

AURYLENE CARLOS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS EFEITOS
CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO LIOFILIZADO
DO VINHO TINTO DO VALE DO SÃO FRANCISCO EM
RATOS – ABORDAGEM IN VIVO E IN VITRO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

JOÃO PESSOA – PB

2011

AURYLENE CARLOS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS EFEITOS
CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO LIOFILIZADO
DO VINHO TINTO DO VALE DO SÃO FRANCISCO EM
RATOS – ABORDAGEM IN VIVO E IN VITRO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

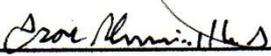
JOÃO PESSOA – PB
2011

O48a Oliveira, Aurylene Carlos de.
*Avaliação pré-clínica dos efeitos
cardiovasculares induzidos pelo liofilizado do vinho
tinto do Vale do Rio São Francisco em ratos –
abordagem in vivo e in vitro / Aurylene Carlos
de Oliveira.-- João Pessoa, 2011.*
98f. : il.
Orientador: Isac Almeida de Medeiros
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS
1. Produtos Naturais. 2. Vinho tinto. 3.
Hipotensão. 4. Óxido nítrico. 5. Vasorelaxante.

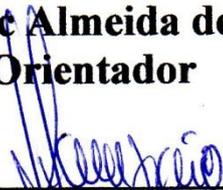
**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS EFEITOS
CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO LIOFILIZADO
DO VINHO TINTO DO VALE DO SÃO FRANCISCO EM
RATOS – ABORDAGEM IN VIVO E IN VITRO**

APROVADA EM 03/11/2011

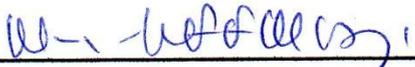
BANCA EXAMINADORA:



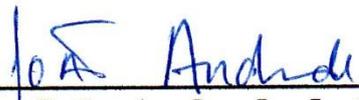
Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Orientador



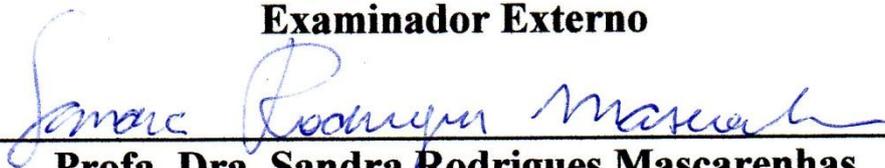
Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Examinador Externo



Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinador Interno



Prof. Dr. João Andrade da Silva
Examinador Externo



Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Examinador Interno

*"A vitória não pertence aos mais fortes, mas sim aos que a
perseguem por mais tempo!"*

(Napoleão Bonaparte)

*Aos meus pais, Geraldo Carlos
e Terezinha Oliveira, razões da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e perseverança para percorrer esta caminhada, enfrentar todas as dificuldades e me fazer chegar a este dia;

À minha família, irmãos, sobrinhos pelo desprendimento, amor, carinho incondicional em todos os momentos difíceis e que fizeram possível a realização dessa conquista;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, pela orientação, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança depositada em mim e pelo exemplo de competência e honestidade profissional;

Ao mestrando Leonidas das Graças Mendes Júnior que me acompanha desde o início do doutorado, quando foi meu aluno de iniciação científica, e sempre se demonstrou disposto a ajudar nas situações difíceis com muita dedicação. Um grande amigo e companheiro que não tenho palavras para agradecer.

Às doutorandas, Maria do Socorro de França Silva (Corrinha) e Thaís Porto Ribeiro pela imensurável ajuda na realização deste trabalho e principalmente por toda a paciência e alto astral que sempre foi demonstrado, sendo estas de grande importância para enfrentar todas as dificuldades;

Ao mestrando Matheus Morais de Oliveira Monteiro pelo seu apoio, amizade, colaboração, companheirismo e alto astral demonstrados em todas as dificuldades;

Ao Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, por sua valorosa ajuda e apoio, na realização desse trabalho;

À Prof^a Dr^a Raline Mendonça dos Anjos pela amizade, apoio e colaboração na realização desse trabalho;

À Prof^a Msc. Melissa Negro Luciano pela amizade, exemplo de força e coragem e pela valorosa ajuda;

Aos grandes amigos que compõe a equipe do laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Abrahão Filho, Bruna Dantas, Fabíola Fialho, Prof^a. Dr^a Islânia Araújo, José George, Juliane Santos, Kívia de Assis, Laís Dias, Maria do Carmo, Milena Ramos, Mônica de Almeida, Natália Machado; Priscila, Prof. Dr. Robson Veras, Thaís Josy, Thyago Queiroz, Valéria de Assis, Walma Vasconcelos pela amizade e colaboração;

Ao Prof. Dr. JaciCarlos Lima de Alencar pelo apoio e amizade dispensados a mim;

À Prof^a Dr^a Luciana Leite de Andrade Lima e a Cristiane Libório (UFPE) pela colaboração e boa vontade para a realização de experimentos que integram esse trabalho;

À Profª Drª Alessandra Azevedo Nascimento de Medeiros pela amizade, incentivo, apoio e disposição em ajudar;

À Profª Drª Aldeídia Pereira de Oliveira pelo apoio e amizade;

À Profª Drª Maria de Fátima Agra pelo incentivo, apoio e alto astral dispensados a mim;

À Tânia Alves (secretária da pós-graduação) pelo apoio nos momentos difíceis e competência no trabalho desempenhado. À Caroline e demais funcionários do Programa de Pós- Graduação, pelo trabalho desempenhado;

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação, por transmitirem além do conhecimento, coragem e estímulo para enfrenta esta caminhada;

Ao técnico, José Crispim Duarte, exemplo de competência, e que esteve sempre pronto a ajudar com alto astral e boa vontade;

Ao técnico Raimundo Nonato da Silva Filho pela valorosa ajuda e apoio;

Aos funcionários do biotério Luis Cordeiro Silva e Adriano pelo excelente trabalho realizado; e aos demais funcionários do Centro de Biotecnologia.

À comissão examinadora do exame de qualificação, composta pela Profª Drª. Simone dos Santos Maciel, Profª Drª. Sandra Rodrigues Mascarenhas, Profª Drª Katy Lisias Gondim Dias pelas sugestões e correções;

À CAPES e UFPB, pelo apoio financeiro;

MUITO OBRIGADA.

RESUMO

Estudos epidemiológicos demonstram que o consumo regular de vinho está associado a um decréscimo da mortalidade global. Acredita-se que o efeito protetor seja decorrente, pelo menos em parte, da presença de polifenóis. A atividade biológica do Liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco (LVTVSF) foi estudada no sistema cardiovascular usando técnicas combinadas *in vivo* e *in vitro*. A análise química do LVTVSF revelou a presença de vários polifenóis, como a quercetina, miricetina e caempferol. Em ratos com hipertensão induzida pelo L-NAME, o LVTVSF foi capaz de reduzir a pressão arterial média (PAM) quando comparado ao grupo controle ($143,7 \pm 4,7$ versus $172,5 \pm 4,7$ mmHg), sem alterar a frequência cardíaca (FC). Ratos normotensos no qual foi administrado LVTVSF (10, 30, 90 mg/Kg i.v) aleatoriamente promoveu efeitos hipotensor ($-24,0 \pm 1,2$; $-32,4 \pm 1,3$; $-51,4 \pm 1,5$ %) e taquicárdico ($14,5 \pm 2,3$; $19,5 \pm 1,7$; $28,4 \pm 2,1$ %). A resposta hipotensora foi significativamente atenuada após a administração de NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (20 mg/Kg i.v.), um inibidor da enzima sintase de óxido nítrico. Em preparações com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos pré-contraídos com fenilefrina, o LVTVSF promoveu um efeito vasorelaxante ($E_{max} = 87,22 \pm 3,59\%$). Após a remoção do endotélio vascular o vasorelaxamento foi significativamente atenuado ($E_{max} = 32,07 \pm 2,07\%$, $p < 0,05$), sugerindo a participação de fatores relaxantes derivados do endotélio. Após a incubação com L-NAME (100 μ M) e ODQ (10 μ M), um inibidor da ciclase de guanilil solúvel, a resposta relaxante do composto foi significativamente atenuada ($E_{max} = 22,64 \pm 3,74\%$, $p < 0,05$ e $E_{max} = 37,08 \pm 4,60\%$, $p < 0,05$, respectivamente). Resultados similares também foram obtidos em anéis com endotélio, na presença de KCl (20 mM), modulador do efluxo de K^+ ; ou TEA (1 mM), bloqueador não seletivo dos canais de K^+ ; ($E_{max} = 46,04 \pm 9,87\%$, $p < 0,05$) e ($E_{max} = 44,40 \pm 5,80\%$ $p < 0,05$). O LVTVSF aumentou os níveis de óxido nítrico em células endoteliais de aorta de coelho. Na presença de caribdotoxina (0,2 μ M) e apamina (0,2 μ M), bloqueadores dos canais de K^+ sensíveis ao cálcio, o efeito relaxante induzido por LVTVSF não foi alterado. A incubação com os inibidores de espécies reativas de oxigênio, n-acetilcisteína (10 mM), tempol (100 μ M) e apocinina (10 μ M), diminuíram o vasorelaxamento. O efeito vasorelaxante não foi alterado na presença de atropina e indometacina, sugerindo que receptores muscarínicos, bem como metabólitos da via do ácido araquidônico não estão envolvidos neste efeito. Em células endoteliais de aorta de coelho o LVTVSF foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses resultados em conjunto sugerem que o efeito hipotensor induzido por LVTVSF provavelmente ocorre devido à redução na resistência periférica total, resultado da ativação da via eNOS-NO-GMPc, envolvendo um mecanismo sensível a sinalização redox. Esses efeitos podem ser atribuídos aos flavonóides encontrados no LVTVSF.

Palavras chaves: vinho tinto, hipotensão, vasorelaxamento, óxido nítrico.

ABSTRACT

Several epidemiological studies indicated that regular intake of red wine is associated with a decrease global mortality. The protective effect has been attributable, at least in part, to polyphenols. The cardiovascular effects induced by lyophilized red wine from Vale do São Francisco (LVTVSF) were evaluated in this study using *in vivo* and *in vitro* assays. The lyophilized red wine from Vale do São Francisco (LVTVSF) contains a series of flavonols, such, quercetin, myricetin and kaempferol. The red wine lyophilized was able to reduce mean arterial pressure (MAP) in L-NAME hypertensive rats compared to controls (143.7 ± 4.7 versus 172.5 ± 4.7 mmHg). In normotensive rats the administration of LVTVSF (10, 30, 90 mg/kg i.v.) randomly, induced hypotension (-24.0 ± 1.2 ; -32.4 ± 1.3 ; $-51.4 \pm 1.5\%$) and tachycardic effects (14.5 ± 2.3 ; 19.5 ± 1.7 ; $28.4 \pm 2.1\%$). The pre-treatment with L-NAME (20 mg / kg i.v.), inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, attenuated the hypotensive effect induced by LVTVSF. In isolated normotensive rat mesenteric artery rings LVTVSF elicited concentration-dependent relaxation of PHE-induced contraction (MR = $87.22 \pm 3.59\%$). After removal of the vascular endothelial the vasorelaxant effect was significantly attenuated (MR = $32.07 \pm 2.07\%$, $p < 0.05$), suggesting the involvement of endothelium-derived relaxing factor. After incubation with L-NAME (100 μ M) and OEQ (10 mM), inhibitor of soluble guanylyl cyclase, the relaxation response was significantly attenuated (MR = $22.64 \pm 3.74\%$, $p < 0.05$; MR = $37.08 \pm 4.60\%$, $p < 0.05$, respectively). Similar results was also obtained rings incubed with KCl (20 mM), a modulator of potassium efflux; TEA (1 mM), nonselective blocker for potassium channels; (MR = $46.04 \pm 9.87\%$, $p < 0,05$; MR = $44.40 \pm 5.80\%$, $p < 0,05$; respectively). The LVTVSF was able to increase the NO levels in endothelial cells of the rabbit aorta. In the presence of charybdotoxin and apamin the relaxant response was not attenuated. Incubation with inhibitors of reactive oxygen species, N-acetylcysteine (NAC) (10 mM), tempol (100 μ M) and apocynin (10 μ M), reduces the vasorelaxation. After pre-treatment with atropine and indometacin, the vasorelaxant effect induced by LVTVSF was no attenuated. In endothelial cells of the rabbit aorta LVTVSF was able to increase production of ROS. These results together suggest that the hypotensive effect induced by LVTVSF in normotensive rats is probably due to a decrease in total peripheral resistance as a result of activation of the eNOS-NO-cGMP, involving the redox sensitive mechanism. These effects may be due to flavonoids found in LVTVSF.

Keywords: red wine, hypotension, vasorelaxation, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeitos de polifenóis sobre o endotélio vascular e células musculares lisas	23
Figura 2 - Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).....	32
Figura 3 - Aparato utilizado para experimentos <i>in vivo</i>	37
Figura 4 - Artéria mesentérica superior isolada de rato	38
Figura 5 - Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato em solução de Tyrode	39
Figura 6 - Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	39
Figura 7 - Representação esquemática do protocolo para verificação do endotélio funcional.....	40
Figura 8 - Representação esquemática dos protocolos experimentais para avaliação do efeito do LVTVSF sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	41
Figura 9 – Protocolo experimental para avaliação do efeito do LVTVSF na presença e na ausência do endotélio funcional.....	43
Figura 10 - Protocolo experimental para avaliação do efeito do LVTVSF na presença de ferramentas farmacológicas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio vascular.....	43
Figura 11 - Aparato utilizado para medida de óxido nítrico por citometria de fluxo em células endoteliais de aorta de coelho	49
Figura 12 – Cromatograma do LVTVSF mostrando a presença dos flavonoides miricetina, quercetina e caempferol.....	52
Figura 13 – Efeito do LVTVSF em ratos hipertensos L-NAME sobre a PAM (A) e FC (B)	53
Figura 14 – Registros originais dos valores de PAP (■) PAM (■) e FC (■) obtidos com a administração aguda de doses crescente do LVTVSF (10, 30, 90 mg/kg) em ratos normotensos.....	54
Figura 15 - Efeito do LVTVSF (10, 30, 90 mg/kg) sobre a PAM (■), PAS (■) e PAD (■) (A) e FC (■) (B) em ratos normotensos não-anestesiados.....	55

Figura 16 - Efeito do LVTVSF (10, 30, 90 mg/kg) sobre a PAM (A) e FC (B) antes e após a administração do L-NAME (20 mg/Kg i.v.) em ratos normotensos não-anestesiados.....	56
Figura 17 – Registros originais da resposta relaxante do LVTVSF (0,0001 – 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença (A) ou na ausência (B) do endotélio vascular.....	58
Figura 18 – Registro original mostrando a reversão da contração por fenilefrina (10 µM) em anel de artéria mesentérica superior de rato após o relaxamento induzido por LVTVSF (0,0001 – 1000 µg/mL).....	58
Figura 19 - Curvas concentração resposta do liofilizado do LVTVSF (0,0001-1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na presença (●) e ausência de endotélio funcional (○).....	59
Figura 20 - Curvas concentração resposta do liofilizado do LVTVSF (0,0001-1000 µg/ml) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de L-NAME (100 µM) (Δ) com endotélio funcional.....	60
Figura 21 - Curvas concentração resposta do liofilizado LVTVSF (0,0001-1000 µg/ml) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de ODQ (10 µM) (□) com endotélio funcional.....	61
Figura 22 - Curvas concentração resposta do LVTVSF (0,0001-1000 µg/ml) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de KCl (20 mM) (□) ou TEA (1 mM) (■) com endotélio funcional.....	62
Figura 23 – Efeito do LVTVSF (100 µg/mL), LVTVSF (300 µg/mL), L-NAME (100 µM) + LVTVSF (100 µg/mL), L-NAME (100 µM) + LVTVSF (300 µg/mL) e ACh (10 ⁻⁵ M), sobre os níveis de NO expressos em relação fluorescência em células endoteliais de aorta de coelho.....	63
Figura 24 - Registro original da produção de NO em células endoteliais de aorta de coelho por citometria de fluxo.....	63
Figura 25 - Curvas concentração resposta do LVTVSF (0,0001-1000 µg/ml) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de apamina (0,2 µM) + caribdotoxina (0,2 µM) (Δ) com endotélio funcional.....	64
Figura 26 - Curvas concentração resposta do liofilizado do LVTVSF (0,0001-1000 µg/ml) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de	

indometacina (10 μ M) (\square) com endotélio funcional.....	65
Figura 27 - Curvas concentração resposta do liofilizado LTVVSF (0,0001-1000 μ g/ml) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraidos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (\bullet) na presença de atropina (1 nM) (Δ) com endotélio funcional.....	66
Figura 28 - Efeito vasorelaxante LTVVSF (0,0001-1000 μ g/ml) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraidos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (\bullet) e na presença de NAC (\square) com endotélio funcional.	67
Figura 29 - Efeito vasorelaxante LTVVSF (0,0001-1000 μ g/ml) em anéis de artéria mesentérica de rato pré-contraída com fenilefrina (10 μ M) na ausência (\bullet) e na presença do tempol (100 μ M) (\square) com endotélio funcional.	68
Figura 30 - Efeito vasorelaxante LTVVSF (0,0001-1000 μ g/ml) em anéis de artéria mesentérica de rato pré-contraída com fenilefrina (10 μ M) na ausência (\bullet) e na presença de apocinina (10 μ M) (Δ) com endotélio funcional.....	69
Figura 31 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em cultura de células endoteliais de aorta de coelho. Geração de ROS induzido por LTVVSF (300 μ g/ml) e Ang II (1 μ M).	70
Figura 32 – Mecanismo de ação proposto para o LTVVSF envolvendo a ativação da via NO/GMPc/PKG sensível à sinalização redox.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da solução de tyrode	34
Tabela 2- Composição da solução de tyrode despolarizante – KCl (20mM)....	34
Tabela 3- Valores de $E_{m\acute{a}x}$ em diferentes condições experimentais	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AMPC	Monofosfato de guanosina cíclico
COX	Enzima cicloxigenase
DAF-2 DA	4,5 Diaminofluoresceína diacetato
DC	Débito cardíaco
DHE	Dihidroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
e.p.m.	Erro padrão da média
ET1	Endotelina1
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
Emáx	Efeito máximo
GMPc	3,5-monofosfato de guanosina cíclico
GAE	Equivalentes de ácido gálico
Hz	Hertz
i.v.	Intravenoso
KCl (20 mM)	Solução de Tyrode modificada isosmoticamente para KCl (20 mM)
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metil-éster
LVTVSF	Liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco
Log	Logaritmo na base 10
M	Molar
M2	Receptor muscarínico subtipo 2
M3	Receptor muscarínico subtipo 3
mM	Milimolar
MR	Maximal response
nM	Nanomolar

μM	Micromolar
NAC	N-acetilcisteína
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
O_2^-	Ânion superóxido
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PGI_2	Prostaciclina
RAEC	Célula endotelial de aorta de coelho
TEA	Tetraetilamônio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Especificos	29
2.2.1	Efeitos cardiovasculares específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Animais	32
3.2	Drogas e reagentes	33
3.3	Soluções nutritivas	33
3.4	Preparação do liofilizado do vinho tinto do vale do São Francisco (LTVVSF)	34
3.5	Determinação dos constituintes químicos do vinho tinto do Vale do São Francisco	35
3.5.1	Determinação de polifenóis totais.....	35
3.6	Ensaio Farmacológicos	36
3.6.1	Medida da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não-anestesiados	36
3.6.2	Hipertensão L-NAME e tratamento crônico com LTVVSF	37
3.6.3	Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	37
3.7	Protocolos experimentais para estudos <i>in vivo</i>	40
3.7.1	Efeito do LTVVSF sobre a pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e FC em ratos normotensos	40
3.7.2	Efeito do LTVVSF sobre a PAM e FC em ratos hipertensos L-NAME	41
3.8	Protocolos experimentais para estudos <i>in vitro</i>	42
3.8.1	Curva concentração-resposta do LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos	42
3.8.2	Determinação da participação da enzima sintase do NO na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos.....	44
3.8.3	Influência da enzima ciclase de guanilil solúvel na resposta relaxante induzida pelo LTVVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos	44
3.8.4	Avaliação da participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida por LTVVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos na presença de KCL (20 mM) ou TEA (1 mM).....	45
3.8.5	Determinação da participação do EDHF na resposta relaxante induzida por LTVVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos	

normotensos.....	45
3.8.6 Verificação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos.....	46
3.8.7 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no vasorelaxamento induzido por LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos	46
3.8.8 Influência da participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos	47
3.8.9 Determinação da participação de ânions superóxidos na resposta relaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos	47
3.8.10 Avaliação da participação da enzima NADPH oxidase na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos	48
3.8.11 Determinação da produção de óxido nítrico pelo LTVSF em células endoteliais de aorta de coelho.....	48
3.8.12 Análise por fluorescência total de DHE para medida de produção do ânion superóxido.....	50
3.9 Análises Estatísticas	50
4. RESULTADOS	52
4.1 Determinação dos níveis de polifenóis totais e flavonoides no liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco	52
4.2 Tratamento crônico com LTVSF (100 mg/Kg/dia) em ratos hipertensos L-NAME, mostrando o efeito do liofilizado sobre a PAM e FC.....	53
4.3 Efeito do LTVSF sobre PAM, PAS, PAD e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	54
4.4 Efeito do LTVSF sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados antes e após a administração aguda de L-NAME.....	56
4.5 Estudos farmacológicos com o LTVSF em ratos normotensos - <i>in vitro</i>	57
4.5.1 Efeito do LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contráídos com fenilefrina	57
4.5.2 Participação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos	59
4.5.3 Envolvimento da enzima ciclase de guanilil solúvel sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos.....	60
4.5.4 Efeito da resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos na presença de KCl (20 mM) ou TEA (1 mM).....	61

4.5.5	Determinação da produção de NO em células endoteliais.....	62
4.5.6	Avaliação da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na resposta relaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos	64
4.5.7	Envolvimento dos metabólitos do ácido araquidônico na resposta relaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos	65
4.5.8	Avaliação da participação dos receptores muscarínicos na resposta vasorelaxante induzida pelo LVTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos	66
4.5.9	Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vasorelaxante induzida pelo LVTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos	66
4.5.10	Envolvimento dos ânions superóxidos na resposta vasorelaxante induzida pelo LVTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos	67
4.5.11	Envolvimento da enzima NADPH oxidase na resposta vasorelaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos	68
4.5.12	Medida da produção de superóxidos em cultura de células endoteliais de aorta de coelho após exposição ao LVTVSF.....	70
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÕES	81
7	PERSPECTIVAS	84
	REFERÊNCIAS	86

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A pressão arterial (PA) é determinada pelo produto de duas variáveis: o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP). Por sua vez, o débito cardíaco depende do volume diastólico final, contratilidade miocárdica e frequência cardíaca. O volume diastólico final é o volume que chega na câmara ventricular antes da contração e é determinado pela pressão venosa, que está relacionada ao volume sanguíneo e tônus muscular venoso. A resistência vascular periférica é determinada pelo tônus vascular (GUYENET, 2006). Todos esses parâmetros são influenciados por diversos mecanismos regulatórios.

