcissa: doses of ASE, ACh, or NG. Each bar is presented as mean±SEM. n=6–7 rats/group. \*Significantly different from the corresponding control group (p<0.05).

The vasodilator effects of ASE were also studied after perfusion with glibenclamide (1 µM), an inhibitor of the ATP-dependent K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channel; indomethacin (0.1 µM), an inhibitor of cyclooxygenase; 4-aminopyridine (1 mM), an inhibitor of the voltage-dependent K<sup>+</sup> (K<sub>v</sub>) channel; and pyrilamine (1 µM), atropine (0.03 µM); yohimbine (3 µM) and HOE-140 (0.01 µM) that significantly inhibited the vasodilator responses of histamine, ACh, clonidine and bradykinin (BK), respectively.

The concentrations of NE or PE were adjusted to maintain the same increase in PP in vessels pretreated with deoxycholic acid, L-NAME, indomethacin, or yohimbine, respectively.

As the ASE induced a long-lasting inhibitory effect on NE constrictor effect, only one dose-response curve were obtained in each vascular bed preparation. Control dose-response curves for ASE were obtained interspersed concurrently with drug-treated vessels, which prevented all the controls from being run on a single group of animals at one time during the course of the investigation.

### 2.3. Determination of NO formation in endothelial cells by electron spin resonance spectroscopy

Determination of NO formation was assessed by electron spin resonance spectroscopy (ESR) after formation of [Fe(II)NO

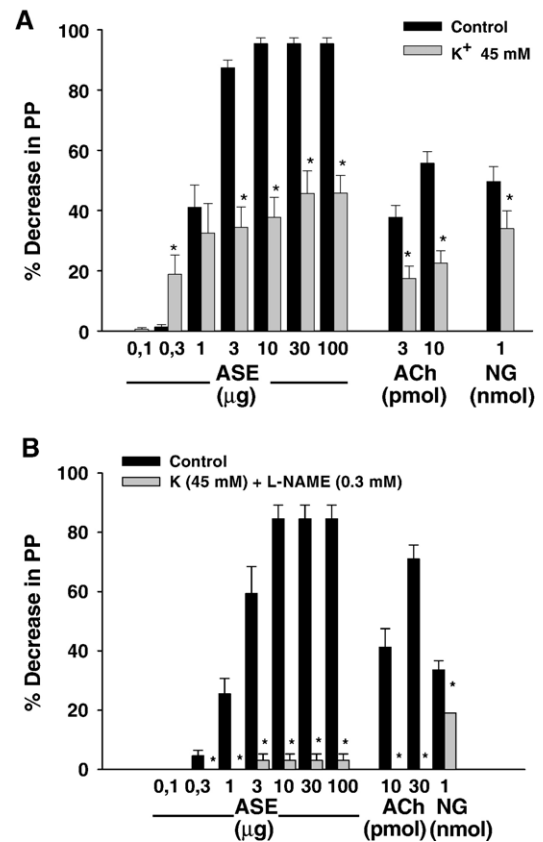


Fig. 4. Effects of high K<sup>+</sup> solution (A) and high K<sup>+</sup> plus L-NAME (B) on the vasodilator effects induced by ASE, ACh, and NG in the MVB precontracted with NE. Ordinate: vasodilation (%), expressed as a percentage decrease of the vasoconstriction induced by NE. Abcissa: doses of ASE, ACh, or NG. Each bar is presented as mean±SEM. n=6–7 rats/group. \*Significantly different from the corresponding control group (p<0.05).

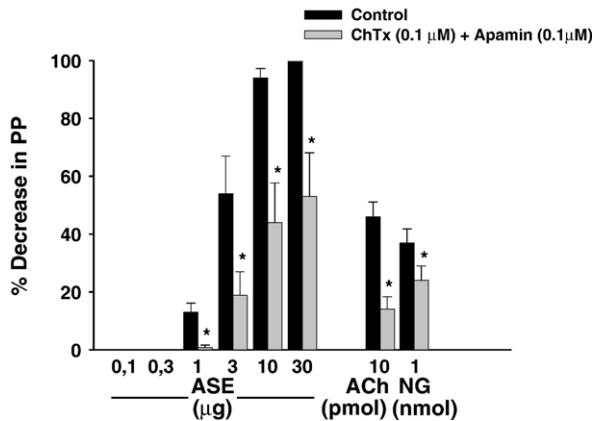


Fig. 5. Effects of ChTx plus apamin on the vasodilator effects induced by ASE, ACh, and NG in the MVB precontracted with NE. Ordinate: vasodilation (%), expressed as a percentage decrease of the vasoconstriction induced by NE. Abscissa: doses of ASE, ACh, or NG. Each bar is presented as mean  $\pm$  SEM.  $n=6$  rats/group. \*Significantly different from the corresponding control group ( $p < 0.05$ ).

## 2.5. Drugs

The following compounds were used: NE, PE, ACh, histamine, BK, L-NA, L-NAME, HOE-140, yohimbine, atropine, ChTx, apamin, indomethacin, deoxycholic acid, and glibenclamide were purchased from Sigma (St. Louis, MO; USA). ODC

(DETC)<sub>2</sub>], a paramagnetic diethyldithiocarbamate iron complex with NO, in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The ESR methodology was used as reported previously with minor modifications (Vanin, 1999; Kleschyov and Munzel, 2002). Confluent cultures of HUVECs (first passage) were washed twice with Hanks balanced salt solution (HBSS) buffered with 10 mmol/L HEPES, and then incubated in a HBSS-HEPES solution in the presence of bovin serum albumin (20.5 mg/mL), 1.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mmol/L L-arginine for 15 min at 37 °C. In some experiments HUVECs were treated with N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NA, 100 µM) for 30 min before addition of spin trap chemicals FeSO<sub>4</sub> (0.8 mmol/L) and DETC (1.6 mmol/L) at a final concentration of 0.2 mmol/L. After 5 min, the endothelial formation of NO was induced by addition of ASE (0.1–100 µg/mL) for 30 min. Thereafter, dishes were placed on ice, and the incubation medium was removed before addition of 0.3 mL of the HBSS-HEPES buffer. Cells were then scraped and the cell suspension was collected in a calibrated tube. Tubes were rapidly frozen at 77 K for ESR measurements. ESR measurements were performed on an MS100 spectrometer (Magnetech Ltd., Berlin, Germany) under the following conditions: temperature 77 K, microwave frequency 9.34 GHz, microwave power 20 mW, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 1 mT. The third component of the ESR signal was used for relative comparison of the concentration of NO trapped in each sample.

## 2.4. Statistical analysis

The vasodilator effect of all the drugs was expressed as the percentage decrease on the increase in PP induced by NE or PE. The dose of the extracts producing a half maximal relaxation amplitude (ED<sub>50</sub>) was determined after log transformation of the normalized dose-response curves and is reported as the mean with 95% confidence interval by the use of the Prism GraphPad 4.04 software (San Diego, CA). All results are presented as mean  $\pm$  SEM for the numbers of rats. The Student unpaired t test was used for statistical analysis. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