A regulação da pressão arterial é uma das mais complexas funções fisiológicas, uma vez que é resultante da ação integrada dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino, que trabalhando em conjunto são responsáveis pela redistribuição dos vários fluxos sanguíneos regionais em função de alterações na resistência total e no débito cardíaco (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001). A manutenção de níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade depende de variações do débito cardíaco (DC), da resistência vascular periférica total ou de ambos. Diferentes mecanismos de controle estão envolvidos não só na manutenção como na variação momento a momento da pressão arterial, regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o DC. Alterações da pressão arterial, como as encontradas na hipertensão ou em outras patologias, resultariam da disfunção desses sistemas de controle (IRIGOYEN, et. al., 2001).

A hipertensão arterial é um grande problema de saúde pública mundial, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade (ELLIOTT, 2007; KEARNEY, et al. 2004). Ela é uma condição clínica multifatorial que envolve tanto fatores genéticos como ambientais, atingindo cerca de 30% da população adulta mundial, chegando a alcançar índices de 50% nos idosos (SOLER; RUIZ, 2010; LEITE DE BARROS et al., 2009; KOTCHEN, 2007). No Brasil inquéritos populacionais indicam prevalência de hipertensão arterial sistêmica acima de 30%. Considerando-se valores de PA \geq 140/90 mmHg, com mais de 50% entre 60 e 69 anos e 75% acima de 70 anos (VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial 2010).

A hipertensão pode ser classificada em duas formas: primária ou essencial; e secundária ou adquirida. Esta corresponde a cerca de 20% dos indivíduos hipertensos, apresenta causa definida tais como ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, feocromocitoma, apnéia do sono, doenças da glândula tireóide e paratireóide, dentre outras (CORRÊA, et al., 2005). A hipertensão essencial caracteriza-se por uma elevação da pressão sanguínea sem causa aparente e está associada a vários fatores de risco, como uma predisposição genética, obesidade, consumo elevado de álcool e sedentarismo (PAGE et al., 1999). Este tipo de hipertensão é também caracterizado por ter longa duração e comprometer direta ou indiretamente órgãos nobres como coração, rins e vasos acarretando níveis elevados de morbidade (CHEN, et al., 2007; PAPAZAFIROPOULOU, et al., 2011).

Conforme a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010) da Sociedade Brasileira de Cardiologia, os níveis de hipertensão compreendem três estágios: 1 (leve – entre 140×90 mmHg e 159×99 mmHg), 2 (moderado - entre 160×100 mmHg e 179×109 mmHg) e 3 (grave - acima de 180×110 mmHg). Os valores intermediários aos mencionados acima são considerados “limítrofes”.

A hipertensão arterial é considerada o maior fator de risco para doenças cardiovasculares como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, falência cardíaca, além de outras complicações cardiovasculares (COGOLLUDO, et al., 2005). O estado hipertensivo pode estar associado com anomalias estruturais no sistema cardiovascular, tais como: aumento na quantidade da massa cardíaca e muscular lisa (FOLKOW, 1982), aumento da relação da parede versus luz arterial (SAFAR, et al., 1981), aumento da resistência vascular (COX, et al., 2003), diminuição da complacência venosa (TAKESHITA; MARK, 1979), anomalias intrínsecas da função renal (COLEMAN, et al., 1975), disfunção endotelial, inflamação, dentre outras (JULIUS, 2007). De acordo com a literatura, o tônus vascular das arteríolas, é o maior determinante da resistência ao fluxo sanguíneo na circulação (JACKSON, 2000) e, conseqüentemente, da pressão sanguínea (CRIBBS, 2006).

Mudanças na estrutura e na função dos vasos e conseqüente aumento da resistência vascular periférica são alterações características da hipertensão (TAHVANAINEN, et al., 2006). Anormalidades no músculo liso vascular e no

endotélio estão associadas ao comprometimento da função destas estruturas, como o aumento da vasoconstrição e redução da vasodilatação. Esta perda no equilíbrio entre relaxamento e contração dos vasos é frequentemente citada como uma das causas do aumento do tônus vascular na hipertensão (DOGGREL; BROWN, 1998).

Em várias doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial, ocorre disfunção endotelial. Um grande número de estudos experimentais e clínicos evidenciou o papel central desempenhado pelo endotélio na hipertensão (BATLOUNI, 2001), como o comprometimento do vasorelaxamento, assim como a capacidade do óxido nítrico (NO) em modular o tônus vascular (KANG, et al, 2004). Desta forma, a diminuição do vasorelaxamento dependente de endotélio vascular tem sido demonstrada em artérias humanas e de animais experimentais (TAHVANAINEN, et al., 2006; FURIAN, et al., 2009).

O endotélio vascular, camada que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, constitui uma interface ativa, situada entre a circulação e o restante da parede vascular. Sua integridade é essencial à regulação do tônus vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e a aterogênese. O endotélio intacto libera localmente, de forma controlada, compostos que induzem vasodilatação, como o NO, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI₂); e compostos que induzem vasoconstrição, tais como: endotelina-1 (ET₁), prostaglandina (PGH₂) e tromboxano A₂ (TXA₂) (BATLOUNI, 2001).

O NO é um mediador biológico ubíquo em nosso organismo e produzido em vários tecidos por três isoformas de NO sintase (NOS): endotelial, neuronal e induzida. O papel biológico do NO foi demonstrado, inicialmente, no mecanismo de relaxamento vascular. As evidências do papel fisiológico do NO como modulador do tônus vascular foram verificadas pelas experiências clássicas realizadas por Furchgott; Zawadzki (1980), que observaram que a destruição do endotélio vascular inibia o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta de coelho.

O NO atua como molécula sinalizadora ativando a ciclase de guanilil solúvel (CGs), induzido assim a formação de 3,5- monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e consequente ativação da proteína cinase G (PKG). Esta por sua vez, é capaz de diminuir as concentrações intracelulares de Ca²⁺, assim como interferir na

sensibilidade dos filamentos contráteis da musculatura lisa a este íon, causando relaxamento da musculatura vascular (PIMENTEL, et al., 2007).

Um importante papel desempenhado pelo NO, além de vasorelaxamento é o seu envolvimento na regulação fisiológica dos sistemas cardiovascular, imune e nervoso. Consequentemente, alterações da concentração de NO presente no organismo estão implicadas em diversas condições patológicas como: arteriosclerose, sepse, choque hemorrágico, diabetes, desordens neurodegenerativas e hipertensão (GROSS; WOLIN, 1995; MONCADA, et. al. 1991; WINK; MITCHELL, 1998).

A compreensão dos mecanismos que regulam o tônus vascular é, portanto, essencial para estabelecer novas estratégias para prevenção e tratamento de doenças vasculares, dentre estas a hipertensão arterial sistêmica (HIRANO, et. al. 2004).

Muitas alterações cardiovasculares, como hipertensão, angina e falência cardíaca, são frequentemente tratadas com drogas vasodilatadoras, que atuam diretamente no músculo liso vascular causando vasorelaxamento, ou indiretamente, por meio da estimulação da liberação de fatores vasorelaxantes endógenos, ou ainda por inibir a liberação de fatores vasoconstritores (GURNEY, 1994).

Os compostos polifenólicos exercem efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, melhorando a função endotelial por induzirem a formação de substâncias com atividade vasodilatadora como o óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina culminando com vasorelaxamento, além de inibir a síntese de substâncias com capacidade vasoconstritora como a endotelina-1 (SCHINI-KERTH, et al., 2010). Em células musculares, diminuem a expressão de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), diminuem a expressão gênica de PI3K e receptor PDGF β (DELL'AGLI et al., 2004; STOCLET, et al., 2004), podendo portanto, apresentar benefícios frente a doenças cardiovasculares (Figura 1).

Estes compostos também possuem a capacidade de reduzir o estresse oxidativo vascular, em especial, não só pela sua capacidade de sequestrar ânions superóxidos, mas também de interação com outras espécies reativas de oxigênio como os radicais hidroxil e peroxil (HU, et al., 1995; NIJVELDT et al., 2001; ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988; TOREL, et al., 1986).

Vários estudos epidemiológicos têm indicado que a diminuição da mortalidade global devido ao número reduzido de câncer e doenças coronárias pode estar associada a ingestão regular de legumes, frutas e bebidas como chá verde e vinho tinto (BIANCHINI; VAINIO, 2003; SOFI, et al., 2008). Este efeito protetor foi atribuído, pelo menos em parte, aos compostos polifenólicos presentes nesses alimentos (DI, et al., 2002; HERTOOG, et al., 1995). De fato, produtos da uva como o vinho tinto contém altos níveis de polifenóis, que são encontrados predominantemente em peles, sementes e caules (ANSELM, et al., 2007).

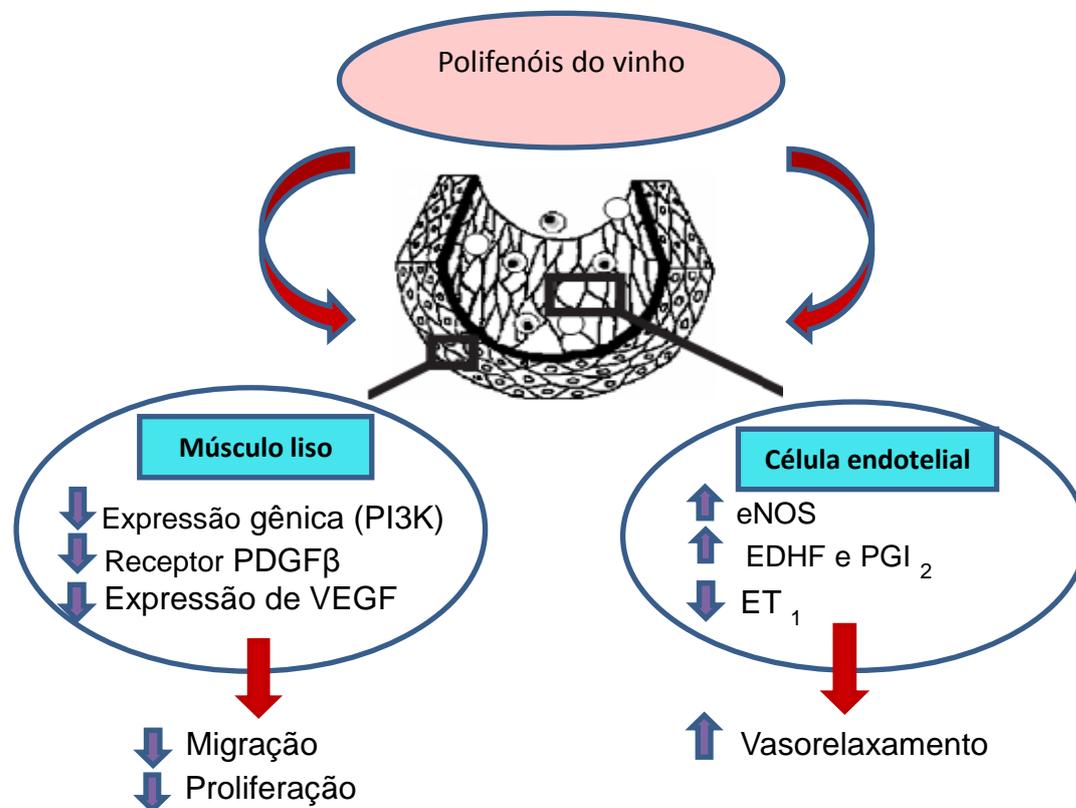


Figura 1: Efeitos de polifenóis sobre o endotélio vascular e células musculares lisas
(Adaptado de DELL'AGLI et al., 2004)

Os vinhos tintos apresentam uma série de polifenóis solúveis em água que incluem ácidos fenólicos, divididos em duas classes, os flavonóides e os não flavonóides. Os flavonóides são os polifenóis mais encontrados nos vinhos tintos, dentre eles os flavanóis, catequinas e antocianinas (MERAL, 2008). Os não flavonóides incluem os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, ácidos benzóicos, taninos hidrolizáveis e estilbenos (principalmente o resveratrol).

Os flavonóis como a quercetina exercem efeitos benéficos à saúde incluindo proteção contra osteoporose, certos tipos de câncer, doenças pulmonares e cardiovasculares, além disso, absorvem a luz ultravioleta e protegem a casca da uva contra efeitos nocivos do sol (BOOTS, et al. 2008; COOK; SAMMAN, 1996). Investigações usando miricetina e caempferol demonstraram vasorelaxamento significativo em artérias pulmonares de ratos (BURNS, et al., 2000).

A miricetina possui várias aplicações terapêuticas, tais como anticâncer (KO et al., 2005), atividade antimicrobiana (ONO, et al., 1990) e inibição da agregação plaquetária (TZENG, et al., 1991). Além disso, possui um importante valor terapêutico na profilaxia do infarto do miocárdio (TIWARI, et al., 2009).

As antocianinas são substâncias que protegem as plantas contra danos dos raios ultravioletas. Estas são responsáveis pela coloração do vinho tinto e a cor vermelha e azul encontrada na casca da uva, como também em outras plantas e alimentos da dieta. Desempenham papel antioxidante nas plantas, protegendo-as de radicais livres (ROBICHAUD; NOBLE, 1990). Estes pigmentos apresentam atividade supressiva tumoral, anti-inflamatória, antiviral e propriedades antidiabéticas (HOU, 2003; KNOX, et al., 2001; ROSSI, et al., 2003; TSUDA, et al., 2003). Possuem também propriedades vasoativas e vasoprotetoras em artérias coronárias de porco (DAVID; GOCHENAUR, 2006).

Um estilbeno bastante encontrado em uvas é o resveratrol (3, 4, 5 – trihidróxiestilbeno), uma fitoalexina encontrada em muitos alimentos, tais como casca de uva e sementes, amendoins, vinhos tintos, sendo produzida como uma resposta ao ambiente estressante ou infecção fúngica (KASDALLAH-GRISSA et al, 2007; RODRIGUE, et al, 2001).

O efeito isolado do resveratrol em tecidos e órgãos também foi descrito e inclui mecanismos que diminuem o dano arterial, diminuindo a atividade da angiotensina II, aumentando a atividade do NO e diminuindo a agregação

plaquetária. Efeitos anti-isquêmicos também foram descritos e incluem estimulação de vias relacionadas à sobrevivência celular, diminuição da peroxidação de LDL, diminuição do ateroma (OPIE; LECOUR, 2007).

Estudos demonstraram que vasorelaxamento mediado por compostos polifenólicos do vinho tinto envolvem a participação do óxido nítrico (MOURA, et al., 2004; CHATAIGNEAU, et al., 2003). Estes compostos promoveram um aumento da síntese e posterior liberação do óxido nítrico quando testados em células endoteliais humanas de veia umbilical (HUVEC) (LEIKERT, et al, 2002). Eles também melhoraram a neovascularização e a recuperação do fluxo sanguíneo após isquemia em condições hipercolesterolêmicas em camundongos (LEFÈVRE et al., 2007).

Ndiaye et al (2003, 2004), estudaram os efeitos dos compostos polifenólicos do vinho tinto em artéria coronária de porco, indicando que este efeito vasodilatador ocorre pela estimulação da formação endotelial de óxido nítrico e do fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF), sensível a eventos de oxi-redução que parecem ser criticamente dependentes da formação intracelular de ânions superóxido e H_2O_2 em células endoteliais por uma enzima dependente de flavina. Essas espécies reativas de oxigênio são mediadores chave intracelulares de formação rápida e sustentada de NO em células endoteliais pela via de transdução de sinal PI_3 -kinase/Akt pela fosforilação de Akt e da sintase do NO. Portanto, o vasorelaxamento de compostos polifenólicos do vinho tinto foram sensíveis aos antioxidantes, e as respostas de relaxamento e hiperpolarização foram suprimidas pela forma permeável à membrana de superóxido dismutase - SOD (PEG-SOD), enquanto que SOD extracelular não apresentou efeito.

Por todos os benefícios demonstrados pelos compostos polifenólicos do vinho tinto no sistema cardiovascular, vários estudos têm buscado avaliar seus efeitos sobre pressão arterial. Diebolt, et al., (2001) observaram que a administração oral de compostos fenólicos do vinho tinto produziu uma redução significativa na pressão arterial sanguínea em ratos normotensos. Moura et. al, (2004) demonstraram um efeito anti-hipertensivo substancial de liofilizado de vinho tinto através de administração oral em ratos com hipertensão arterial induzida por NG-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) um inibidor da sintase do NO, e que esta ação anti-hipertensiva provavelmente envolve mecanismos como a redução na síntese de endotelina-1, e aumento na liberação de EDHF.

Corder, et. al. (2001); López-Sepúlveda, et al, (2008) sugerem que o tratamento crônico com compostos fenólicos do vinho tinto em animais hipertensos, reduz a hipertensão e a disfunção vascular pela diminuição do estresse oxidativo vascular, aumento da bioatividade do NO e redução da síntese de endotelina 1. A administração oral de quercetina em ratos hipertensos reduziu a pressão sanguínea e a hipertrofia renal e cardíaca, provavelmente devido a suas propriedades antioxidantes (DUARTE, et al., 2001).

Apesar da existência de diversas pesquisas com vinhos no mundo, são poucos os estudos existentes sobre a composição e propriedades biológicas dos vinhos brasileiros, provavelmente devido ao fato do Brasil não ser considerado um país da América do sul tradicional na produção de vinhos, ao contrário de outros países como Chile e Argentina que estão entre os maiores produtores mundiais de vinhos (FAOSTAT, 2011).

No Brasil, um conjunto de regiões vitivinícolas é encontrado nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Quatro regiões estão direcionadas à produção de vinhos finos: Serra Gaúcha, Campanha e Serra do Sudeste no estado do Rio Grande do Sul e a região do Vale do Rio São Francisco, no Nordeste Brasileiro (TONIETTO, 2001).

Entre as regiões de viticultura diferentes, o Vale do São Francisco é atualmente o segundo maior produtor de vinho no Brasil. Está situada na fronteira entre os estados da Bahia e Pernambuco, em 8-9S (latitude) e cerca de 40W (longitude), caracterizado por um clima semi-árido, com níveis muito altos de exposição à luz solar (HIRSCH, 2005).

Em estudo realizado com vinhos da região do Vale do São Francisco foi observado um alto conteúdo de polifenóis totais, assim como de quercetina, um flavonóide com considerável atividade antioxidante. O cis-resveratrol foi encontrado em concentração cinco vezes maior que o seu isômero trans. Este perfil polifenólico provavelmente está relacionado às técnicas específicas enológicas utilizadas na fabricação de vinho na região, bem como a adaptação da uva. O clima e condições técnicas de viticultura adotadas no Vale do São Francisco, incluindo o uso de irrigação controlado por estresse (que consiste em restringir água para as uvas depois da irrigação), podem contribuir para o perfil fenólico destes vinhos (LUCENA, et al., 2010).

Portanto, levando-se em consideração os estudos científicos já existentes sobre vinhos tintos no cenário mundial, seus benefícios ao sistema cardiovascular e a escassez de estudos sobre os vinhos brasileiros, em especial aos vinhos produzidos na região do Vale do São Francisco, aliado aos excelentes achados sobre a composição dos vinhos tintos dessa região, buscou-se investigar os efeitos cardiovasculares do liofilizado do vinho tinto produzido no Vale do São Francisco em ratos normotensos e hipertensos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco (LTVSF), cepa da uva (*Cabernet Sauvignon*), safra 2006, através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro* em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME), elucidando os mecanismos de ação implicados nas respostas obtidas.

2.2 Específicos

2.2.1 Efeitos cardiovasculares específicos

Testes *in vivo*

- Caracterizar o efeito do LTVSF sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos e hipertensos L-NAME não anestesiados.

Testes *in vitro*

- Avaliar o efeito do LTVVSF sobre a resposta vasorelaxante em artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, avaliando:
 - A influência dos fatores relaxantes derivados do endotélio na resposta vasorelaxante induzida por LTVVSF.
 - A participação dos canais para potássio na resposta vasorelaxante induzida por LTVVSF.
 - A participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vasorelaxante induzida por LTVVSF.