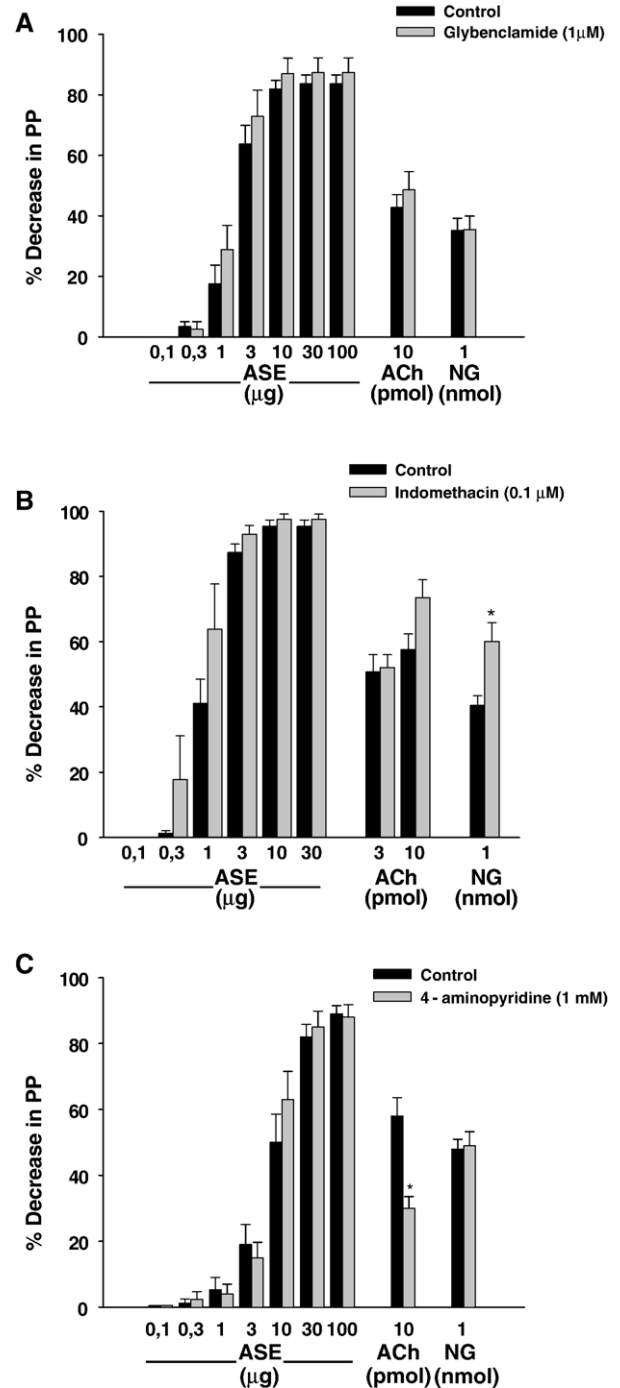


Fig. 6. Effects of glybenclamide (A), indomethacin (B) and 4-aminopyridine (C) on the vasodilator effects induced by ASE, ACh, and NG in the MVB precontracted with NE. Ordinate: vasodilation (%), expressed as a percentage decrease of the vasoconstriction induced by NE. Abscissa: doses of ASE, ACh, or NG. Each bar is presented as mean  $\pm$  SEM.  $n=6$  rats/group. \*Significantly different from the corresponding control group ( $p < 0.05$ ).



was purchased from Tocris (Ellisville, MO). NG and clonidine were a gift from Innovatec-Divisão Cristalia Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brazil and Boehring Ingelheim Química Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brazil, respectively. All drug solutions were freshly prepared before each experiment.

### 3. Results

#### 3.1. Effects of açai stones extract (ASE), açai skin extract and aqueous extract in the mesenteric vascular bed of the rat

In vessels precontracted with NE, bolus injection of ACh (30 pmol) and NG (1 nmol) induced rapid and transient decrease of PP. All three extracts of açai (0.1–3000 µg) induced a dose-dependent, sustained and long-lasting (more than 1 h) vasodilator effect (Fig. 1). The maximal response was similar between the three extracts. However, the vasodilator response of ASE was more potent ( $ED_{50}=1.11$  µg;  $CI=0.99$  to 1.26) than those obtained by the skin extracts ( $ED_{50}=317.8$  µg;  $CI=246.2$  to 410.2) and aqueous extract ( $ED_{50}=77.6$  µg;  $CI=15.36$  to 392.1) in the MVB of rat ( $p<0.05$ ). Therefore the underline mechanism of vasodilator effect of ASE was studied.

#### 3.2. Action of deoxycholic acid on the vasodilator effect of ASE in the mesenteric vascular bed of the rat

In vessels precontracted with NE (control group,  $n=6$ ), bolus injections of ACh (10 pmol) and NG (1 nmol) induced rapid and transient decrease in PP and ASE induced a dose-dependent, sustained and long lasting (more than 1 h) vasodilator effect (Fig. 1). In separated experiment after vasodilator effect of ACh and NG were demonstrated, the vessels were treated with deoxycholic acid ( $n=6$ ) and bolus injection of ACh, NG and ASE were performed. Under those conditions, the vasodilator effect of ACh and ASE (30 µg:  $90\pm 2\%$  (control) vs  $16.3\pm 4\%$  (deoxycholic acid),  $p<0.05$ ) were significantly inhibited, while the effect of NG was not reduced (Fig. 2).