- Avaliar a presença de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio através de ensaios bioquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (Figura 2), pesando entre (200-300 g), todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba – LTF/UFPB



Figura 2 – Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

Todos os animais foram mantidos sob condições controle de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro e escuro de 12 horas (6h00 às 18h00), e com livre acesso a água e a alimentação. Os experimentos foram realizados no período de 7h00 as 17h00 (*in vivo*) e de 7h00 às 19h00 (*in vitro*). Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF (CEPA) sob o número 0310/08

3.2 Drogas e reagentes

Durante o desenvolvimento dos experimentos foram utilizadas diversas substâncias tais como: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), cloridrato de L (-) fenilefrina, sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina, L-NAME (NG-nitro-L-arginina-metil éster), nitroprussiato de sódio (NPS), indometacina, ODQ (1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a] Quinoxalin -1 - One), tetraetilamônio (TEA), caribdotoxina, dimetilsulfoxido, (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA), N-acetilcisteína, apocinina, tempol, diacetato/diaminofluoresceína (DAF-2/DA), (Calbiochem®). Para preparação das soluções, a indometacina foi dissolvida em bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 5% em água destilada. O ODQ foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. As demais substâncias utilizadas foram dissolvidas em água destilada. Todas as soluções foram mantidas em temperatura de 0°C por ocasião da realização dos experimentos. A substância teste LTVVSF foi dissolvida em água destilada, nos experimentos *in vitro*, para obtenção da solução mãe 20 µg/ml. Para os experimentos *in vivo* o LTVVSF foi dissolvido em solução salina a uma solução mãe de 90 mg/mL. Ambas as soluções foram diluídas para as demais concentrações utilizadas.

3.3 Soluções nutritivas

Os sais utilizados em todas as preparações das soluções nutritivas foram: cloreto de sódio (NaCl, 158,3 mM), cloreto de potássio (KCl 4 mM), cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂ 2 mM), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂ 1,05 mM), glicose (C₆H₁₂O₆ 5,6 mM), bicarbonato de sódio (NaHCO₃ 10 mM), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH₂PO₄ 0,42 mM) (Merck, Darnstadt Alemanha), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 1mM), (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA). No preparo da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM a concentração de Na⁺ foi isosmoticamente alterada. Após o preparo das soluções mediu-se o pH e foi feito o ajuste para 7,4 quando necessário.

As tabelas a seguir mostram as composições das soluções nutritivas:

Tabela 1- Composição da Solução nutritiva de Tyrode

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl₂	2,0
MgCl₂	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄	0,4
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999

Tabela 2 – Composição da solução de Tyrode despolarizante – KCl (20mM)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl₂	2,0
MgCl₂	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄	0,4
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999

3.4 Preparação do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco (LVTVSF)

Para preparação do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco (LVTVSF) o etanol foi evaporado sob baixa pressão a 55° C, até redução de

aproximadamente 50% do volume original. O resíduo líquido foi liofilizado e mantido em freezer a -20° C até uso em teste (MOURA, et al., 2004).

3.5 Determinação dos constituintes químicos do vinho tinto do Vale do São Francisco

3.5.1 Determinação de polifenóis totais

O conteúdo total de polifenóis do LVTVSF foi medido em espectrofotômetro (Varian 50 Bio UV/Vis) a 760 nm, após diluição e reação com reagente fenólico Folin-Ciocalteu estabilizada com solução saturada de carbonato de sódio. A amostra foi analisada em triplicata e o conteúdo total de polifenóis foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico/litro de vinho (mg GAE/L) (MIRA, et al., 2008). Os dados foram expressos como média \pm e.p.m.

3.5.2 Determinação de flavonóis por CLAE/UV (cromatografia líquida de alta eficiência/ultravioleta visível)

A identificação e quantificação dos flavonóis foi realizada em cromatógrafo líquido Ultimate 3000 Dionex®, com coluna analítica Acclaim® 120 Dionex C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), comprimento de onda de 370 nm, fluxo da fase móvel de 0,5 mL.min⁻¹, temperatura do forno de 36 °C, volume de injeção de 20 μ L. A fase móvel foi preparada pela mistura de ácido fórmico 1 % em água ultra-pura (Milli-Q, Millipore®) - 52,7 % -, acetonitrila grau HPLC 47,3 % e o pH ajustado para 2,5 com ácido fórmico. A separação dos flavonóis (miricetina, quercetina e caempferol) ocorreu em 12 minutos, e foram quantificados em curva analítica com concentrações variando de 0,1 a 7,0 mg.L⁻¹, por padronização externa (VUORINEN et al., 2000). As amostras foram diluídas a 10% com fase móvel e filtradas a 0,45 μ m. A amostra foi analisada em triplicata e o conteúdo de quercetina, miricetina e caempferol foi expresso em microgramas/mililitro de vinho (μ g/mL). Os dados foram expressos como média \pm e.p.m

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos- Departamento de Nutrição - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco.

3.6 Ensaios farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes abordagens, uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando ratos Wistar, e outra com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar e células endoteliais de aorta de coelho.

3.6.1 Medida da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não-anestesiados

Os ratos normotensos foram anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) para procedimento cirúrgico que consiste na implantação de cateteres de polietileno (PE). Um segmento de cateter PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) foi soldado a um segmento de cateter PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente) em seguida fez-se a implantação dos mesmos na aorta abdominal e veia cava caudal, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados por uma incisão na região cervical posterior do animal.

A PA e FC foram medidas 24 horas depois do procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição (PowerLab, ADInstruments, Austrália) conectado a um computador instalado com o software LabChart 5,0 (AD Instruments, Austrália) (Figura 3). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou as pressões arterial sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca. O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas.



BRAGA V. A. 2010

Figura 3 – Aparato utilizado para experimentos *in vivo*.

3.6.2 Hipertensão L-NAME e tratamento crônico com LTVSF

Dois grupos (A e B), cada um com 6 ratos foram tratados oralmente com L-NAME (40 mg/Kg) dissolvidos na água por 21 dias, para a instalação da hipertensão L-NAME. O grupo A recebeu apenas L-NAME e o grupo B, após o 12º dia recebeu L-NAME adicionado do LTVSF (100mg/kg). A pressão arterial dos dois grupos foi medida após o 21º dia.

3.6.3 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Os ratos foram sacrificados por guilhotina. Após uma incisão no abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi retirada e livre de tecido conectivo e adiposo (Figura 4), foi seccionada em anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm). Os anéis foram mantidos em cubas (Figura 5), contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. Esses anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) (Figura 6) para o registro das tensões isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão

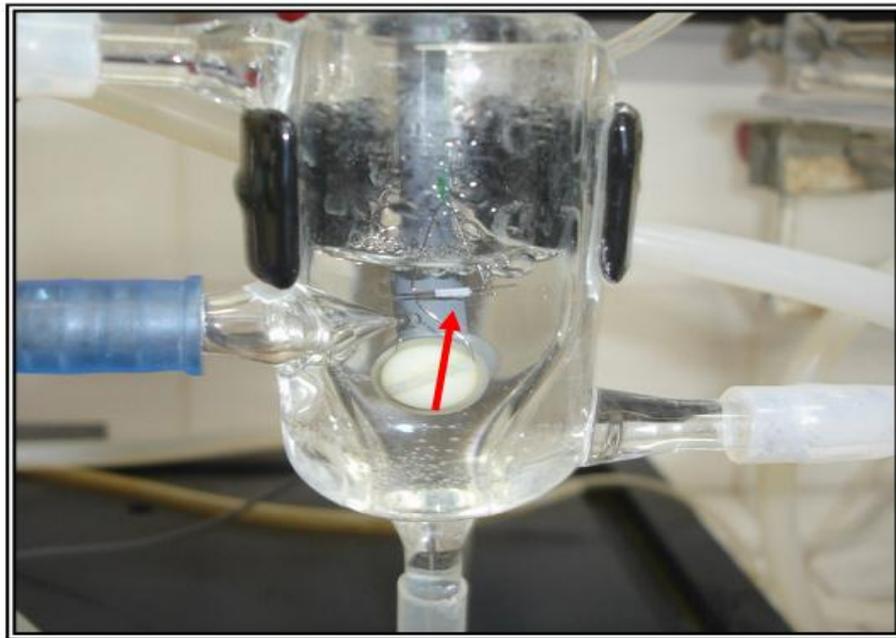
constante de 0,75 g por um período de 60 min. Durante este tempo, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Foram utilizados anéis com e sem endotélio vascular. Para verificar a presença do endotélio vascular, os anéis foram contraídos com 10 μM de fenilefrina (FEN), em seguida foi adicionado à cuba 10 μM de acetilcolina (ACh). Os anéis que apresentaram relaxamento causado pela ACh igual ou superior a 80% foram considerados com endotélio funcional. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10% foram considerados sem endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) (Figura 7). Os anéis sem endotélio foram obtidos mecanicamente por do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal. Os anéis com relaxamentos entre 10 e 80% foram desprezados.



FIALHO F. F. 2009

Figura 4 - Artéria mesentérica superior isolada de rato



FIALHO F. F. 2009

Figura 5 – Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato em solução de Tyrode.



Figura 6 - Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

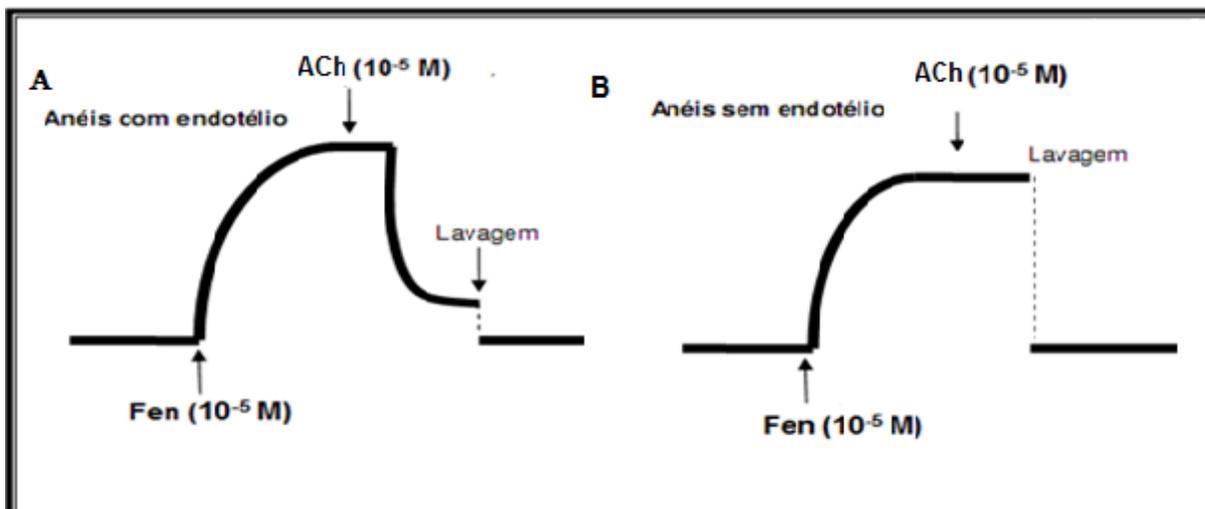


Figura 7 – Representação esquemática do protocolo para a verificação do endotélio funcional.

3.7 Protocolos experimentais para estudos *in vivo*

3.7.1 Efeito do LTVVSF sobre a pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e FC em ratos normotensos

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, 24 horas após a implantação dos cateteres vasculares, os animais foram mantidos em aclimação ao ambiente onde foram realizados os experimentos por no mínimo 30 min. para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Em seguida doses do LTVVSF (10, 30 e 90 mg/kg, i.v.) foram administradas aleatoriamente (Figura 8), com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores basais. O tempo de retorno dos parâmetros cardiovasculares observado após a administração do LTVVSF foi cerca de 10 minutos. Os valores de PAM, PAS, PAD e FC foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração da substância, e suas variações foram expressas em porcentagem, conforme demonstrado nas equações 1 e 2.

$$(1) \text{ Valores de PA (\%)} = \frac{(\text{PA depois} - \text{PA antes}) \times 100}{\text{PA antes}}$$

PA antes

$$(2) \text{ Valores de FC (\%)} = \frac{(\text{FC depois} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}}$$

FC antes

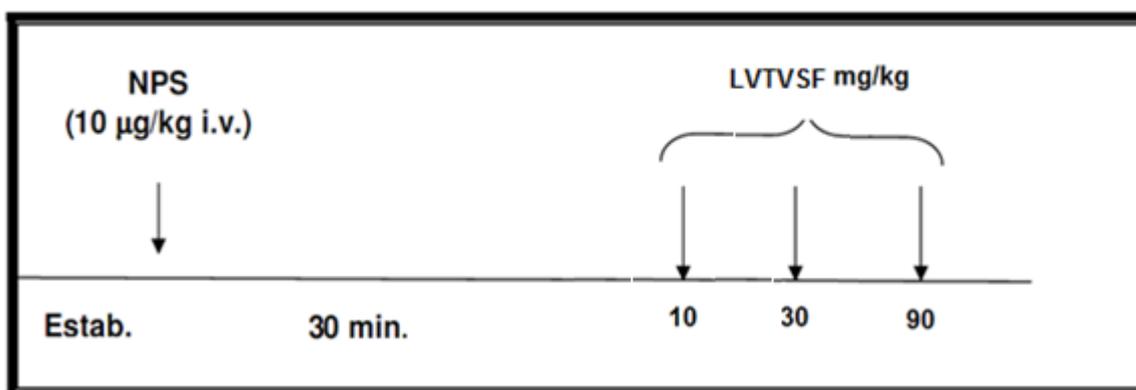


Figura 8 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de LTVSF sobre PAM e FC em ratos normotensos não-anestesiados.

3.7.2 Efeito do LTVSF sobre a PAM e FC em ratos hipertensos L-NAME

Para a medida da PAM e FC, os animais foram mantidos em aclimação ao ambiente onde foram realizados os experimentos, por um período de no mínimo 30 min. para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Após o retorno dos parâmetros hemodinâmicos dos animais, verificou-se a PAM e FC dos animais hipertensos L-NAME e hipertensos L-NAME tratados com LTVSF, na dose de 100 mg/Kg. Essa dose corresponde a aproximadamente duas taças de vinho (210 mL) para um indivíduo adulto por dia, dose recomendada para proteção vascular (ELLISON, 2002; MOURA et. al, 2004).

3.8 Protocolos experimentais para estudos *in vitro*

3.8.1 Curva concentração-resposta do LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Após o período de estabilização e posterior verificação do endotélio funcional, como descrito no item 3.6.3, foi induzida uma contração FEN 10 μM e concentrações crescentes do LTVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 $\mu\text{g/mL}$), foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta na presença ou ausência do endotélio vascular (Figura 9). O relaxamento foi expresso como a porcentagem reversa da contração induzida por FEN e a eficácia do efeito vasorelaxante do LTVSF foi avaliada utilizando-se os valores de $E_{\text{máx}}$. Nos experimentos subsequentes foram utilizados apenas anéis com endotélio vascular.

Para a determinação do mecanismo de ação envolvido no vasorelaxamento do LTVSF os anéis foram pré-incubados com as seguintes ferramentas farmacológicas: L-NAME (100 μM), um inibidor competitivo da enzima sintase de NO (RESS, et al., 1990), ODQ (10 μM), um inibidor específico da ciclase de guanilil solúvel (GARTHWAITE, et al., 1995), KCl (20 mM) um modulador do efluxo do íon potássio (CAMPBELL; HARDER, 1996), TEA (1 mM), um inibidor dos canais para potássio (ALIOUA et al., 1998), caribdotoxina (0,2 μM) + apamina (0,2 μM) indicadores da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (GARCIA-PASCUAL, et al., 1995), (VOGALIS, et al., 1998), indometacina (10 μM), um inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase (COX) (VANHOUTTE, 2009), atropina (1 nM), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (SAWAYER, 1999), N-acetilcisteína (10 mM), um sequestrador de radicais livres (NDIAYE et al., 2003), tempol (100 μM), um mimético da superóxido dismutase (SOD) (HERNANZ, et al 2004), apocinina, um inibidor da NADPH oxidase (10 μM) (VIRDIS, et al., 2010) (Figura 10).

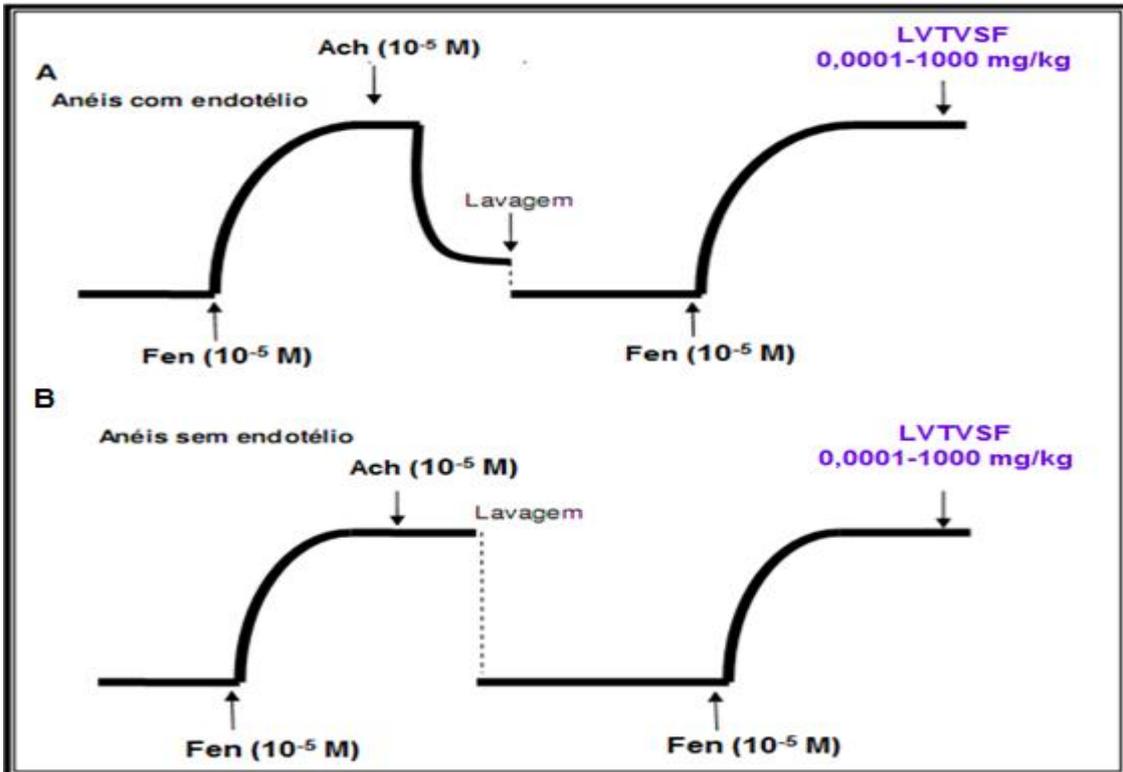


Figura 9 – Protocolo experimental para avaliação do efeito do LTVVSF na presença e na ausência do endotélio funcional.

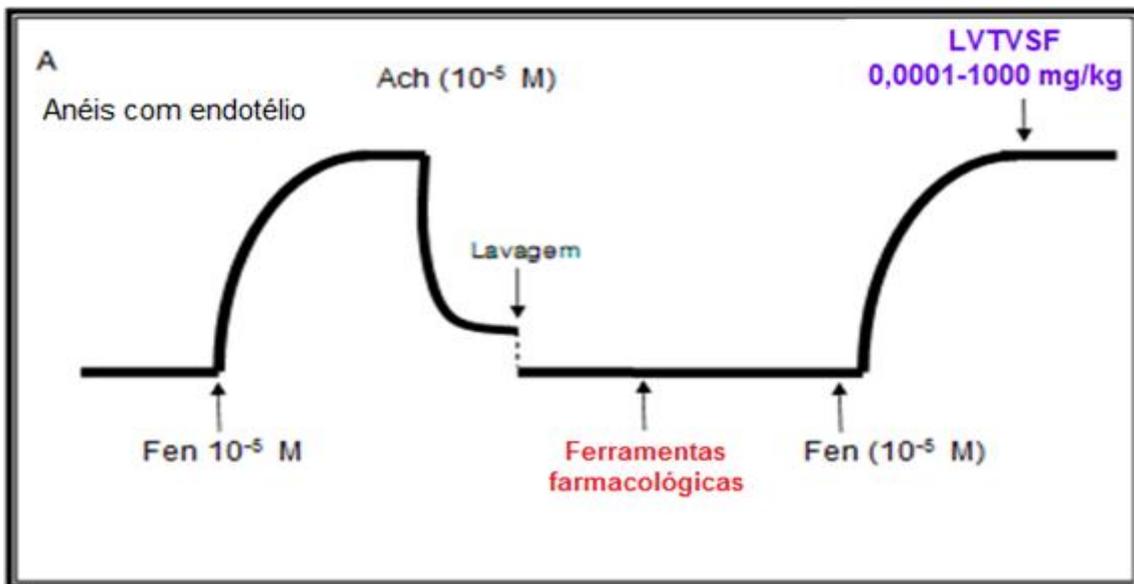


Figura 10 – Protocolo experimental para avaliação do efeito do LTVVSF na presença de ferramentas farmacológicas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio vascular.

3.8.2 Determinação da participação da enzima sintase do NO na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Com a finalidade de investigar a participação do NO na resposta vasorelaxante promovida por LTVSF, os anéis de artéria mesentérica com endotélio vascular foram pré-incubadas com L-NAME (100 μ M), um inibidor competitivo da enzima sintase de NO (RESS, et al.,1990). Após trinta minutos de incubação, induziu-se uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase tônica e sustentada desta contração foram adicionadas cumulativamente concentrações crescentes do LTVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 μ g/mL) para obtenção de uma curva concentração-resposta. O efeito vasorelaxante do LTVSF foi avaliado na ausência e na presença do L-NAME

3.8.3 Influência da enzima ciclase de guanilil solúvel na resposta relaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos

Para investigarmos a participação da enzima ciclase de guanilil solúvel na resposta vasorelaxante promovida por LTVSF, as preparações foram pré-incubadas com ODQ (10 μ M), um inibidor específico desta enzima (GARTHWAITE et al., 1995). Decorridos 30 minutos as preparações foram submetidas a uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e no componente tônico desta contração adicionou-se concentrações crescentes do LTVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 μ g/mL) de maneira cumulativa. O efeito vasorelaxante do LTVSF foi avaliado na ausência e na presença do ODQ.

3.8.4 Avaliação da participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos na presença de KCl (20 mM) ou TEA (1 mM)

Para estudarmos a possível participação dos canais para K^+ no efeito vasorelaxante do LVTVSF, a solução de Tyrode da cuba foi substituída por uma solução de KCl (20 mM) um modulador do efluxo de potássio CAMPBELL; HARDER, 1996). Em outra série de experimentos as preparações foram pré-incubados por 30 minutos com TEA (1 mM), um inibidor dos canais para potássio (ALIOUA et al., 1998). Após o período de incubação foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-5} M), em seguida, na fase tônica desta contração adicionou-se cumulativamente o LVTVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 μ g/ml). As respostas obtidas na presença de KCl (20 mM) ou TEA (1 mM) foram comparadas com as obtidas na ausência dos mesmos.

3.8.5 Determinação da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na resposta relaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos

Com a finalidade de investigar a participação do EDHF na resposta vasorrelaxante promovida por LVTVSF, as preparações foram pré-incubadas com a combinação de duas toxinas que inibem o EDHF, apamina (0,2 μ M) (GARCIA-PASCUAL, et al., 1995) e caribdotoxina (0,2 μ M) (VOGALIS, et al., 1998). Após 30 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase sustentada desta contração adicionou-se de maneira cumulativa LVTVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 μ g/ml). O efeito vasorelaxante do LVTVSF foi avaliado na ausência e na presença desses inibidores.

3.8.6 Verificação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Com a finalidade de avaliarmos a participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico no efeito vasorelaxante, as preparações foram incubadas com indometacina (10 μM), um inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase (COX) (VANHOUTTE, 2009). Após 30 minutos induziu-se uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba LTVVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 $\mu\text{g/mL}$) cumulativamente. A resposta vasorelaxante foi avaliada na ausência e na presença de indometacina.

3.8.7 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no vasorelaxamento induzido por LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Com a finalidade de avaliar a participação dos receptores muscarínicos na resposta vasorelaxante induzida por LTVVSF, as preparações foram previamente incubadas com atropina (1 nM), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (SAWAYER, 1999). Após 30 minutos induziu-se uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba LTVVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 $\mu\text{g/mL}$) cumulativamente. O efeito vasorelaxante do LTVVSF foi avaliado na presença e na ausência de atropina.

3.8.8 Influência da participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

As preparações foram previamente incubadas com N- acetilcisteína (10 mM), um sequestrador de radicais livres (NDIAYE et al., 2003) e após 30 minutos induziu-se uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba LTVVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 µg/mL) cumulativamente. A resposta observada foi comparada com o registro controle obtido na ausência da N-acetilcisteína.

3.8.9 Determinação da participação de ânions superóxidos na resposta relaxante induzida pelo LTVVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos

Os anéis de artéria mesentérica foram pré-incubadas com tempol (100 µM), um mimético da superóxido dismutase (SOD) (HERNANZ, et al 2004) e após 30 minutos induziu-se uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba o LTVVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 µg/mL) cumulativamente. O efeito vasorelaxante do LTVVSF na presença e ausência do tempol foram comparados.

3.8.10 Avaliação da participação da enzima NADPH oxidase na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

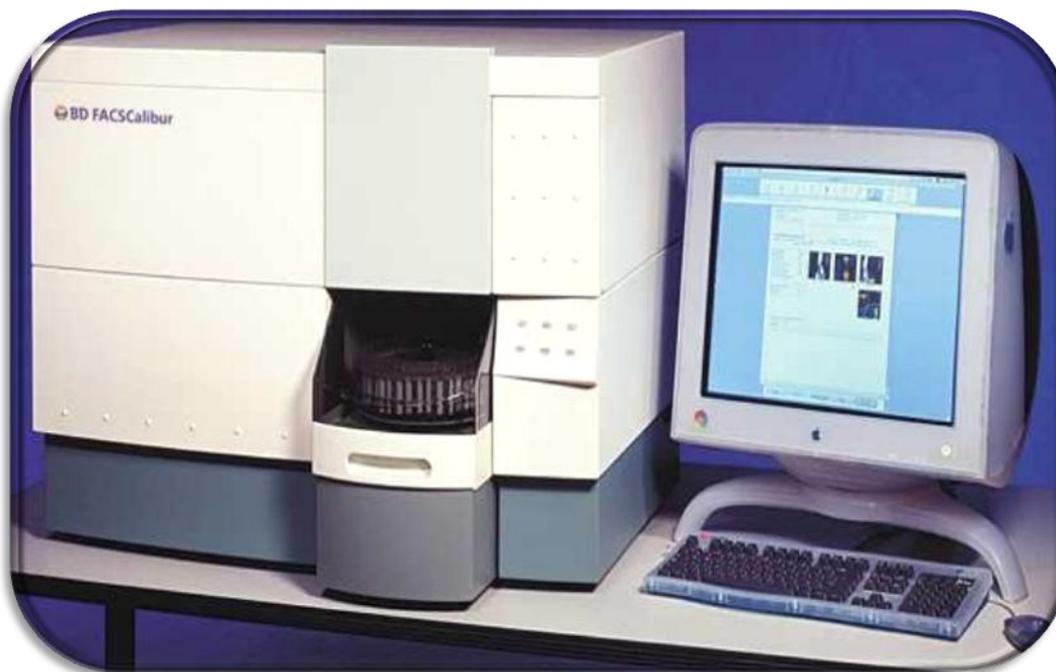
As preparações foram previamente incubadas com apocinina, um inibidor da NADPH oxidase (10 μ M) (VIRDIS et al., 2010). Após 30 minutos induziu-se uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba concentrações crescentes do LTVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 μ g/mL) cumulativamente. O efeito vasorelaxante do LTVSF foi avaliado na presença e na ausência do inibidor da NADPH oxidase.

3.8.11 Determinação da produção de óxido nítrico pelo LTVSF em células endoteliais de aorta de coelho

Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) foram cultivadas em placas de 24 poços em meio F12 (Coon's F12 modificado) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) (KOJIMA, et. al., 1998). A biodisponibilidade de NO em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) foi quantificada expondo as amostras biológicas ao LTVSF (100 e 300 μ g/mL) no momento da incubação com DAF-2 DA (10 mM) por 30 min a 37 ° C. RAEC também foram estimuladas com acetilcolina (10^{-5} M) por 15min. A medição DAF-2 DA para o óxido nítrico é um indicador fluorescente que permite a detecção direta de NO em condições fisiológicas por citometria de fluxo (NAVARRO-ANTOLIN; LAMAS., 2001). A menor concentração de NO liberado pelas células RAEC foi também detectada por DAF, sob as condições basais. Para verificar se o sinal fluorescente obtido após a adição de DAF-2 DA foi dependente da presença de NO, RAEC foi pré-incubada com L-NAME (100 μ M) por 30 min antes da adição de DAF-2 DA e LTVSF (100 e 300 μ g/mL). As amostras foram então lavadas duas vezes com solução tampão fosfato contendo albumina de soro bovino e analisados com 10.000 células por amostra, por citometria de fluxo, utilizando o equipamento FACSCalibur (Becton

Dickinson ®, San Jose, CA, EUA) (Figura 11). Os dados foram analisados pelo WinMDI versão do software 2.9. Assim, as mudanças na produção de óxido nítrico foram expressas como F/F_0 . Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná.



<http://www.bdbiosciences.com/instruments> em: 02/04/2011

Figura 11 - Aparato utilizado para medida de óxido nítrico por citometria de fluxo em células endoteliais de aorta de coelho.

3.8.12 Análise por fluorescência total de Dihidroetidina (DHE) para medida da produção do ânion superóxido

A sonda fluorescente dihidroetidina foi utilizada para avaliação do conteúdo intracelular de ânion superóxido por um leitor de fluorescência. As células RAEC (células endoteliais da aorta de coelho) (5×10^5 /poço) foram tratadas com os seus estímulos (vinho 300 ug/mL, angiotensina 1 μ M) por 4 horas. Posteriormente, as células foram carregadas com dihidroetidina (DHE - 5 μ M) e incubadas em meio F12 (Coon's F12 modificado) por um período de 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após este período de incubação, a reação foi lida em espectrofluorímetro Tecan infinite M200 (Salzburg, Áustria), programa Tecan-i-control, com excitação a 490 nm e emissão a 590 nm. Os resultados deste experimento estão expressos como unidades relativas de fluorescência.

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná.

3.9 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). O teste t de Student não pareado e análise de variância (ANOVA), seguida de Bonferroni foram utilizados quando apropriado. Foram considerados valores estatisticamente significantes quando o $p < 0,05$. Os valores de resposta máxima ($E_{m\acute{a}x}$) para cada experimento foram expressos como percentagem do relaxamento máximo do tônus induzido por fenilefrina (100%). Para todos esses procedimentos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Para as análises bioquímicas, os testes foram realizados em triplicata, os dados foram analisados pelo software WinMDI 2.0 e plotados pelo GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Determinação dos níveis de polifenóis totais e flavonoides no liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco

A quantidade total de polifenóis encontrados no liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco foi 4,2g GAE/L. Os níveis de quercetina (QE), miricetina (MI), e caempferol encontrados foram: $6,37 \pm 0,29$; $3,25 \pm 0,13$; e $0,07 \pm 0,03$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Na Figura 12 estão representados os picos de absorção relativos aos flavonoides encontrados.

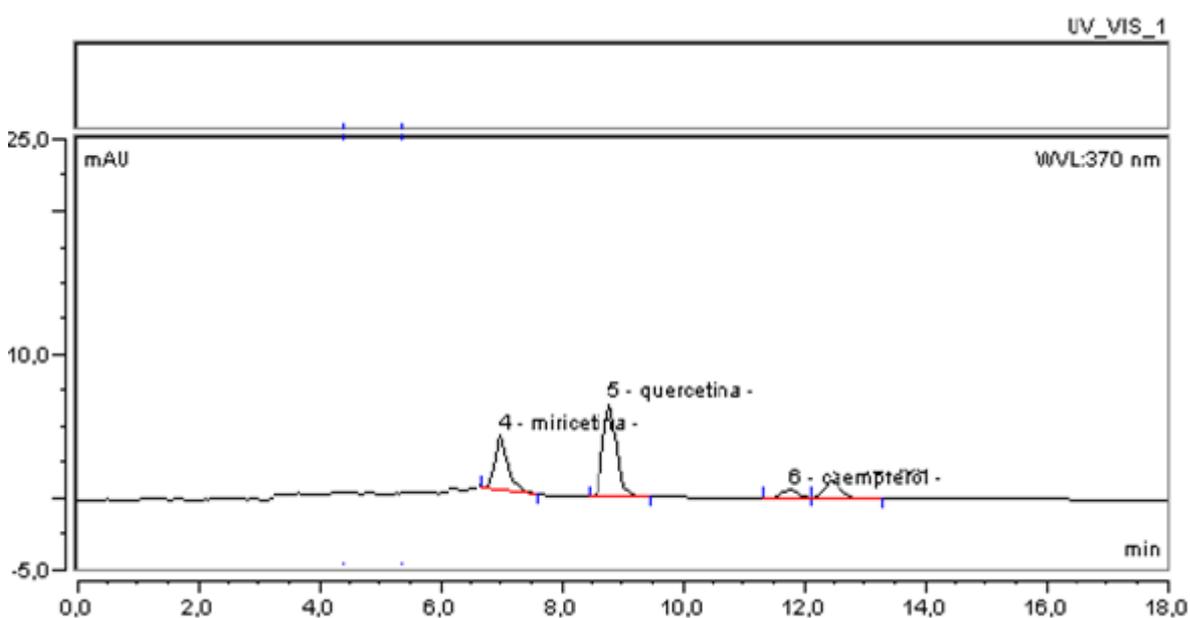


Figura 12 – Cromatograma do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco mostrando a presença dos flavonoides miricetina, quercetina e caempferol.

4.2 Tratamento crônico com LVTVSF (100 mg/Kg/dia) em ratos hipertensos L-NAME, mostrando o efeito do liofilizado sobre a PAM e FC.

Após o período de 21 dias, a PAM do grupo de animais hipertensos L-NAME e do grupo de animais hipertensos L-NAME tratado com o liofilizado foi avaliada. A PAM do grupo hipertenso L-NAME tratado com LVTVSF foi significativamente menor quando comparado ao grupo hipertenso L-NAME não tratado ($143,7 \pm 4,7$ e $172,5 \pm 4,7$ mmHg, respectivamente). Não houve diferença na frequência cardíaca ($399,5 \pm 9,0$ e $421,6 \pm 11,0$ bpm) (Figura 13 A e B).

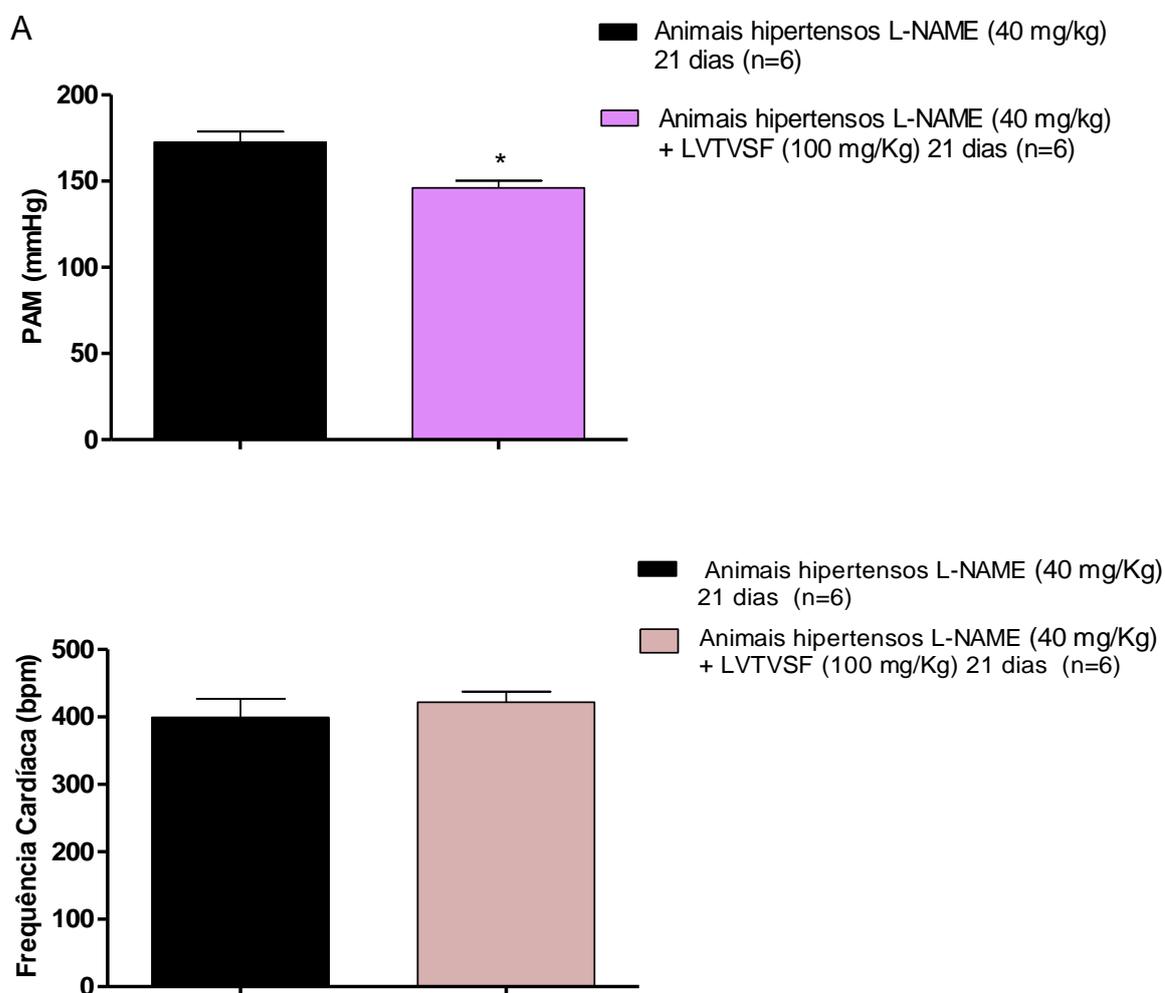


Figura 13– Efeito do LVTVSF em ratos hipertensos L-NAME sobre a PAM (A) e FC (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ animais tratados com L-NAME + LVTVSF (100 mg/Kg) comparado ao grupo de animais hipertensos L-NAME .

4.3 Efeito do LTVSF sobre PAM, PAS, PAD e FC em ratos normotensos não anestesiados.

Após um período de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos a administração aleatória de doses do LTVSF (10, 30 e 90 mg/kg *i.v.*) em ratos normotensos, promoveu queda na PAM ($-24,0 \pm 1,2$; $-32,4 \pm 1,3$; $-51,4 \pm 1,5$ %), resultado da redução na PAS ($-20,4 \pm 1,3$; $-27,0 \pm 2,4$; $-38,7 \pm 2,3$ %) e PAD ($-25,7 \pm 1,2$; $-36,1 \pm 1,0$; $-59,7 \pm 1,5$ %), seguida de taquicardia ($14,5 \pm 2,3$; $19,5 \pm 1,7$; $28,4 \pm 2,1$ %) (Figura 14; Figura 15 A e B).

Os valores basais para PAM e FC em animais normotensos foram ($102,5 \pm 3,2$) e ($370,3 \pm 8,0$) respectivamente.

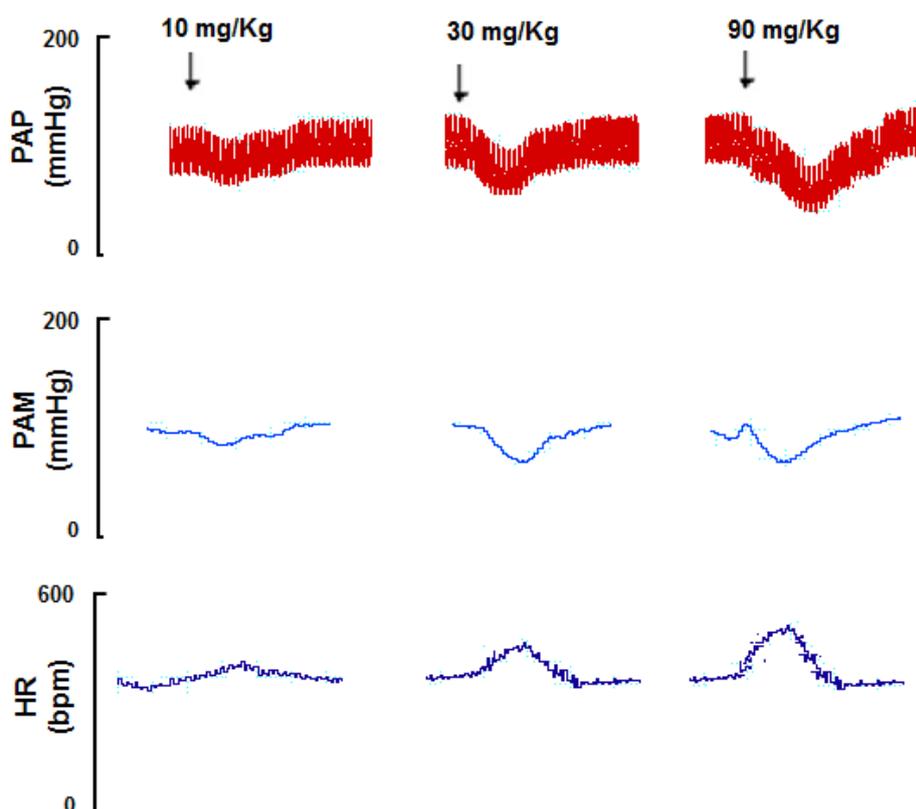


Figura 14 – Registros originais dos valores de PAP (■) PAM (■) e FC (■) obtidos com a administração aguda de doses crescente do LTVSF (10, 30, 90 mg/kg) em ratos normotensos

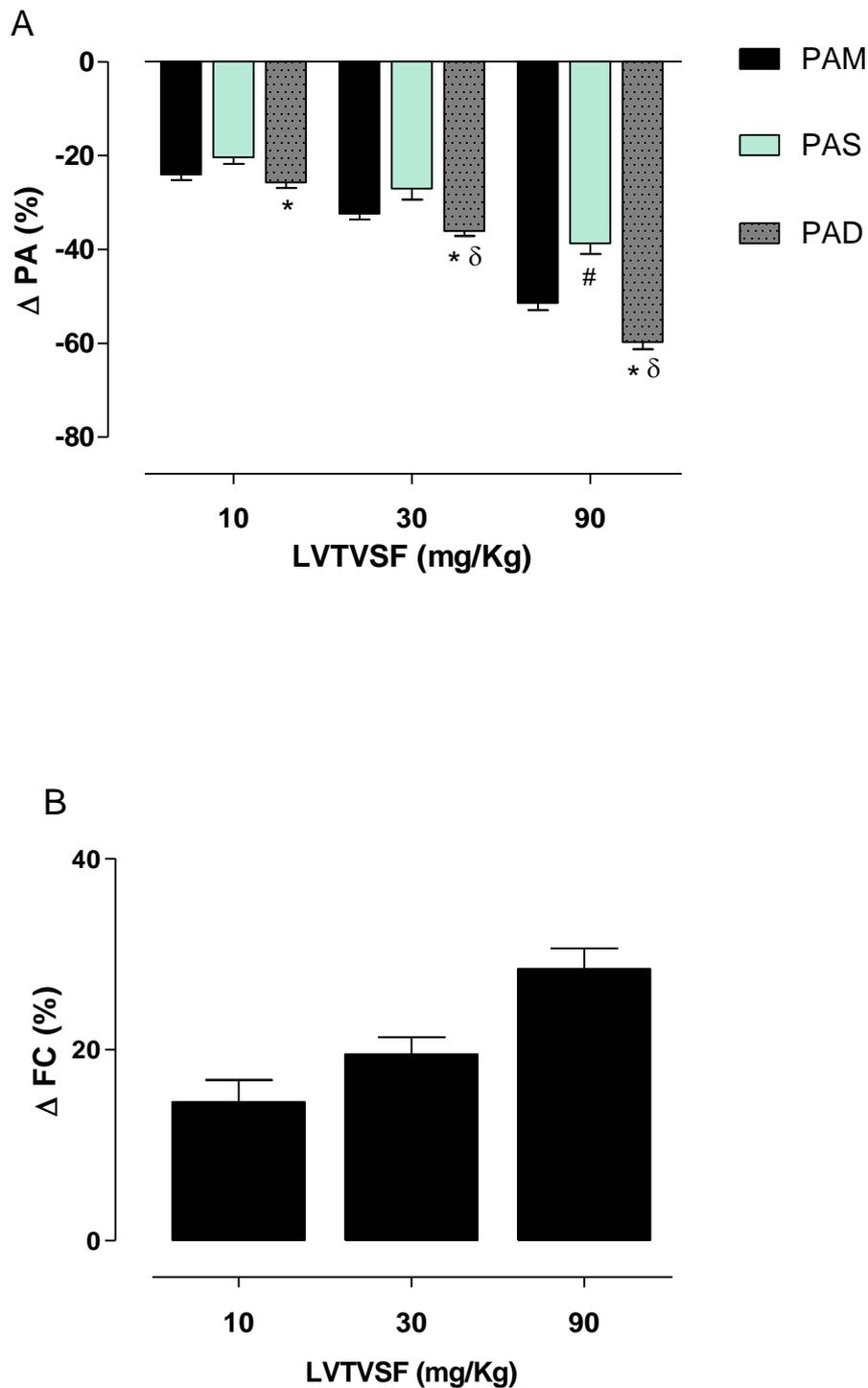


Figura 15– Efeito do LTVSF (10, 30, 90 mg/kg) sobre a PAM, PAS e PAD (A) e FC (B) em ratos normotensos não-anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ PAD versus PAS; # $p < 0,05$ PAM versus PAS; δ $p < 0,05$ PAM versus PAD.