#### 3.3. Actions of L-NAME, ODQ, high $K^+$ , ChTx plus Apamin and KCl (45 mM) plus L-NAME on the vasodilator effect of ASE in the mesenteric vascular bed of the rat

In vessels precontracted with NE (control group), the vasodilator effect of ACh, NG and ASE were studied. In MVB precontracted with NE and perfused with L-NAME (0.3 mM,  $n=6$ ), the vasodilator effects ACh (10 pmol) and ASE (30 µg,  $94\pm 3$  (control) vs  $46\pm 8\%$ ,  $p<0.05$ ) were significantly reduced, while the vasodilator response to NG (1 nmol) was not modified (Fig. 3A). In separate experiments and after the control responses to ACh, NG and ASE, pre-treatment of the vessels with ODQ (10 µM,  $n=6$ ) significantly reduced the vasodilator effects of ASE (30 µg:  $84\pm 5$  (control) vs  $54.7\pm 9\%$  (ODQ),  $p<0.05$ ), ACh and NG (Fig. 3B).

In MVB precontracted with NE and perfused with high  $K^+$  (45 mM,  $n=6$ ), the vasodilator effects of ACh (10 pmol), NG (1 nmol) and ASE (30 µg:  $95.4\pm 2\%$  (control) vs  $45.7\pm 7\%$  ( $K^+$ )  $p<0.05$ ), were significantly reduced (Fig. 4A). The addition of

L-NAME to the PSS containing high  $K^+$  (45 mM) almost abolished the response to ASE (30 µg:  $84.6\pm 4\%$  (control) vs  $3.1\pm 2\%$  (L-NAME+ $K^+$ )  $p<0.05$ , Fig. 4B). In vessels precontracted with NE ( $n=6$ ), the vasodilator effect of ASE (30 µg:  $100\pm 0\%$  (control) was significantly reduced by ChTx (0.1 µM) plus apamin (0.1 µM) ( $53\pm 15\%$ ),  $p<0.05$ ) as well as the responses to ACh and NG (Fig. 5).

#### 3.4. Actions of glibenclamide, indomethacin and 4-aminopyridine on the vasodilator effect of ASE in the mesenteric vascular bed of the rat

In vessels precontracted with NE the vasodilator effect of ACh, NG and ASE were evaluated (control group). In separated experiments and after the control responses to ACh and NG were demonstrated the vessels were treated with glibenclamide (1 µM,  $n=6$ ), indomethacin (0.1 µM,  $n=6$ ) or 4-aminopyridine (4-AP, 1 mM,  $n=6$ ), and the vasodilator effects of ACh, NG and ASE were studied. Under this condition the vasodilator effect of ASE (30 µg) was not significantly reduced by glibenclamide ( $83.7\pm 3\%$  (control) vs  $87\pm 5\%$ ), indomethacin ( $95.4\pm 2\%$  (control) vs  $94\pm 2\%$ ) or 4-aminopyridine ( $82\pm 4\%$  (control) vs  $85\pm 4\%$ ) (Fig. 6).

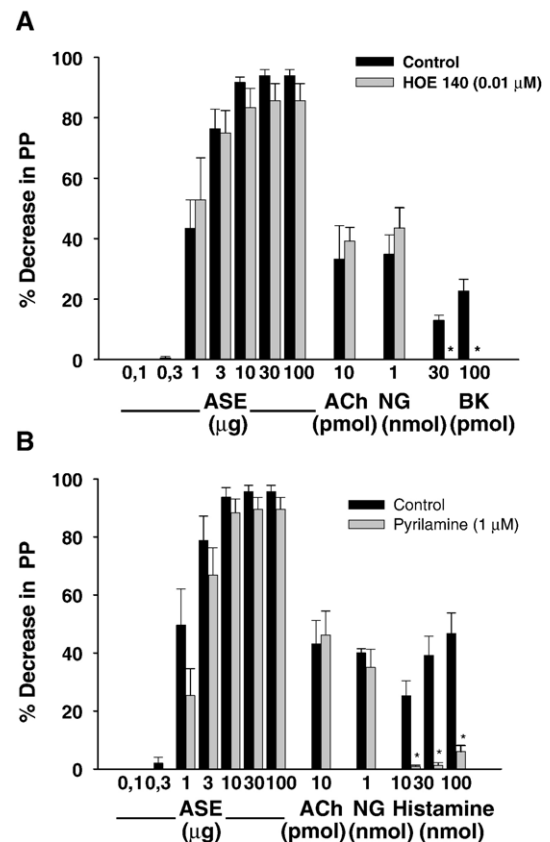


Fig. 7. Effects of HOE 140 (A) and pyrilamide (B) on the vasodilator effects induced by ASE, ACh, and NG in the MVB precontracted with NE. Ordinate: vasodilation (%), expressed as a percentage decrease of the vasoconstriction induced by norepinephrine. Abcissa: doses of ASE, ACh, or NG. Each bar is presented as mean  $\pm$  SEM.  $n=6$  rats/group. \*Significantly different from the corresponding control group ( $p<0.05$ ).