4.4 Efeito do LVTVSF sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados antes e após a administração aguda de L-NAME.

A resposta hipotensora e taquicárdica induzida pelo LVTVSF foi significativamente atenuada na presença do L-NAME (20 mg/Kg i.v.) nas doses de 10, 30 e 90 mg/Kg do LVTVSF ($-3,6 \pm 0,5$; $-6,3 \pm 0,4$; $-12,7 \pm 1,1$ %) e ($6,6 \pm 0,9$; $8,8 \pm 2,8$; $17,2 \pm 3,9$ %) (Figura 16 A e B)

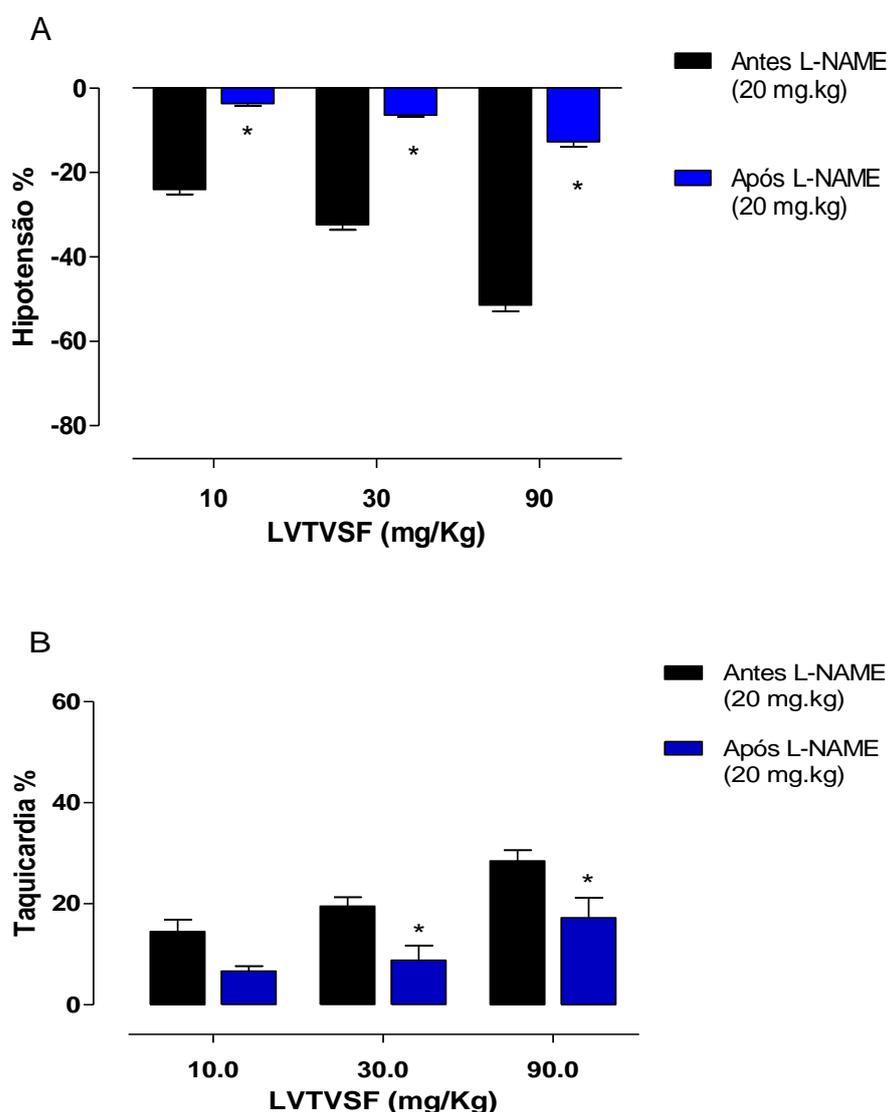


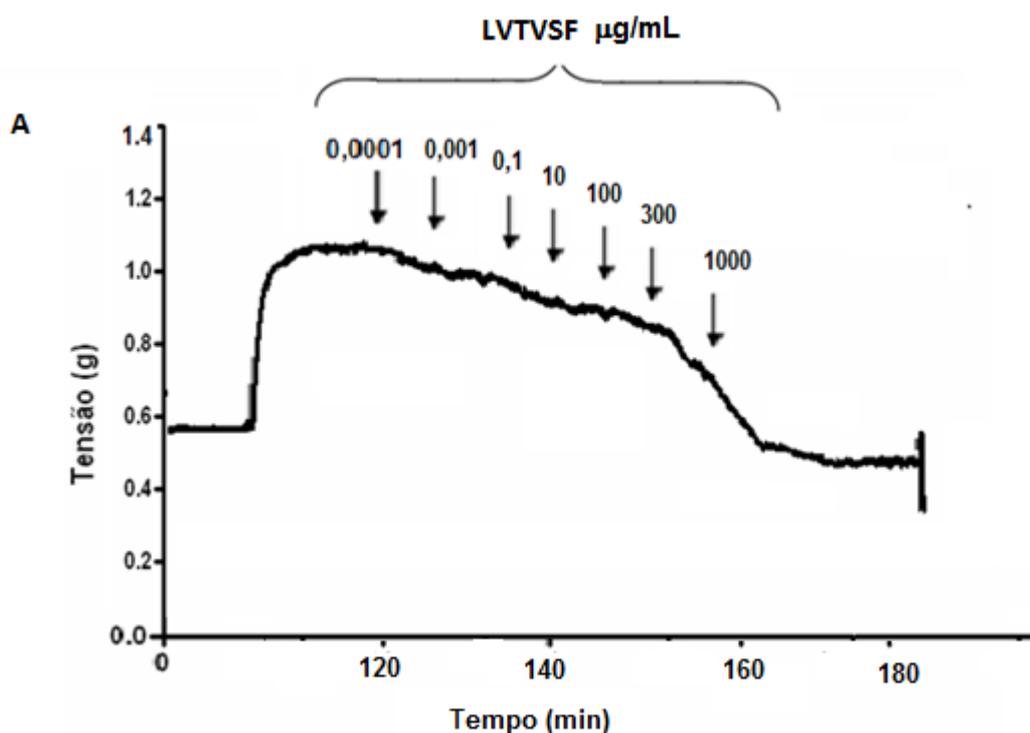
Figura 16 – Efeito do LVTVSF (10, 30, 90 mg/kg) sobre a PAM (A) e FC (B) antes e após a administração do L-NAME (20 mg/Kg i.v) em ratos normotensos não-anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus grupo normotenso sem L-NAME.

4.5 Estudos farmacológicos com o LTVVSF em ratos normotensos - *in vitro*

4.5.1 Efeito do LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contráidos com fenilefrina

Após adição cumulativa do LTVVSF (0,0001; 0,001; 0,1; 10; 100; 300; 1000 $\mu\text{g/mL}$), observou-se um vasorelaxamento de maneira concentração dependente em preparações com endotélio funcional ($E_{\text{max}} = 87,22 \pm 3,59\%$) (Figura 17 A; Figura 19). Após a remoção do endotélio, o vasorelaxamento por LTVVSF foi significativamente atenuado ($E_{\text{max}} = 32,07 \pm 2,07\%$) (Figura 17B; Figura 19). O tempo de relaxamento entre uma concentração e outra foi em média de 5 min.

Após o relaxamento induzido por LTVVSF, as preparações com anéis de artéria mesentérica foram novamente contraídas com fenilefrina, para mostrar a integridade do órgão. Foi observado que houve 100 % de reversão da resposta à fenilefrina. Dados mostrados no traçado original (Figura 18).



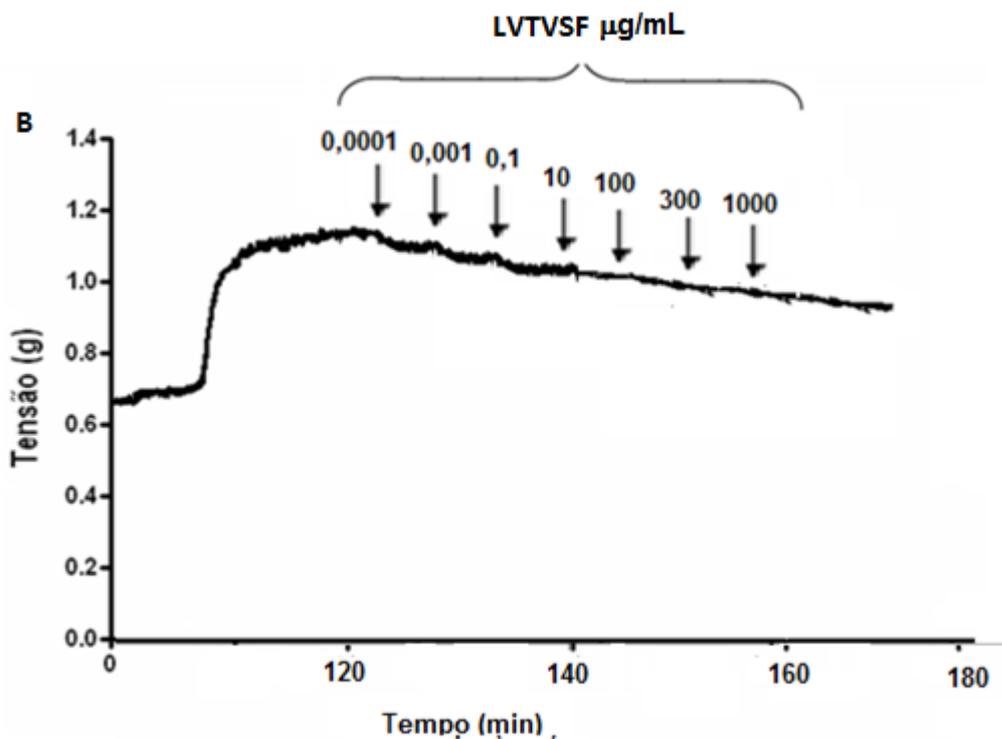


Figura 17 – Registros originais da resposta relaxante do LVTVSF (0,0001 – 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença (A) ou na ausência (B) do endotélio vascular.

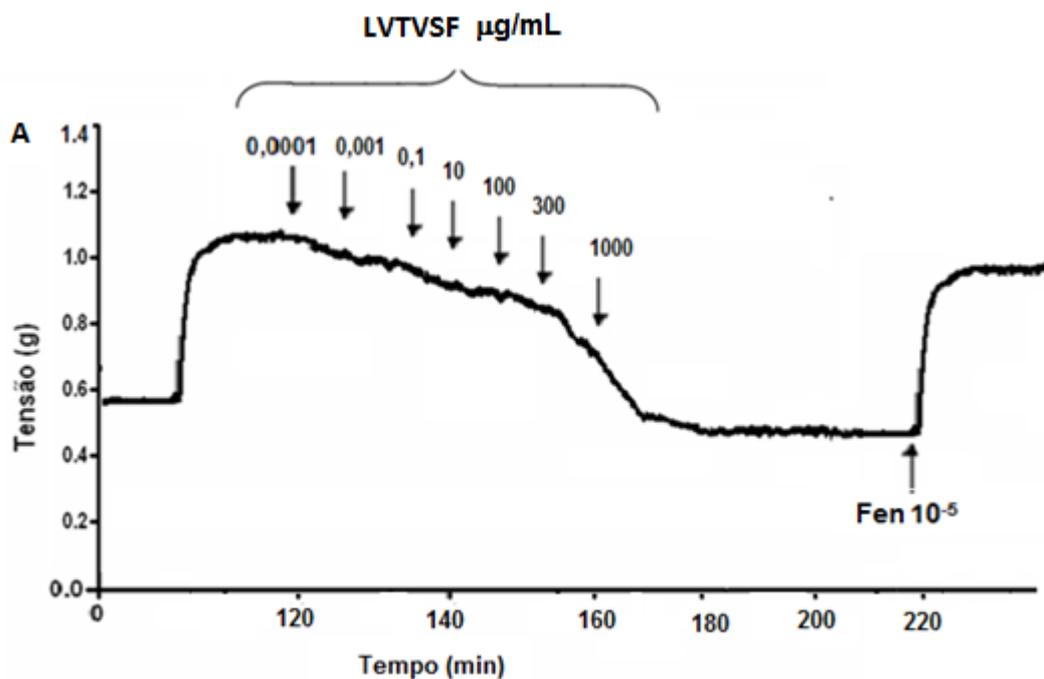


Figura 18 – Registro original mostrando a reversão da contração por fenilefrina (10 µM) em anel de artéria mesentérica superior de rato após o relaxamento induzido por LVTVSF (0,0001 – 1000 µg/mL).

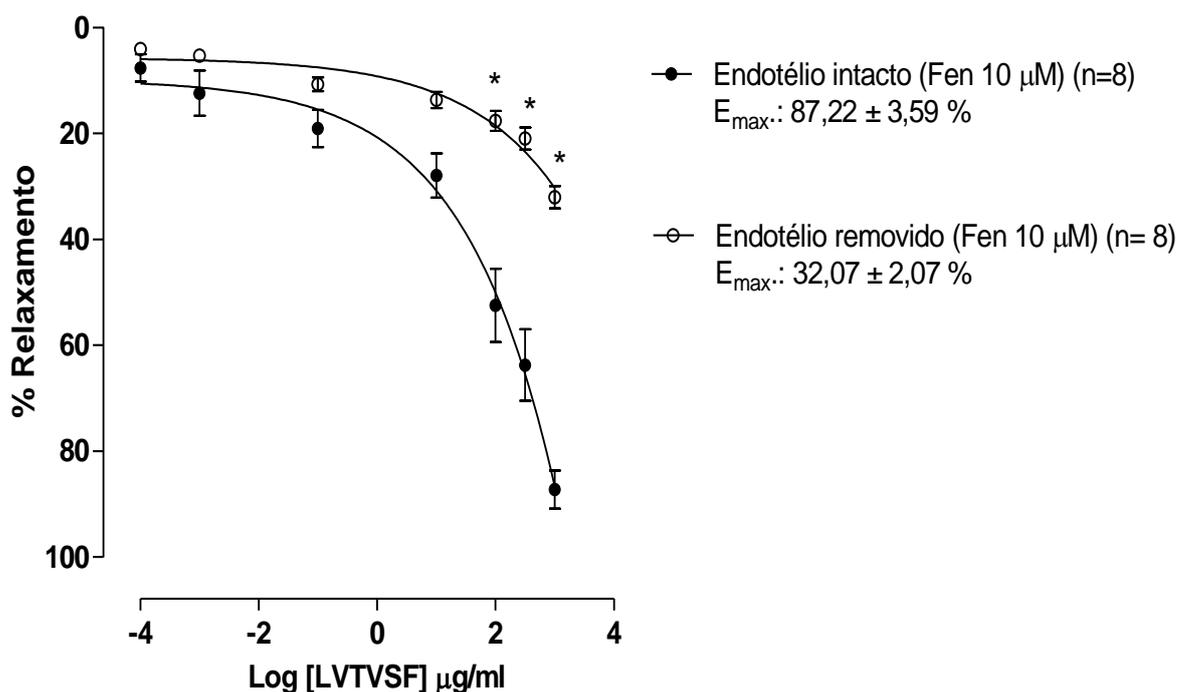


Figura 19- Curvas concentração resposta do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco LTVSF (0,0001 - 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contráidos com fenilefrina (10 µM) na presença (●) e ausência de endotélio funcional (○). Resultados estão expressos como média ± e.p.m. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto.

4.5.2 Participação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Após a inibição da NOS com L-NAME (100 µM), o vasorrelaxamento induzido por LTVSF foi significativamente atenuado ($E_{max}:$ 22,64 ± 3,74 %) quando comparado a resposta obtida na ausência deste inibidor (controle - Fen 10 µM) ($E_{max} = 87,22 ± 3,59$ %) (Figura 20).

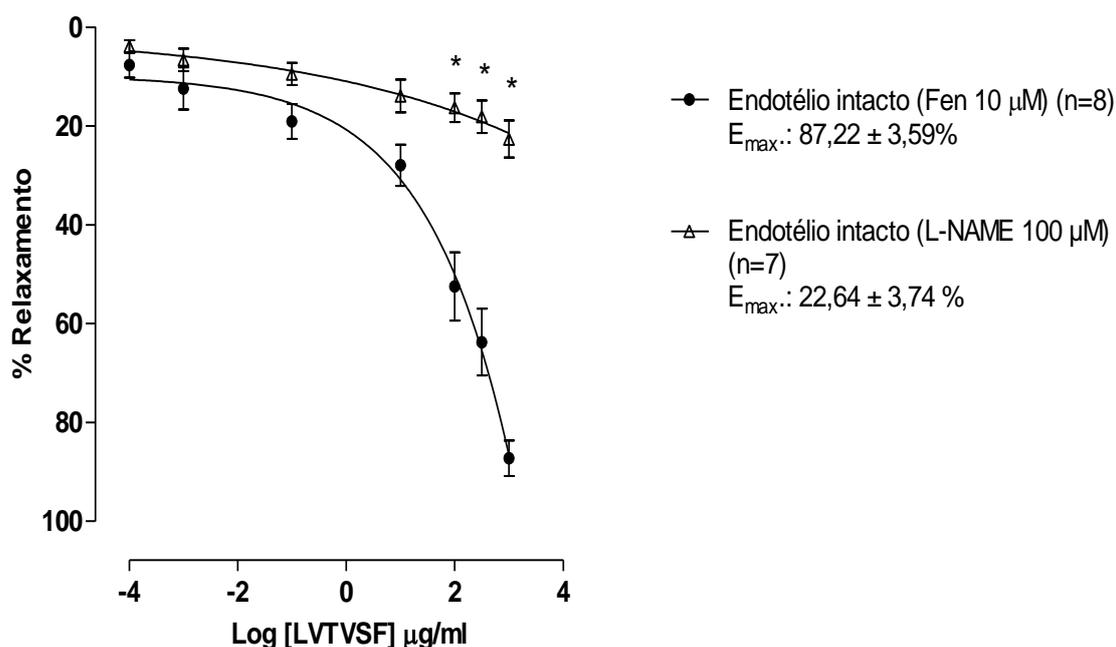


Figura 20- Curvas concentração resposta do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco LTVSF (0,0001 - 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de L-NAME (100 µM) (△) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média ± e.p.m.. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto sem L-NAME.

4.5.3 Envolvimento da enzima ciclase de guanilil solúvel sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Quando as preparações foram incubadas com ODQ (10 µM) houve uma atenuação do vasorelaxamento induzido por LTVSF de maneira significativa ($E_{max} = 37,08 \pm 4,60\%$) quando comparado à resposta obtida na ausência deste inibidor ($E_{max} = 87,22 \pm 3,59\%$) (Figura 21).

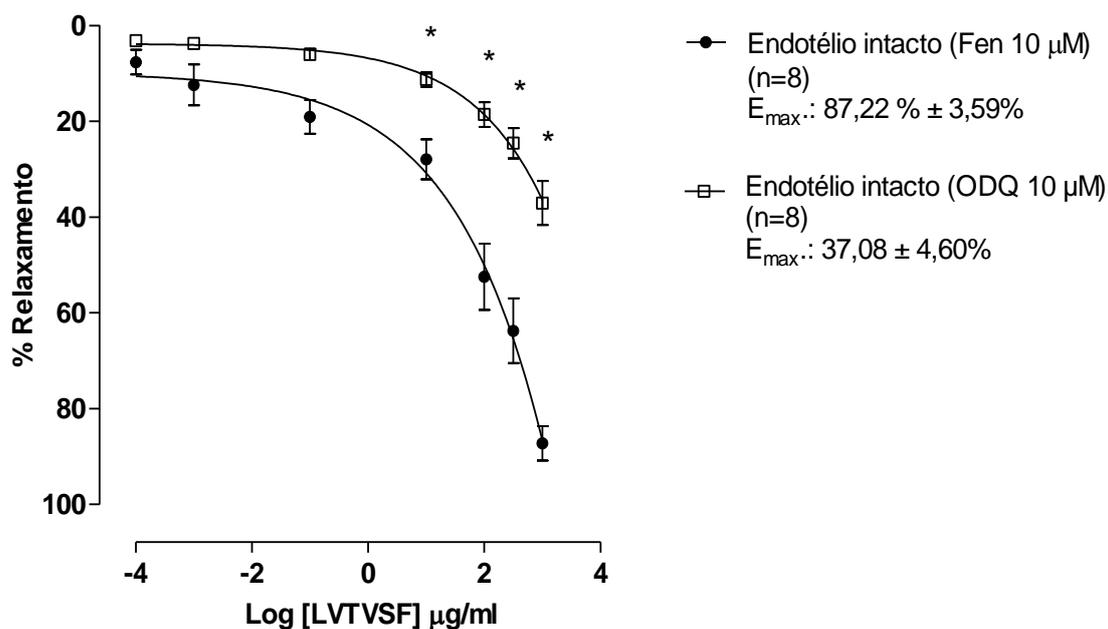


Figura 21- Curvas concentração resposta do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco LVTVSF (0,0001 - 1000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (●) e na presença de ODQ (10 μ M) (□) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média \pm e.p.m.* $p < 0,05$ versus endotélio intacto sem ODQ.

4.5.4 Efeito da resposta vasorelaxante induzida pelo LVTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos na presença de KCl (20 mM) e TEA (1 mM).

A incubação com KCL (20 mM) e TEA (1 mM) promoveu uma atenuação significativa do vasorelaxamento induzido pela adição cumulativa do LVTVSF, em anéis mesentéricos de ratos normotensos ($E_{max} = 46,04 \pm 9,87$ %) e ($E_{max} = 44,40 \pm 5,80$ %) respectivamente, quando comparados a resposta controle (Fen 10 μ M) ($E_{max} = 87,22 \pm 3,59$ %) (Figura 22).

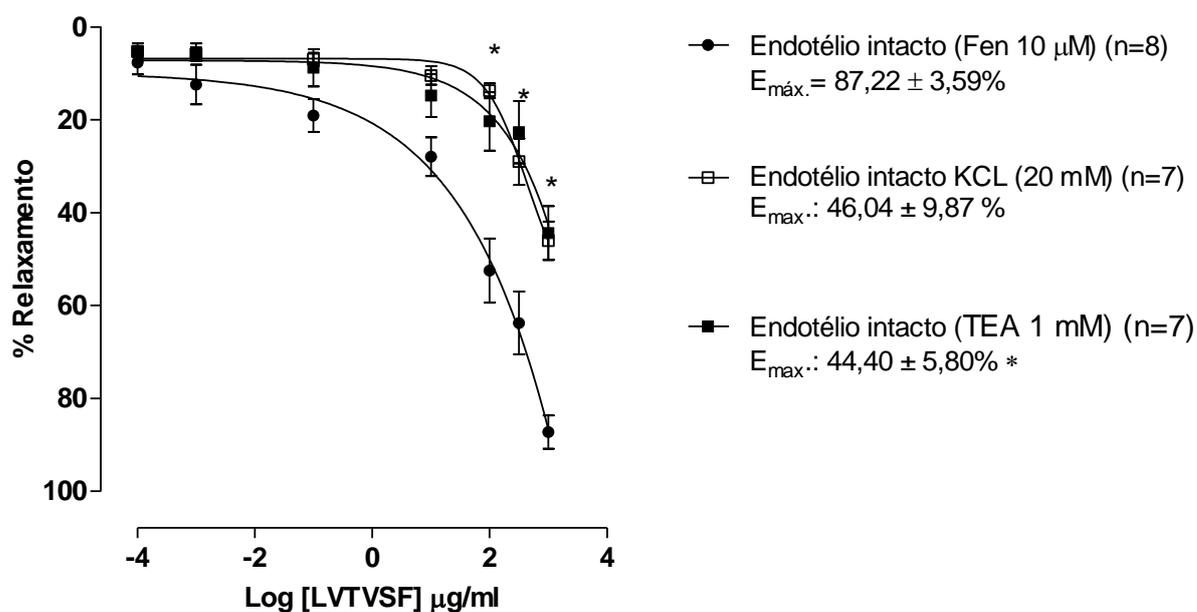


Figura 22- Curvas concentração resposta do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco LVTVSF (0,0001 - 1000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (●) e na presença de KCl (20 mM) (□) ou TEA (1 mM) (■) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto sem KCL 20 mM e TEA.

4.5.5 Determinação da produção de NO em células endoteliais

Em cultura de células endoteliais de aorta de coelho, o LVTVSF (100 e 300 μ g/mL) foi capaz de aumentar a fluorescência induzida pelo aumento dos níveis de NO quando comparado ao controle (100 μ g/ml: $7,9 \pm 0,98$ e 300 μ g/ml: $29,52 \pm 1,79$; % Δ de fluorescência, n = 5, respectivamente), conforme mostrado na figura 23 e 24. Na presença de L-NAME (100 mM), a quantidade de NO induzida pelo LVTVSF foi significativamente atenuada (300 μ g/mL: $14,8 \pm 0,96$; % Δ de fluorescência, n = 5, respectivamente).

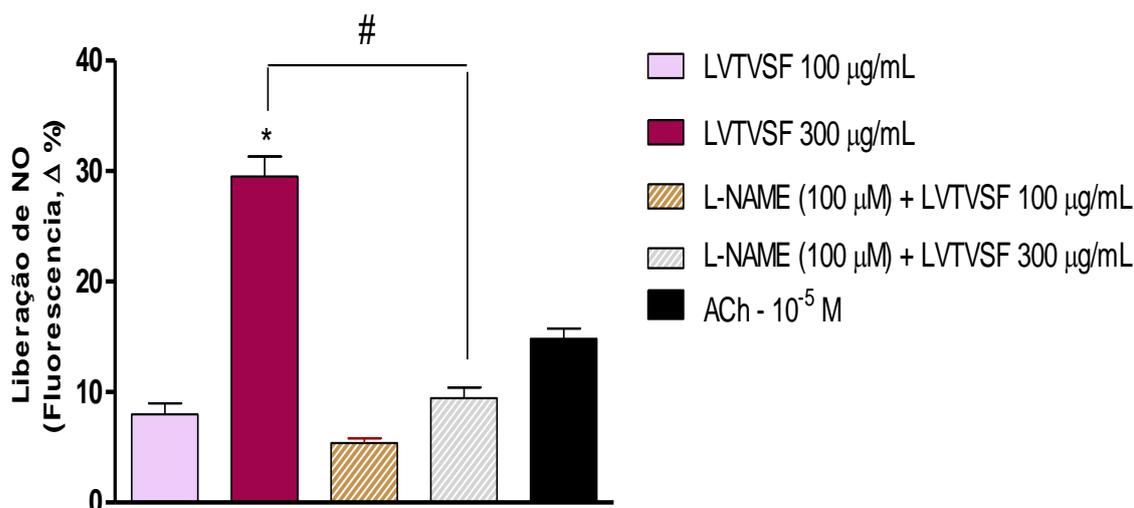


Figura 23 - Efeitos da LTVSF (100 µg/mL), LTVSF (300 µg/mL), L-NAME (100 µM) + LTVSF (100 µg/mL), L-NAME (100 µM) + LTVSF (300 µg/mL) e ACh (10⁻⁵ M) (controle positivo), sobre os níveis de NO expressos em relação a fluorescência em células endoteliais de aorta de coelho. Estes dados são representativos de três experimentos realizados em duplicata. Valores são expressos como média ± e.p.m. * $p < 0.05$ versus a produção pela acetilcolina, # $p < 0.05$ versus L-NAME (100 µM) + LTVSF (300 µg/mL).

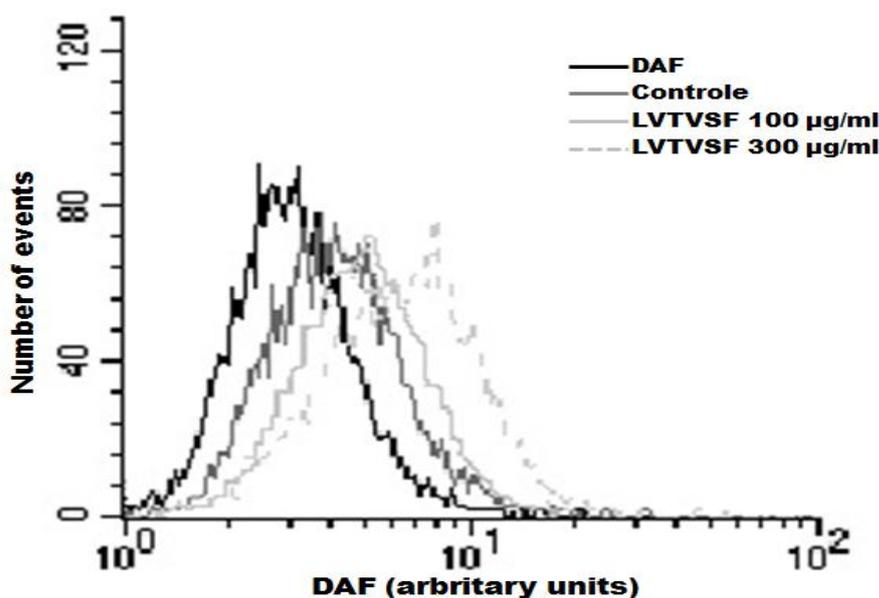


Figura 24 - Registro original da produção de NO em células endoteliais de aorta de coelho por citometria de fluxo.

4.5.6 Avaliação da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na resposta relaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos.

Quando as preparações foram incubadas com caribdotoxina (0,2 μM) mais apamina (0,2 μM) não foi observada nenhuma alteração significativa sobre o relaxamento induzido por LVTVSF ($E_{\text{máx.}} = 78,30 \pm 5,81\%$) quando comparado ao controle (Fen 10 μM) ($E_{\text{max}} = 87,22 \pm 3,59\%$) (Figura 25).

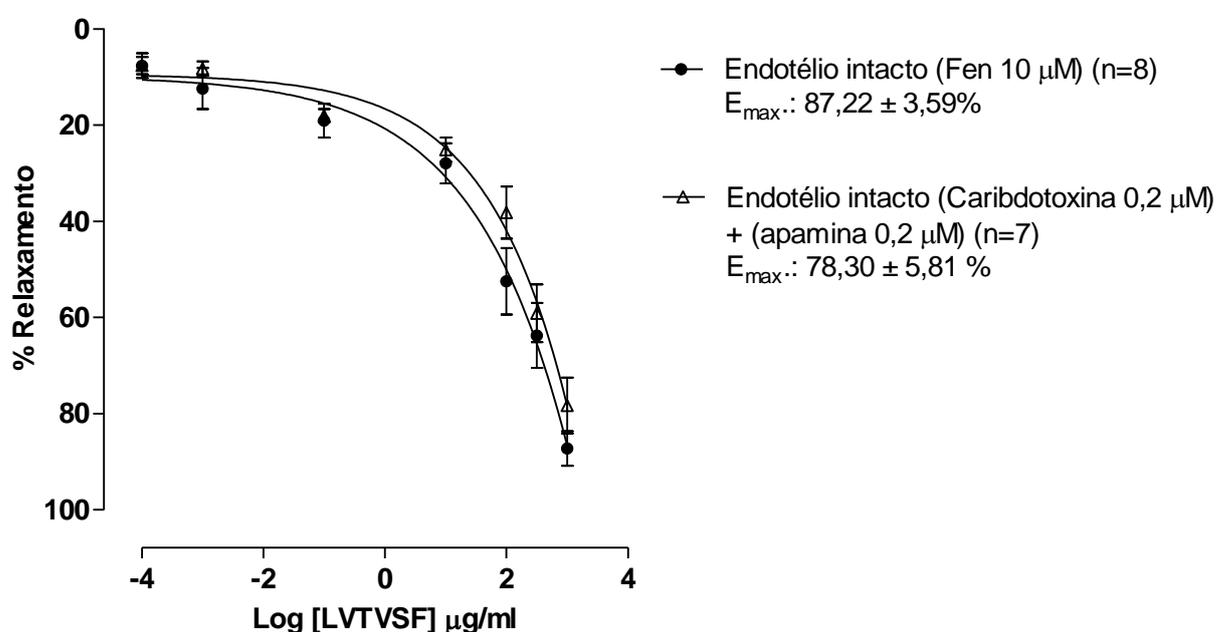


Figura 25 - Curvas concentração resposta do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco LVTVSF (0,0001 - 1000 $\mu\text{g/ml}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraindidos com fenilefrina (10 μM) na ausência (●) e na presença de caribdotoxina (0,2 μM) e apamina (0,2 μM) (Δ) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média \pm e.p.m.

4.5.7 Envolvimento dos metabólitos do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

O pré-tratamento com indometacina (10 μM) por 30 minutos, não promoveu atenuação significativa da resposta relaxante induzida pelo LVTVSF, ($E_{\text{max}} = 78,79 \pm 7,46\%$) quando comparado ao controle (Fen 10 μM) ($E_{\text{max}} = 87,22 \pm 3,59\%$) (Figura 26).

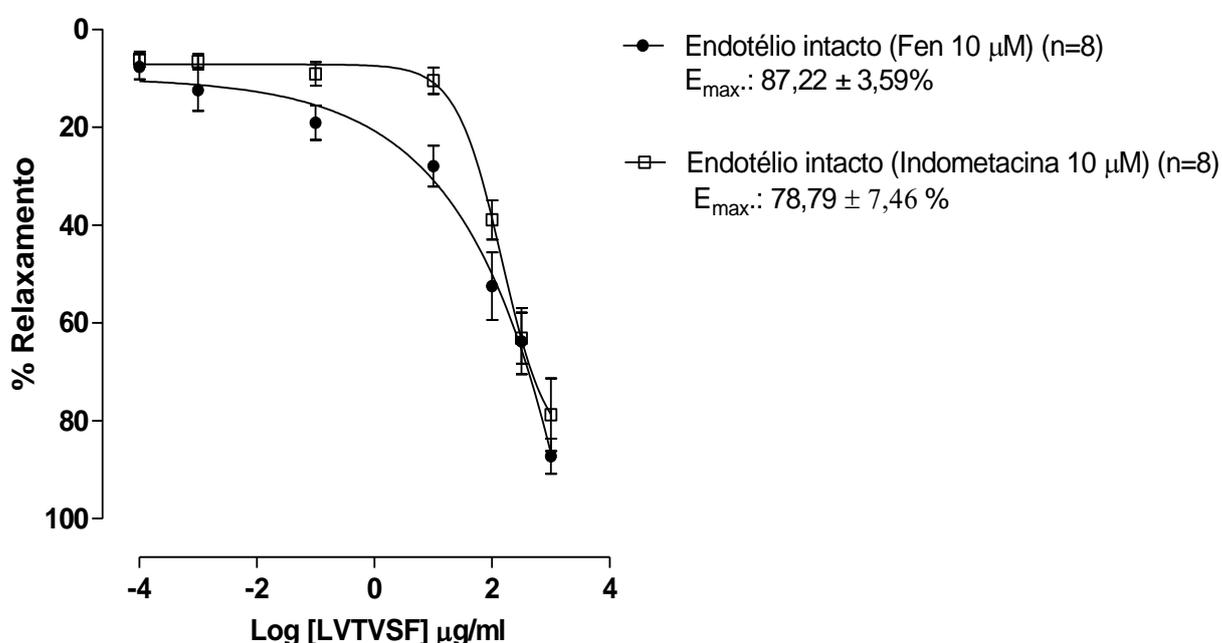


Figura 26 - Curvas concentração resposta do LVTVSF (0,0001 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 μM) na ausência (●) e na presença de indometacina (10 μM) (□) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média \pm e.p.m.

4.5.8 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Após o bloqueio dos receptores muscarínicos pela atropina (1 nM) não foi observada nenhuma alteração significativa sobre o relaxamento induzido por LTVVSF ($E_{\text{máx.}} = 88,34 \pm 4,6\%$) quando comparado ao controle (Fen 10 μM) ($E_{\text{max}} = 87,22 \pm 3,59\%$) (Figura 27).

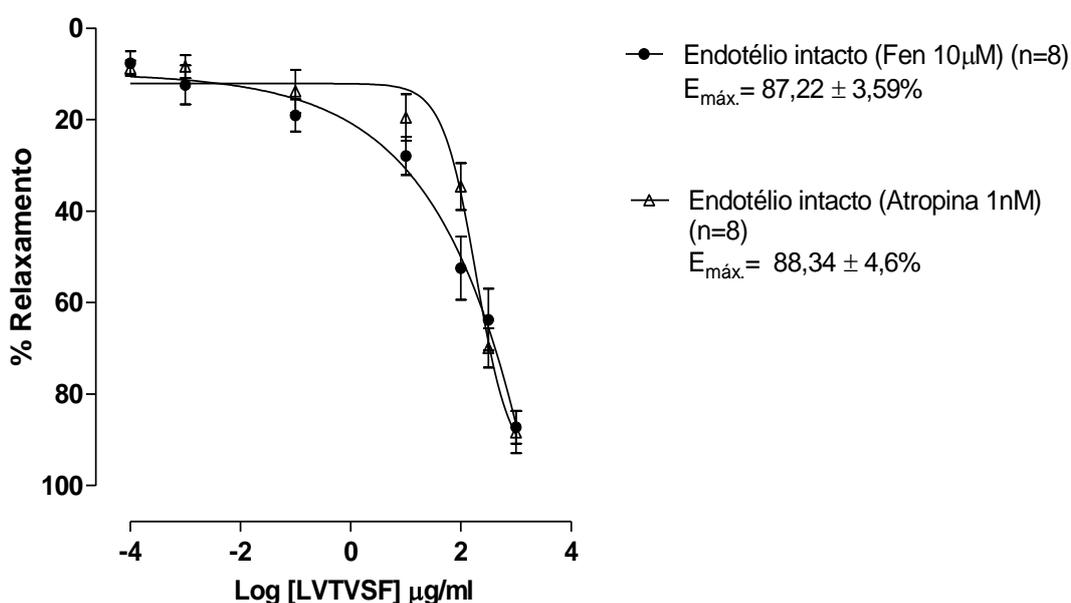


Figura 27- Curvas concentração resposta do LTVVSF (0,0001 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraindidos com fenilefrina (10 μM) na ausência (●) e na presença de atropina (1 nM) (Δ) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média \pm e.p.m.

4.5.9 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vasorelaxante induzida pelo LTVVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

O pré-tratamento com N-acetylcysteina (10 mM), promoveu uma atenuação do vasorelaxamento induzido pelo LTVVSF, de maneira significativa ($E_{\text{max.}}: 58,67 \pm 5,53\%$) em anéis mesentéricos de ratos normotensos comparados ao controle (Fen 10 μM) ($E_{\text{max}} = 87,22 \pm 3,59\%$) (Figura 28).

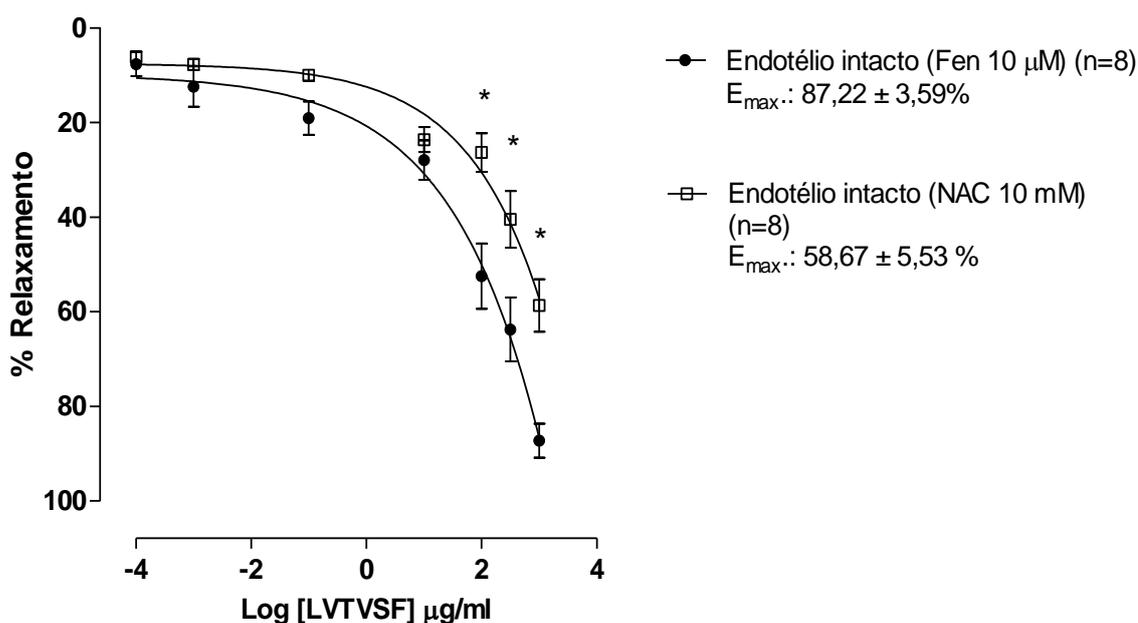


Figura 28- Efeito vasorelaxante do LVTVSF (0,0001 - 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica de rato pré-contraído com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de N-acetilcisteína (□) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média ± e.p.m.* $p < 0.05$ versus endotélio intacto sem NAC.

4.5.10 Envolvimento dos ânions superóxidos na resposta vasorelaxante induzida pelo LVTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos

Após incubação com tempol (10 µM) por 30 minutos, houve uma atenuação significativa do vasorelaxamento ($E_{max} = 36,17 \pm 6,0$ %) quando comparados ao Endotélio intacto (Fen 10 µM) ($E_{max} = 87,22 \pm 3,59$ %) (Figura 29).