### 3.5. Actions of HOE-140, pyrilamine, atropine and yohimbine on the vasodilator effects of ASE in mesenteric vascular bed of the rat

In vessels precontracted with NE, the vasodilator effects of ACh, bradykinin, histamine, NG and ASE were studied (control group). In separated experiments the vessels were treated with atropine (0.03  $\mu$ M,  $n=6$ ), HOE-140 (0.01  $\mu$ M,  $n=6$ ) or pyrilamine (1  $\mu$ M,  $n=6$ ) and the vasodilator effects of ASE, ACh, BK or histamine were studied. Under these conditions the vasodilator effects of NG and ASE (30  $\mu$ g:  $93.9 \pm 2$  vs  $85.7 \pm 5\%$  with and without HOE140, respectively;  $95.6 \pm 2$  vs  $89.6 \pm 4\%$  with or without pyrilamine, respectively;  $95.4 \pm 2$  vs  $92.6 \pm 4\%$  with or without atropine, respectively) were not significantly reduced but the vasodilator effects of ACh, BK or histamine, were significantly inhibited by atropine, HOE-140 or pyrilamine, respectively. In vessels precontracted with PE (30  $\mu$ M), the vasodilator effects of ACh, NG, clonidine and ASE were studied (control group). In other group of experiments the vessels were treated with yohimbine (3  $\mu$ M,  $n=6$ ) and the vasodilator effects of ACh, NG, clonidine, and ASE were evaluated. Under this condition the effects of ACh, NG and ASE (30  $\mu$ g:  $95.4 \pm 2\%$  (control) vs  $95 \pm 2\%$  (yohimbine) were

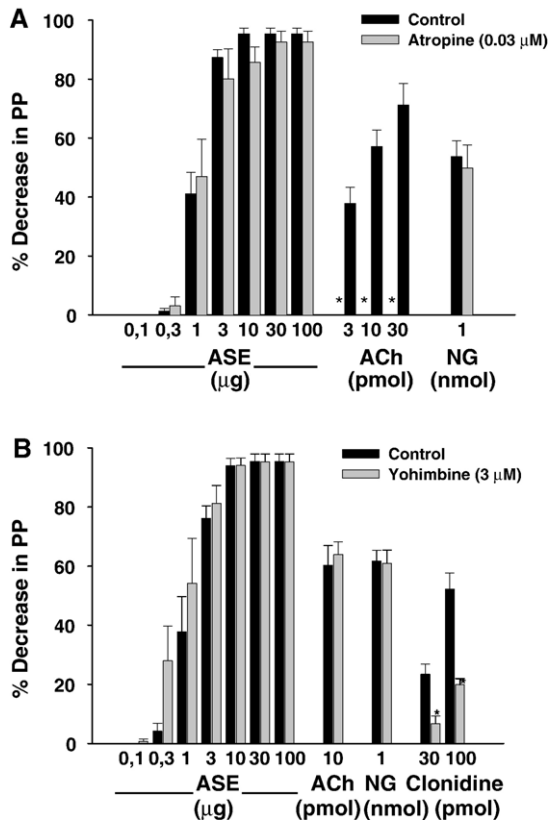


Fig. 8. Effects of atropine (A) and yohimbine (B) on the vasodilator effects induced by ASE, ACh, and NG in the MVB precontracted with NE or PE, respectively. Ordinate: vasodilation (%), expressed as a percentage decrease of the vasoconstriction induced by norepinephrine or phenylephrine. Abcissa: doses of ASE, ACh, or NG. Each bar is presented as mean  $\pm$  SEM.  $n=6$  rats/group. \*Significantly different from the corresponding control group ( $p<0.05$ ).

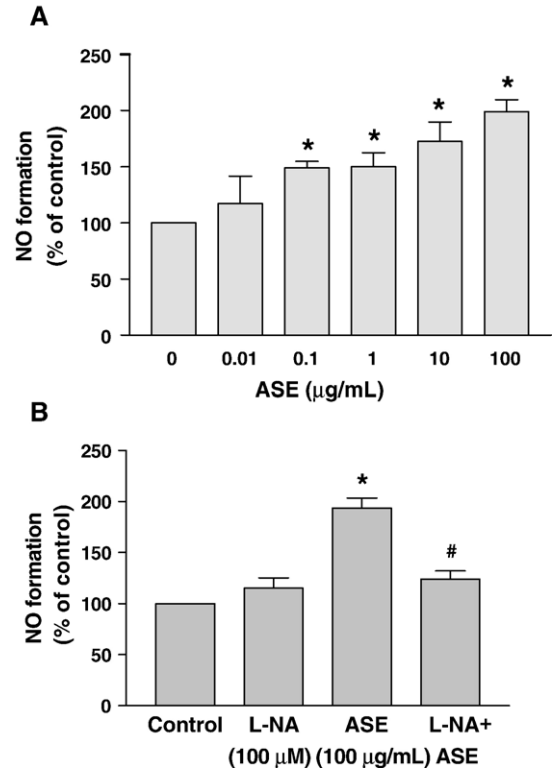


Fig. 9. Formation of NO induced by ASE (0.01–100  $\mu$ g/mL) in HUVECs (A) and the effect of L-NA (100  $\mu$ M) on NO formation induced by ASE (100  $\mu$ g/mL). Each bar is presented as mean  $\pm$  SEM.  $n=5$  experiments. \*Significantly different from the corresponding control ( $p<0.05$ ).

not significantly reduced but the vasodilator effect of clonidine was significantly inhibited by yohimbine (Figs. 7 and 8).

### 3.6. Effect of ASE on the endothelial formation of NO

In HUVECs, ASE induced the formation of NO in a dose-dependent manner (Fig. 9A). Treatment of endothelial cells with L-NA (100  $\mu$ M) significantly ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) reduced the formation of NO induced by ASE (100  $\mu$ g/mL), while L-NA alone did not modify the basal formation of NO (Fig. 9).

## 4. Discussion

The present study has demonstrated for the first time that the three extracts of açai exerted dose-dependent sustained vasodilator effects on the MVB of the rat. The magnitude of the vasodilator effects induced by aqueous and hydro-alcoholic extracts of fruits of açai, demonstrated in the present study were similar to that of ACh and NG, delineating the importance of the present findings. Differently from ACh and NG, that induce a reversible vasodilatation, the vasodilator effect of açai extracts is long lasting suggesting a pharmacodynamic difference among those vasodilators. The amplitude of vasodilator effects of the three extracts were similar, however, ED<sub>50</sub> of ASE was significantly smaller than the other two extracts suggesting that compounds that induce vasodilation are more concentrated in the stone of açai. Therefore, ethanol plus water seems to be more

effective than water in the extraction of the active vasodilator principles occurring in the fruits of açaí. It is important to recall that açaí fruits are rich in polyphenols, compounds that have a significant vasodilator effect *in vitro* (Stoclet et al., 2004). The difference in vasodilator activity observed in this work might be due to different concentration of polyphenols in the extracts since the present study demonstrated that the concentration of total polyphenols in ASE is higher than in extract obtained from the skins. As ASE was the most potent of the three extracts, all the protocols to study the mechanism of the vasodilator effect were performed with ASE.

The mechanism of the vasodilator effect of ASE is not known, but the possibility of this effect being modulated by endothelial cells has to be considered, since chemical elimination of endothelial cells with deoxycholic acid significantly reduced its vasodilator effect. The use of deoxycholic acid to remove the endothelial cell layer suggested that the vasodilator effect of hydro-alcoholic extract of açaí stone is endothelium-dependent. The vasodilator effect of ACh was also significantly inhibited after deoxycholic acid treatment. This endothelium-dependency is consistent with previous studies using ACh in this preparation (Moore et al., 1990; Parsons et al., 1994). Importantly, within this experimental protocol there appeared to be little or no disruption of the smooth muscle of the vascular bed by a detergent action of deoxycholic acid, since the vasodilator response to NG, which occurs via an endothelium-independent elevation of intracellular cGMP in the mesenteric vasculature (Shibata et al., 1986; Khan et al., 1992), remained unaltered. Thus damage of the vascular preparation as a possible explanation for the reduction of the ASE vasodilator effect after deoxycholic acid treatment appeared unlikely from the present findings.