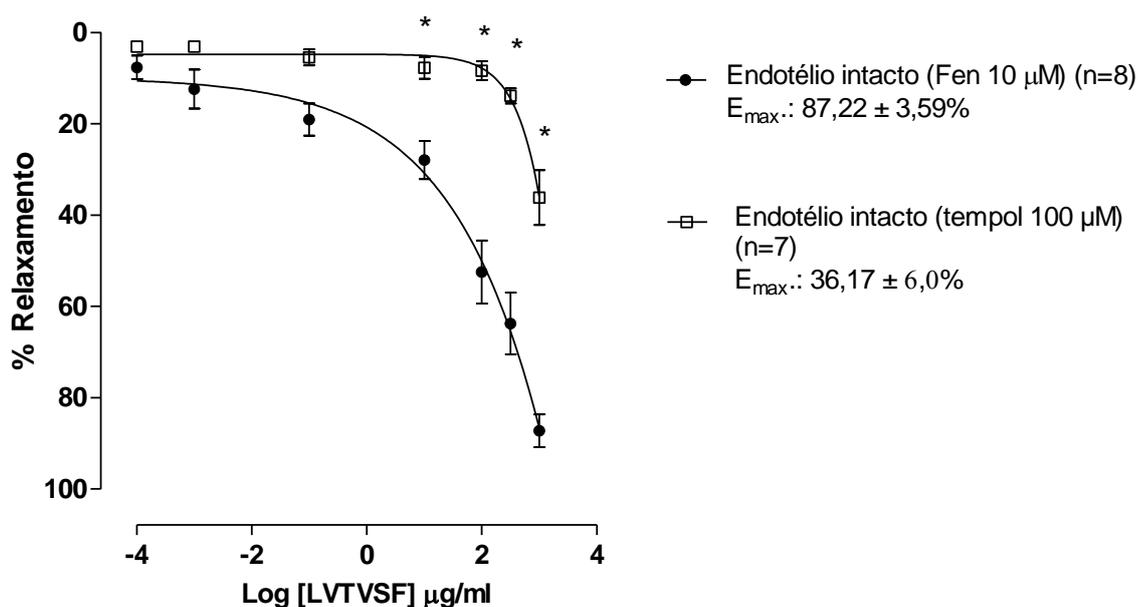


Figura 29 - Efeito vasorelaxante do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco LTVSF (0,0001 - 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica de rato pré-contraída com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença do tempol (100 µM) (□) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média ± e.p.m.* $p < 0,05$ versus endotélio intacto sem tempol.

4.5.11 Envolvimento da enzima NADPH oxidase na resposta vasorelaxante induzida por LTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

A incubação por 30 minutos com apocinina, promoveu um deslocamento da curva para a direita, sem atenuação significativa do efeito máximo induzido por LTVSF ($E_{max} = 75,10 \pm 5,0\%$) quando comparados à curva controle (Fen 10 µM) ($E_{max} = 87,22 \pm 3,59\%$) (Figura 30).

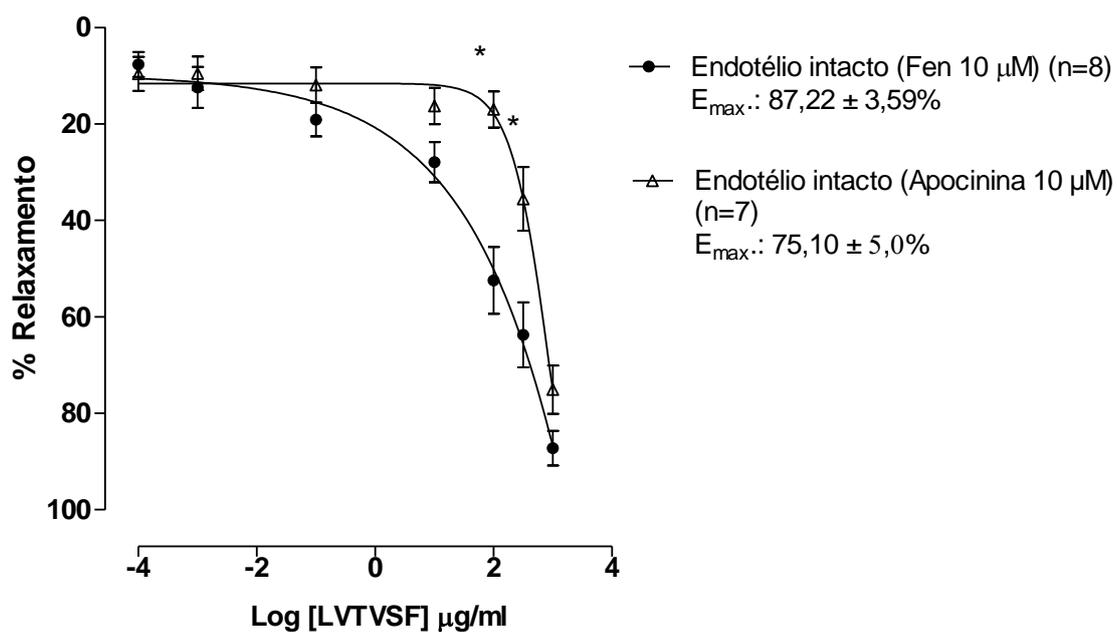


Figura 30- Efeito vasorelaxante do liofilizado do vinho tinto do Vale do São Francisco LTVSF (0,0001 - 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (●) e na presença de apocinina (10 µM) (Δ) com endotélio funcional. Resultados estão expressos como média ± e.p.m.* $p < 0.05$ versus endotélio intacto sem apocinina.

4.5.12 Medida da produção de superóxidos em cultura de células endoteliais de aorta de coelho após exposição ao LTVSF.

A magnitude relativa da formação de superóxido em culturas de células endoteliais de aorta de coelho foi medida após a exposição ao LTVSF (300 µg/mL) = $37 \pm 6 \Delta\%$. A angiotensina II foi utilizada como controle positivo = $107 \pm 9 \Delta\%$ (Figura 31).

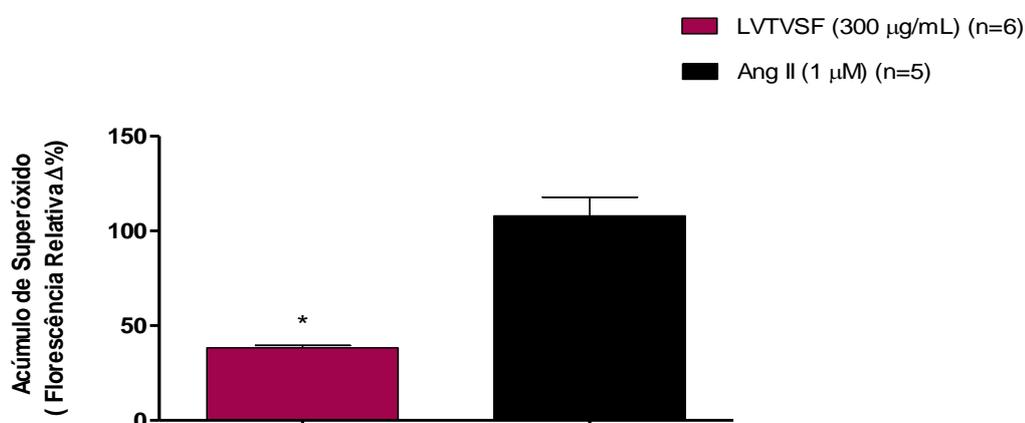


Figura 31- Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em cultura de células endoteliais de aorta de coelho. Geração de ROS induzido por LTVSF (300 µg/ml) e Ang II (1 µM). Estes dados são representativos de três experimentos separados em duplicata. Valores estão expressos como média \pm e.p.m.

Tabela 3 – Valores de $E_{\text{máx}}$ em diferentes condições experimentais. * $p < 0.05$ versus endotélio intacto.

Condições Experimentais	$E_{\text{máx}}$ (%)	Número de experimentos
Endotélio intacto	87,2 ± 3,5	8
Endotélio removido	32,0 ± 2,0*	8
L-NAME (100 µM)	26,6 ± 3,7*	7
ODQ (10 µM)	37,0 ± 4,6*	8
KCl (20 mM)	46,0 ± 9,8*	7
TEA (1 mM)	44,4 ± 5,8*	7
Caribdotoxina (0,2 µM) + Apamia (0,2 µM)	78,3 ± 5,8	7
Indometacina (10 µM)	78,7 ± 7,4	8
Atropina (1 nM)	88,3 ± 4,6	8
NAC (10 mM)	58,6 ± 5,5*	8
Tempol (100 µM)	36,1 ± 6,0*	7
Apocinina (10 µM)	75,1 ± 5,0	7

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os principais resultados dessa pesquisa foram que o liofilizado do vinho tinto do vale do São Francisco (LVTVSF) apresentou altos níveis de polifenóis totais, e dos flavonoides: miricetina, quercetina e caempferol. Mostrou-se eficiente em reduzir a pressão arterial em ratos hipertensos L-NAME e promoveu atividade hipotensora e taquicárdica em ratos normotensos. Além disso, observou-se um potente efeito vasorelaxante dependente do endotélio vascular em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, envolvendo a participação da via NO-GMPc.

Diversos estudos têm indicado que a ingestão regular de alimentos e bebidas ricos em compostos polifenólicos como o vinho tinto, chá, chocolate, frutas e legumes está associada com melhor prognóstico cardiovascular (DI, et al., 2002; MUKAMAL, et al., 2002; SOFI, et al., 2008; DIEBOLT, et al, 2001; MOURA, et al, 2004). O efeito protetor do vinho tinto sobre o sistema cardiovascular pode ser atribuído à presença de polifenóis (IJIMA, et al., 2000; IJIMA et al., 2002).

Esses efeitos têm sido a justificativa, pelo menos em parte, para o “paradoxo francês”, onde apesar de um alto consumo de gordura saturada, os franceses apresentam baixa incidência de mortalidade por doenças cardiovasculares, o que provavelmente está relacionado à alta prevalência do consumo de vinhos tinto na França (WOLLIN; JONES, 2001).

No presente estudo foram constatados teores significativos de polifenóis no LVTVSF, com valor de 4,2g GAE/L, conteúdo consideravelmente maior do que os encontrados em vinhos franceses e portugueses (LANDRAULT, et al., 2001; PAIXÃO, et. al., 2007).

Dentre os polifenóis, os flavonóides são os mais encontrados nos vinhos tintos, compreendendo um grande grupo de compostos naturalmente existentes e amplamente distribuídos por todo o reino vegetal (AJAYA et al., 2003). Dentre os flavonóides podem ser citados os flavonóis, as catequinas e antocianinas (MERAL, 2008).

O flavonóide encontrado em maior concentração no nosso trabalho foi a quercetina, seguido de miricetina e caempferol, substâncias que apresentam atividade antioxidante e vasodilatadora (MAXWELL, 1997; BURNS, et. al., 2000; RICE-EVANS et al., 1995; KHOO, et. al., 2010; ANGELONE, et al., 2011; PADILLA,

et al., 2005). Portanto, pode-se sugerir que tais flavonoides podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos cardiovasculares induzidos por LVTVSF.

Diante dos benefícios relatados a cerca dos vinhos tintos no sistema cardiovascular, buscou-se avaliar o efeito do vinho tinto produzido no Vale do São Francisco sobre a PA e a FC em ratos com hipertensão induzida pelo L-NAME, que é capaz de promover disfunção endotelial devido à diminuição da produção de óxido nítrico.

A hipertensão induzida pela inibição crônica da enzima sintase de NO ocorre provavelmente devido a vários mecanismos, incluindo supressão do efeito vasodilatador basal do NO, aumento do estresse oxidativo, modulação da atividade de endotelina-1, aumento na resistência vascular arterial devido à vasoconstrição geral e estimulação da atividade simpática central (CUNHA et al., 1993; NAVARRO et al 1994; USUI et al., 1999).

Neste estudo, a administração de L-NAME dissolvido na água ingerida pelos animais aumentou os níveis de PAM. Entretanto, o grupo de animais tratados com L-NAME adicionado do LVTVSF, mostrou níveis de PAM significativamente menores quando comparados ao grupo tratado somente com L-NAME, apesar da contínua inibição da eNOS. Estes resultados demonstram um efeito anti-hipertensivo do LVTVSF em ratos hipertensos deficientes de NO, provavelmente por uma ação protetora frente à disfunção endotelial.

É importante ressaltar que a dose de LVTVSF utilizada nos animais hipertensos corresponde a aproximadamente duas taças de vinho (210 ml) para um indivíduo adulto por dia, a dose de vinho geralmente recomendada para proteção cardiovascular (ELLISON, 2002; MOURA et. al, 2004)

Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura onde a administração oral de liofilizado de vinho tinto induziu um efeito anti-hipertensivo substancial em ratos com hipertensão arterial induzida por L-NAME (MOURA et. al, 2004).

No intuito de avaliarmos o mecanismo de ação do LVTVSF sobre os parâmetros cardiovasculares de PA e FC, testamos o liofilizado em ratos normotensos através da administração intravenosa aguda e foi constatado que a administração intravenosa aguda do LVTVSF promoveu hipotensão seguida de

taquicardia, provavelmente de origem reflexa, nesses animais. Além disso, segundo a análise dos componentes da pressão arterial foi observado, que LVTVSF induziu uma maior diminuição do componente diastólico quando comparado a diminuição do componente sistólico da pressão arterial, sugerindo que a hipotensão induzida pelo LVTVSF é provavelmente devido a uma vasodilatação periférica que culmina em diminuição da RVPT.

Sendo o sistema cardiovascular um importante alvo para uma variedade de moduladores fisiológicos, dentre esses moduladores o NO destaca-se como principal fator vasorelaxante derivado do endotélio, implicado em diversos processos biológicos, como a regulação do tônus vascular (SCATENA, et al., 2010; MONCADA, S.; HIGGS, 1993).

Portanto considerando o papel do NO na determinação da pressão arterial, investigou-se a participação desse gás no efeito hipotensor induzido pelo LVTVSF. De fato, na presença do inibidor da sintase do óxido nítrico, o L-NAME, a hipotensão e taquicardia induzida pelo LVTVSF foram significativamente atenuadas, sugerindo que o efeito hipotensor do liofilizado em ratos normotensos conscientes pode ser dependente da liberação de NO pelo endotélio vascular.

Com o objetivo de verificar se a diminuição da pressão arterial obtida com LVTVSF ocorre por uma diminuição da resistência vascular periférica, foram realizados estudos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos.

O LVTVSF promoveu um efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos pré-contraídos com fenilefrina. Nestas condições o liofilizado induziu um vasorelaxamento dependente de concentração e esta resposta foi atenuada de maneira significativa após a remoção do endotélio vascular, sugerindo o envolvimento de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs).

A camada endotelial dos vasos sanguíneos desempenha importante papel na regulação da pressão arterial e distribuição de sangue para diferentes tecidos, disfunções nesta camada podem estar associadas a doenças do sistema cardiovascular (CANNON, 1998; APPELDOORN, et al., 2009). Em condições normais ocorre a liberação de fatores contracturantes, como a endotelina-1, tromboxano e prostaglandinas; e fatores relaxantes tais como as prostaciclina, NO e EDHF. Com o objetivo de identificar qual fator derivado do endotélio vascular

estaria sendo responsável pela ação vasodilatadora do LVTVSF, realizou-se experimentos utilizando diversos inibidores endoteliais.

Na presença de L-NAME um inibidor não seletivo da enzima sintase de NO (ARNAL, et al., 1993), a resposta relaxante de LVTVSF foi atenuada de maneira significativa, sugerindo o envolvimento desta enzima no efeito induzido pelo composto.

A produção de NO pela célula endotelial ativa a CGs, que irá catalisar a conversão de GTP em GMPc no músculo liso, este GMPc formado promoverá a ativação de uma proteína cinase dependente de GMPc (PKG), que promove a fosforilação de diversos alvos, entre eles a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), ocasionando sua inativação. Além disso, a PKG fosforila a bomba de Ca^{2+} do retículo endosarcoplasmático (SERCA) e da membrana plasmática (PMCA); o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; e canais para K^+ da membrana plasmática, todos estes eventos resultando na diminuição citosólica de Ca^{2+} e conseqüente vasorelaxamento (CORNWELL et al, 1991; FURCHGOTT, 1983; HILGERS; WEBB, 2007; IRVINE, et al., 2003; VANHOUTTE; BOULANGER, 1995; SABRANE et al., 2003; MULLERSHAUSEN et al., 2003).

A fim de avaliar a participação da via de sinalização que envolve a ativação da ciclase de guanilil solúvel, foram realizados experimentos na presença de ODQ, um inibidor seletivo desta enzima (GARTHWAITE et al., 1995). Nestas condições o vasorelaxamento do LVTVSF foi atenuado de maneira significativa, sugerindo o envolvimento da via NO/GMPc/PKG na resposta relaxante induzida por LVTVSF em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos.

Dentre os alvos da PKG para promover o vasorelaxamento, encontram-se os canais para K^+ . Estes pertencem a uma grande família de proteínas integrais de membrana que têm um papel importante em processos fisiológicos, desde a liberação de neurotransmissores à regulação do tônus vascular (GHATTA et al., 2006). A ativação de canais para potássio na membrana do músculo liso vascular aumenta o efluxo de íons potássio causando uma hiperpolarização da membrana, o que provoca o fechamento dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, diminuindo a entrada de Ca^{2+} na célula e causando o vasorelaxamento (SOBEY, 2001).

Para investigar a influência dos canais para K^+ na resposta induzida pelo LVTVSF, o efeito vasorelaxante desta substância foi avaliado em um meio com aumento da concentração externa de potássio de 4 para 20 mM (CAMPBELL et al., 1996). Esta concentração impede parcialmente o efluxo destes íons, levando a uma atenuação da resposta relaxante induzida por substâncias que promovem a abertura de canais para K^+ (CLARK; FUCHS, 1997). Nestas condições experimentais, o vasorelaxamento induzido por LVTVSF foi atenuado, sugerindo o envolvimento destes canais na resposta relaxante. A participação dos canais para K^+ foi confirmada pela utilização do TEA (1 mM) um antagonista não seletivo destes canais.

A fim de ampliar os achados em experimentos funcionais, foram realizados ensaios bioquímicos utilizando uma técnica bastante sensível para medida de NO em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC). Pôde-se constatar um aumento significativo na produção de NO após a administração do LVTVSF nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g/ml}$. Após a incubação com L-NAME a produção de NO foi significativamente atenuada na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$, corroborando com os resultados funcionais.

Além do NO, o EDHF exerce importante papel na participação do vasorelaxamento através de hiperpolarização. A identidade do EDHF ainda não está completamente estabelecida, entretanto os canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} são potenciais candidatos (CAMPBELL; HARDER, 2001; HILGERS; WEBB 2007). Diante disso, utilizou-se apamina e caribdotoxina, bloqueadores dos canais K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena (SK_{ca}), intermediária (IK_{ca}) e grande condutância (BK_{ca}) (BRAYDEN; NELSON, 1992), a combinação dessas drogas inibem o EDHF. Nestas condições experimentais, a resposta vasorelaxante de LVTVSF não sofreu alteração significativa, sugerindo que o EDHF provavelmente não participa da resposta relaxante do liofilizado.

Outros mediadores importantes derivados do endotélio para a regulação do tônus vascular são os metabólitos da via da ciclooxigenase. A ciclooxigenase (COX) é uma enzima que catalisa o metabolismo do ácido araquidônico, originando vários metabólitos, dentre eles a prostaciclina que é um potente vasodilatador derivado do endotélio (MONCADA; VANE, 1979). A prostaciclina formada no endotélio vascular se difunde até as células musculares lisas onde promove a ativação de receptores

IP que estão acoplados a proteína G_s (COLEMAN et al., 1975), este acoplamento induz a ativação da enzima adenilato ciclase (AC), levando ao aumento dos níveis de AMPc no citosol. O aumento do AMPc gera a ativação de uma proteína cinase dependente de AMPc (PKA). Esta proteína quando ativada fosforila diversos alvos, resultando na diminuição do tônus vascular (FROLICH, 1990).

Para avaliar a influência da COX na resposta relaxante induzida por LVTVSF, realizou-se experimentos na presença de indometacina, um inibidor não seletivo desta enzima (VANHOUTTE, 2009). E nestas condições, a resposta vasorelaxante de LVTVSF não foi alterada, sugerindo que os metabólitos da via do ácido araquidônico não participam desta resposta.

Foi observado até então que, o LVTVSF promove vasorelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato através do aumento de NO e ativação da via GMPc/PKG, não havendo participando do EDHF e prostaciclina. Portanto, buscou-se avaliar qual mecanismo estaria envolvido na ativação da NOS para a produção de NO.

É bem descrito na literatura que uma das formas de produção de NO na célula endotelial ocorre pela ativação dos receptores muscarínicos do subtipo M_3 . Os receptores muscarínicos são proteínas integrais de membrana acoplados a proteína-G que quando estimulados por um agonista induz o aumento de Ca^{2+} na célula endotelial e consequente ativação da eNOS e produção de NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O envolvimento desses receptores neste estudo foi avaliado em experimentos utilizando um antagonista não seletivo, a atropina (1 nM) (SAWAYER, 1999). Nestas condições, a resposta vasorelaxante de LVTVSF não sofreu alteração significativa, sugerindo que os receptores muscarínicos provavelmente não participam da resposta vasodilatadora do liofilizado.

Relatos da literatura apontam outra forma de ativação da sintase de óxido nítrico em células endoteliais, a qual envolve a participação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ativam a via PI_3 -kinase/Akt/eNOS (IRANI, 2000; KIM et al, 2007). Esta via sensível a redox foi evidenciada no efeito estimulador dos polifenóis do vinho tinto para a formação de NO endotelial (NDIAYE et al. 2005, ANSELM et al., 2007). Portanto, procurou-se avaliar a participação das espécies reativas de oxigênio no efeito vasorelaxante induzido pelo LVTVSF.