The vasodilator effect of ASE in the rat MVB might be due to the release of vasodilator autacoids by the endothelial cells, such as prostacyclin, since its stable synthetic analogue iloprost has been shown to elicit vasodilation of the rat mesenteric vascular bed (Yamawaki et al., 2000) and NE has been reported to release prostacyclin in this preparation (Peredo and Adler-Graschinsky, 2000). However in the present study we found that the cyclooxygenase blocker indomethacin did not alter the vasodilator effect of ASE and thus the current data appeared to exclude the involvement of prostaglandins in its mechanism of action.

EDRF can be released from endothelial cells by activation of many receptors (Vanhoutte, 1999). The endothelium-dependent vasodilator effect of ASE is independent on stimulation of muscarinic, histaminergic,  $\alpha_2$  adrenoceptors or bradykinin receptors at the level of endothelial cells since treatment with atropine, pyrilamine, yohimbine or HOE 140, compounds that inhibit the EDRF release from the endothelium cells induced by ACh, histamine, epinephrine or bradykinin, did not reduce the vasodilator effect of ASE.

The vasodilator effects of ASE and ACh but not NG an endothelium-independent vasodilator, were significantly reduced by L-NAME, an inhibitor of NO-synthase (Rees et al., 1989) suggesting that NO, a modulator of vascular function (Vanhoutte and Mombouli, 1996) plays an important role in the vasodilator effect of ASE in the MVB of the rat. This hypothesis is corroborated by the present findings that indicating that ASE

stimulated the formation of NO in endothelial cells, an effect which is abolished by inhibition of NO synthase by L-NA. The vasorelaxation induced by NO is dependent on a reduction of the intracellular calcium due not only to activation of soluble guanylate cyclase (Waldman and Murad, 1987) but also to hyperpolarization induced by opening of  $K^+$  channels (Tare et al., 1990). Activation of soluble guanylate cyclase seems to play a significant role on the endothelium-dependent vasodilator effect of ASE since ODQ, an inhibitor of soluble guanylate cyclase, significantly reduced its effect.

Data from the literature suggest that the remaining portion of ACh-induced vasodilation that is resistant to NO synthase inhibition is likely to be mediated via release of an as yet unidentified endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) that acts ultimately by opening of plasmalemmal potassium channels (Chen et al., 1988; Feletou and Vanhoutte, 1988). As in our study the endothelium-dependent vasodilator effects of ACh and ASE were not completely inhibited by L-NAME, we can speculate that EDHF might play a role in the vasodilator effect of ASE. Indeed in our study we demonstrated that the vasodilator effect of ASE is inhibited in vessels pretreated with high potassium solution and also by charybdotoxin plus apamin, compounds that inhibit the hyperpolarization induced by opening of calcium-dependent  $K^+$  channels. In addition the remained portion of ASE-induced vasodilation resistant to L-NAME or high potassium solution is almost completely abolished by combination of L-NAME plus high potassium solution. The participation of  $K_{ATP}$  and  $K_V$  channels on the vasodilator effect of ASE seems improbable since its vasodilator effect was not changed by glybenclamide or 4-aminopyridine, inhibitors of  $K_{ATP}$  and  $K_V$  channels, respectively (Choquet and Korn, 1992; Aguilar-Bryan et al., 1995, Philipson and Steiner, 1995).

## 5. Conclusion

In the present study, we demonstrate that ASE induces an endothelium-dependent vasodilator effect that does not involve prostanoids release, receptors activated by ACh, histamine, adrenaline, bradykinin and opening of  $K_{ATP}$  or  $K_V$  channels. Probably the vasodilator effect of ASE is dependent on the activation of NO-GMPc pathway and also may involve EDHF release. Finally, the vasodilator effect of ASE demonstrated in the present study provides experimental support for the possibility to use ASE, as a medicinal plant, in the treatment of cardiovascular diseases.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support of FAPERJ, CNPq and CAPES-CFECUB.

## References

- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C., Wechsler, S., Clement, J., Boyd, A., Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., Nelson, D.A., 1995. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423–426.

- Bobbio, F.O., Druzian, J.I., Abrão, P.A., Bobbio, P.A., Fadelli, S., 2000. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 20, 388–390.
- Chen, G., Suzuki, H., Weston, A.H., 1988. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 95, 1165–1174.
- Choquet, D., Korn, H., 1992. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 99, 217–240.
- Embrapa — [www.embrapa.br/noticias/banco\\_de\\_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra\\_noticia](http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra_noticia).
- Feletou, M., Vanhoutte, P.M., 1988. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 93, 515–524.
- Fitzpatrick, D.F., Fleming, R.C., Bing, B., Maggi, D.A., O'Malley, R.M., 2000. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxation compounds from grape stones. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6384–6390.
- Frankel, E.N., Kanmer, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E., 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341, 454–457.
- Gallori, S., Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Barbosa, W.L.R., Vincieri, F.F., 2004. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). *Cromatographia* 59, 739–743.
- Khan, M.T., Jothianandan, D., Matsumaga, Furchgott, R.F., 1992. Vasodilation induced by acetylcholine and by glyceryl trinitrate in rat aortic and mesenteric vasculature. *J. Vasc. Res.* 29, 20–28.
- Kleschyov, A.L., Munzel, T., 2002. Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol.* 359, 42–51.
- McGregor, D.D., 1965. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* 177, 21–30.
- Moore, P.K., Al-Swayeh, A.O., Chong, N.W.S., Evans, R.A., Gibson, A., 1990. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine (L-NOarg), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 99, 408–412.
- Parsons, S.J.W., Hill, A., Waldron, G.J., Plane, F., Garland, C.J., 1994. The relative importance of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms in acetylcholine-evoked dilatation of the rat mesenteric bed. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1275–1280.
- Peredo, H.A., Adler-Graschinsky, E., 2000. Effects of eicosanoids and nitric oxide on the noradrenaline-induced contractions in the rat mesenteric bed. *J. Auton. Pharm.* 20, 162–170.
- Philipson, L.H., Steiner, D.F., 1995. Pas de deus or more: the sulfonylurea receptor and K channels. *Science* 268, 372–373.
- Pozo-Isfran, D.D., Brenes, C.H., Talcoot, S.T., 2004. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 1539–1545.
- Rees, D.D., Palmer, R.M.J., Hodson, H.F., Moncada, S., 1989. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.* 96, 418–424.
- Shibata, T., Ogawa, K., Ito, T., Hashimoto, H., Nakagawa, H., Satake, T., 1986. Role of cyclic GMP of canine vascular smooth muscle in relaxation by organic nitrates. *Jpn. Circ. J.* 50, 1091–1099.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Soares de Moura, R., Costa Viana, F.S., Souza, M.A.V., Kovary, K., Guedes, D.C., Oliveira, E.P.B., Rubenich, L.M.S., Carvalho, L.C.R.M., Oliveira, R.M., Tano, T., Gusmão Correia, M.L., 2002a. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1515–1520.
- Soares de Moura, R., Costa Viana, F.S., Souza, M.A., Kovary, K., Guedes, D.C., Oliveira, E.P., Rubenich, L.M., Carvalho, L.C., Oliveira, R.M., Tano, T., Gusmão Correia, M.L., 2002b. Antihypertensive, vasodilator, and antioxidant effects of vinifera grape skin extract. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1515–1520.
- Soares de Moura, R., Miranda, D.Z., Pinto, A.C.A., Sicca, R.F., Souza, M.A.V., Rubenich, L.M.S., Carvalho, L.C.R.M., Rangel, B.M., Tano, T., Madeira, S.V.F., Resende, A.C., 2004. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and antihypertensive effect of Brazilian red wine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44, 302–309.
- Stoclet, J.-C., Chataigneau, T., Ndjaye, M., Oak, M.-H., Bedoui, J.E., Chataigneau, M., Schni-Kerth, V.B., 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 299–313.
- Tare, M., Parkington, H.C., Coleman, H.A., Neild, T.O., Dusting, G.J., 1990. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature* 5, 69–71.
- Vanhoutte, P.M., 1999. Endothelial dysfunction and vascular disease. In: Panza, J.A., Cannon III, R.O. (Eds.), *Endothelium, Nitric Oxide, and Atherosclerosis*. Futura Publishing Co. Inc., Armonk, NY, pp. 79–95.
- Vanhoutte, P.M., Mombouli, J.V., 1996. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 39, 229–238.
- Vanin, A.F., 1999. Iron diethyldithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection. *Methods Enzymol.* 301, 269–279.
- Waldman, S.A., Murad, F., 1987. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 39, 163–196.
- Yamawaki, H., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Karaki, H., 2000. Platelet-derived growth factor causes endothelium-independent relaxation of rabbit mesenteric artery via release of a prostanoid. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1546–1552.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)