Inicialmente foi utilizado a N-acetilcisteína, um sequestrador de radicais livres (NDIAYE et al., 2003) e pudemos observar que nessas condições experimentais houve uma atenuação significativa do vasorelaxamento com diminuição do efeito máximo, indicando que houve participação de ROS no efeito vasorelaxante por LVTVSF.

Outra ferramenta farmacológica utilizada para avaliar a participação das ROS no efeito vasorelaxante pelo LVTVSF foi o tempol um mimético da SOD responsável por transformar ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (HERNANZ, et al., 2004). E nestas condições, a resposta vasorelaxante de LVTVSF foi atenuada de maneira significativa, sugerindo a participação do ânion superóxido (O_2^-) neste efeito.

Uma das principais fontes de ânion superóxido é a NADPH oxidase, um complexo enzimático que pode ser encontrado na membrana plasmática (VIRDIS et al., 2010). Para avaliarmos a participação da NADPH oxidase no efeito vasorelaxante por LVTVSF, utilizamos um inibidor desta enzima, a apocinina. Nestas condições experimentais observou-se uma atenuação no vasorelaxamento sem redução do efeito máximo, sugerindo que os ânions superóxidos que participam do efeito vasorelaxante mediado pelo LVTVSF são oriundos, pelo menos em parte, da NADPH oxidase.

Nossos resultados estão de acordo com Ndiaye et al. (2005) e Anselm et al. (2007), os quais mostram a participação de espécies reativas de oxigênio no efeito vasorelaxante em artéria coronária de porco. Eles indicam que compostos polifenólicos causam ativação da via PI_3k/Akt de uma maneira sensível a redox. Além disso, a via PI_3k/Akt medeia a ativação da eNOS no resíduo de serina 1177 e a resposta vasorelaxante é abolida por wortmannin um inibidor da PI_3K . A enzima Src kinase, uma proteína cinase sensível a redox tem ação “upstream” à via PI_3K/Akt . Esses autores também evidenciaram elevação na produção de ROS em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), o que também foi observado em nosso estudo, onde o LVTVSF na concentração de 300 $\mu g/mL$ foi capaz de aumentar a produção de ROS neste modelo celular.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados obtidos através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro* em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) demonstram que:

- O LTVVSF apresenta alta concentração de compostos polifenólicos totais. Os polifenóis identificados foram quercetina, miricetina e caempferol;
- O tratamento com o LTVVSF preveniu o aumento da pressão arterial de maneira significativa em ratos hipertensos L-NAME, comparados ao grupo controle;
- O efeito vasorelaxante do LTVVSF parece não envolver a participação de EDHF, receptores muscarínicos e metabólitos do ácido araquidônico;
- O LTVVSF promoveu um potente efeito vasorelaxante dependente do endotélio vascular, envolvendo a via NO/GMPc e canais de K⁺;
- A produção de NO possivelmente envolve um mecanismo sensível a redox;

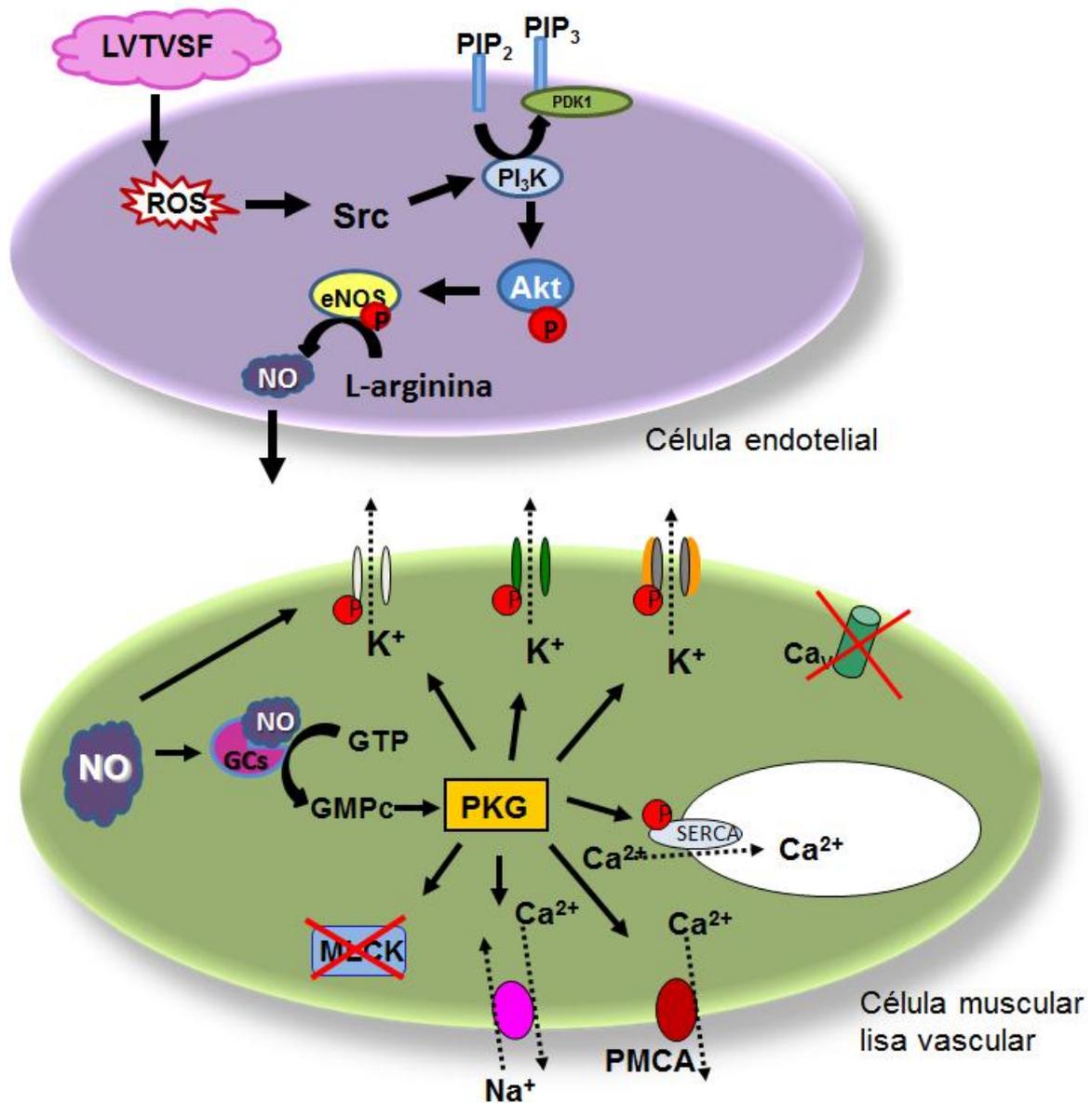


Figura 32 – Mecanismo de ação proposto para o LVTVSF envolvendo a ativação da via NO/GMPc/PKG sensível a sinalização redox.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os achados dos efeitos cardiovasculares causados pelo LTVVSF, tem-se como perspectivas a avaliação do LTVVSF em outras desordens cardiovasculares como em modelos de infarto agudo do miocárdio e outros modelos de hipertensão arterial tais como: modelo de hipertensão renovascular 2 rins e 1 clip e modelo de ratos geneticamente hipertensos.

Além disso, são necessários estudos sobre a participação da via PI_3K/Akt no efeito vasorelaxante mediado pelo LTVVSF, assim como a fosforilação da eNOS através da técnica de Western blot.

É importante o aprofundamento dos estudos pré-clínicos e futura realização de estudos clínicos com o LTVVSF, a fim de fortalecer a hipótese do vinho tinto do Vale de São Francisco como um alimento funcional benéfico ao aparelho cardiovascular e o desenvolvimento de um possível fitoterápico a partir deste liofilizado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AJAYA, M.; GILANI, ANWAR-UL H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p.603–612, 2003.

ALIOUA, A.; TANAKA, Y.; WALLNER, M.; HOFMANN, F.; RUTH, P., MEERA, P. TORO. L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273. p. 32950–6, 1998.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219. p. 1698-1705, 1970.

ANGELONE, T.; PASQUA, T.; DI MAJO, D.; QUINTIERI, A. M.; FILICE, E.; AMODIO, N.; TOTA, B.; GIAMMANCO, M.; CERRA, M. C. Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 21. p. 362-371, 2011.

ANSELM, E.; CHATAIGNEAU, M.; NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINKERTH, V. B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 404-413, 2007.

APPELDOORN, M. M.; VENEMA, D. P.; PETERS, T. H. F.; KOENEN, M. E.; ARTS I. C. W.; JEAN-PAUL VINCKEN, GRUPPEN, H., KEIJER, J.; HOLLMAN, P. C. H. Some Phenolic Compounds Increase the Nitric Oxide Level in Endothelial Cells in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7693–7699, 2009.

ARNAL, J. F.; AMRANI, A. I.; CHATELLIER, G.; MENARD, J.; MICHEL, J. B. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. **Hypertension**, v. 22, p. 380–387, 1993.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 328-338, 2001.

BELL, D. R.; GOCHENAUR, K. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, p. 1164-1170, 2006.

BIANCHINI, F.; VAINIO, H. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention **European Journal of Cancer Prevention**, v. 12 p. 417–425, 2003.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325-337, 2008.

BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. **Science**, v. 256, p. 532–5, 1992.

BURNS, J.; GARDNER, P.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D. B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M. R.; LEAN, M., DUTHIE, G. G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220–230, 2000.

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

CAMPBELL, W. B.; HARDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, v. 78, p. 415-423, 1996.

CAMPBELL, W. B.; HARDER, D. R. Prologue: EDHF—what is it. **American Journal Physiology**, v. 280. p. 2413–2416, 2001.

CANNON, R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clinical Chemistry**, v. 44, p.1809–1819, 1998.

CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; SCHINI-KERTH, V. B. Effets vasodilatateurs des polyphénoliques du vin: role de NO et EDHF. **Sang Thrombose Vaisseaux**, v. 8, p.433-441, 2003.

CHEN, C.H.; WU, J. R.; YEN, M.; CHEN, Z. C. A model of medication-taking behavior in elderly individuals with chronic disease. **Journal of Cardiovascular Nursing**, v. 22, p. 359–65, 2007.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 1473-1479, 1997.

COGOLLUDO, A.; VIZCAÍNO-PÉREZ, F.; TAMARGO, J. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 14, p. 423 - 427, 2005.

COLEMAN, T. G.; MANNING, R. D. J.; NORMAN, R. A.; DECLUE, J. The Role of the Kidney in Spontaneous Hypertension. **American Heart Journal**, v. 89, p. 94 - 98, 1975.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, meta-bolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal Nutritional Biochemical**, v. 7, p.66-76, 1996.

CORDER, R.; DOUTHWAITE, J. A.; LEES, D. M.; KHAN, N Q.; VISEU DOS SANTOS, A. C.; WOOD, E. G.; CARRIER, M. J. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. **Nature**, v. 414, p. 863 - 864, 2001.

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

CORRÊA, T.D.; NAMURA, J. J.; PONTES DA SILVA, C. A.; CASTRO, M. G.; MENEGHINI, A.; FERREIRA, C. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. Systemic hypertension: latest information on its epidemiology, diagnosis and treatment. **Arquivos Medicina ABC**, v. 31, p. 91-101, 2005.

COX, R. H.; LOZINSKAYA, I.; DIETZ, N. J. Calcium exerts a larger regulatory effect on potassium+ channels in small mesenteric artery myocytes from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar-Kyoto rats. **American Journal of Hypertension**, v.16, p. 21-7, 2003.

CRIBBS, L. L. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v. 40, p. 221-230, 2006.

CUNHA, R. S; CABRAL, A. M; VASQUEZ, E. C. Evidence that autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. **American Journal of Hypertension**, v. 6, p. 806–809, 1993.

DI, C. A.; ROTONDO, S.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M. B.; DE GAETANO, G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk **Circulation**, v. 105, p.2836-2844, 2002.

DELL'AGLI, M.; BUSCIALA, A.; BOSISIO, E. Vascular effects of wine polyphenols. **Cardiovascular Research**, v. 63, p. 593-602, 2004.

DIEBOLT, M.; BUCHER, B.; ADRIANTSITOHAINA, R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. **Hypertension**, v. 38, p. 159-165, 2001.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular Research**, v. 39 p. 89-105, 1998.

DUARTE, J.; PEREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F.; OCETE, M.A.; PEREZ-VIZCAINO, F., ZARZUELO, A.; et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal Pharmacology**, v.133, p. 117-24, 2001.

ELLIOTT, W.J. Sytemic Hypertension. **Current problems in cardiology**, v. 32, p. 201-259, 2007.

ELLISON, R. C. Sensible drinking. The Report of an Inter-Departmental Working Group. 1995. Department of Health, United Kingdom. Decem-ber, 1995:28–34. Cited by Ellison R.C. Balancing the risks and benefits of moderate drinking. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 1-6, 2002.

FOLKOW, B. Physiological Aspects of Primary Hypertension. **Physiological Reviews**, v. 62, p. 347-504, 1982.

FURCHGOTT, R. F. Role of the endothelium in responses of vascular smoth muscles. **Circulation Research**, v. 53, p. 557-573, 1983.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS–FAOSTAT. 17 may, 2011.

FURIAN, A. F.; RATTMANN, Y. D.; OLIVEIRA, M. S.; ROYES, L. F.; MARQUES, M. C., SANTOS, A. R, MELLO, C. F. Nitric oxide and potassium channels mediate GM1 ganglioside-induced vasorelaxation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**, v. 380, p. 487-95, 2009.

- FROLICH, J. D. Prostacyclin in hypertension. **Journal of Hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 8, p. 73-78, 1990.
- GARCIA-PASCUAL, A.; LABADIA, A.; JIMENEZ, E.; COSTA, G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries:mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitiveK⁺conductance. **British Journal of Pharmacology**, v. 105, p. 429-35,1995.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; SBOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and Selective Inhibition of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase by 1h-[1m2,3]Oxadiazolo[4,3-A]Quinoxalin-1-One. **Molecular Pharmacology**, v. 48, p. 184-188, 1995.
- GHATTA, S.; NIMMAGDDA, D.; XU, X.; O'FOURKE, S. T. Large-Conductance, Calcium-Activated Postassium Channels: Structural and Functional Implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 110, p.103-116, 2006.
- GROSS, S. S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms, **Annual.Review. Physiology**, v. 57, p. 737-769, 1995.
- GURNEY, A. M. Mechanisms of Drug-induced Vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.
- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Neuroscience**, v. 7, p. 335-346, 2006.
- HERNANZ, R.; ALONSOB, M. J.; ZIBRANDTSENA, H.; ALVAREZ, Y.; SALAICES, M.; SIMONSENA, U. Measurements of nitric oxide concentration and hyporeactivityin rat superior mesenteric artery exposed to endotoxin. **Cardiovascular Research**, v. 62, p. 202–211, 2004.
- HERTOG, M. G.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C. BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, p. 381-386, 1995.
- HIRANO, K.; HIRANO, M.; KANAIDE, H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensivity in vascular smooth muscle. **Journal of smooth muscle research**, v. 40, p. 219-236, 2004.

HILGERS, R. H.; WEBB, R. C. Reduced expression of SKCa and IKCa channel proteins in rat small mesenteric arteries during angiotensin II-induced hypertension. **American Journal Physiology**, v. 292, p. 2275-2284, 2007.

HIRSCH, R. São Francisco Valley Irrigated Fruit Production. **Rabobank International**, 31p. 2005.

HOU, D. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. **Current Molecular Medicine**, v. 3, p. 149-159, 2003.

HU, J. P.; CALOMME, M., LASURE, A.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.; BERGHE, D. A. V. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. **Biological Trace Element Research**, v. 47, p. 327-331, 1995.

IJIMA, K.; YOSHIZUMI, M.; HASHIMOTO, M.; KIM, S., ETO, M.; AKO, J.; LIANG, Y. Q.; SUDOH, N.; HOSODA, K.; NAKAHARA, K.; TOBA, K.; OUCHI, Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. **Circulation**, v.101, p. 805–11, 2000.

IJIMA, K.; YOSHIZUMI, M.; HASHIMOTO, M.; AKISHITA, M.; KOZAKI, K.; AKO, J. WATANABE, T.; OHIKE, Y.; SON, B.; YU J.; NAKAHARA, K.; OUCHI, Y. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. **Circulation**, v. 105, p. 2404–10, 2002.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circulation Research**, v. 87, p. 179–83, 2000.

IRIGOYEN, M. C; CONSOLIN-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 55-62, 2001.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. H. Resistance Arteries Channels to Vasodilate Activates Soluble Guanylate Cyclase and K⁺ - NO **Hypertension**, v. 41, p. 1301-1307, 2003.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173-178, 2000.

JULIUS, S. Blood pressure Lowering only or more? Has the jury reached its verdict. **The American Journal of Cardiology**, v. 100, p. 32 – 37, 2007.

KANG, D. G.; SOHN, E. J.; LEE, Y. M.; LEE, A. S.; HAN, J. H.; KIM, T. Y.; LEE, H. S. Effects of bulbous Fritillaria water extract on blood pressure and renal functions in the L-NAME hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 51-56, 2004.

KASDALLAH-GRISSA, A.; MORNAGUI, B.; AOUANI, E.; HAMMAMI, M.; EL MAY, M.; GHARBI, N.; KAMAOUN.; EL-FAZZA, S. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. **Life Science**, v. 80. p. 1033-1039, 2007.

KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; WHELTON, P. K.; HE, J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. **Journal of Hypertension**, v. 22, p. 11-19, 2004.

KIM, J. A.; FORMOSO, G.; LI, Y.; POTENZA, M. A.; MARASCIULO, F. L.; MONTAGNANI, M.; QUON, M. J. Epigallocatechin Gallate, a Green Tea Polyphenol, Mediates NO-dependent Vasodilation Using Signaling Pathways in Vascular Endothelium Requiring Reactive Oxygen Species and Fyn. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 13736-13745, 2007.

KO, C. H.; SHEN, S. C.; LEE, T. J. F.; CHEN, Y. C. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. **Molecular Cancer Therapeutic**, v. 4. p. 281-290, 2005.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins.. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 2446–2453, 1998.

KOTCHEN, T. A. Controle de hipertensão. Tendências, enfoques e Metas. **Hypertension**, v. 49, p. 19-20, 2007.

KHOO, N. K. H.; WHITE, R.; POZZO-MILLER, L.; ZHOU, F.; CONSTANCE C.; INOUE T.; PATEL, R. P.; PARKS, D. A. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 339–347, 2010.

KNOX, Y. M.; HAYASHI, K.; SUZUTANI, T.; OGASAWARA, M.; YOSIDA, I.; SHIINA, R.; TSUKUI, A.; TERAHARA, N.; AZUMA, M. Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes Nigrum* L against influenza A and B viruses. **Acta Virologica**, v. 45, 209-215, 2001.

LANDRAULT, N.; POUCHERET, P.; RAVEL, P.; GASC, F.; CROS, G.E.; RARD; TEISSEDE, PIERRE-LOUIS. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3341-3348, 2001.

LEIKERT, J.F.; RATHLE, T. R.; WOHLFART, P.; CHEYNIER, V.; VOLLMAR, A. M.; DIRSCH, V.M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. **Circulation**, v. 106, p.1614-1617, 2002.

LEITE DE BARROS, A. L. B.; VIEIRA, F. S.; ASSIS, C. C.; ZEITOUN, S. S. Alterações do nível pressórico e fatores de risco em graduandos de enfermagem. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, p. 773-8, 2009.

LEFÈVRE, J.; MICHAUD, S. E.; HADDAD, P.; DUSSAULT, S.; MÉNARD, C.; GROLEAU, J.; TURGEON, J.; RIVARD, A. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: Effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 3845-52, 2007.

LÓPEZ-SEPÚLVEDA, R.; JIMÉNEZ, R.; ROMERO, M.; ZARZUELO, M. J.; SÁNCHEZ, M.; GÓMEZ-GUZMÁN, M.; VARGAS, F.; OVALLE, F.; ZARZUELO, A.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; DUARTE, J. Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 51, p. 1-8, 2008.

LUCENA, A. P. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL J.A.C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DE OLIVEIRA, E. J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 30-36, 2010.

MAXWELL, S.R. Wine antioxidants and their impact in antioxidant function in vivo. Wine and Therapeutics Benefits. **American Chemical Society**, Washington.1997.

MERAL, C. Antioxidant effects of wine polyphenols. **Trakia Journal Science**, v. 6. p. 57-62, 2008.

MIRA, N.V.M.; BARROS, R.M.C.; SCHIOCCHET, M.A.; NOLDIN, J.A.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 4, p. 994-1002, 2008.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**, v. 30, p. 293-331, 1979.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine - nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 29, p. 2002-2012, 1993.

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

MUKAMAL, K. J.; MACLURE, M.; MULLER, J. E.; SHERWOOD, J. B.; MITTLEMAN, M. A. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 105, p. 2476-2481, 2002.

MULLERSHAUSEN, F.; FRIEBE, A.; FEIL, R.; THOMPSON, W. J.; HOFMANN, F.; KOESLING, D. Direct Activation of PDE5 by gmp: Long-Term Effects Within NO/cGMP Signaling. **Journal Cell Biological**, v. 160, p. 719-727, 2003.

NAVARRO, J.; SANCHEZ, A.; SÁIZ, J.; RUILOPE, L. M.; GARCIA-ESTAN, J.; ROMERO, J. C.; MONCADA, S.; LAHERA, V. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. **American Journal of Physiology**, v. 267, p.1516-1521, 1994.

NAVARRO-ANTOLIN, J.; LAMAS, S. Nitrosative stress by cyclosporine A in the endothelium: studies with the NO-sensitive probe diaminofluorescein-2/diacetate using flow cytometry. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, p. 1 6-9, 2001.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; JEAN-CLAUDE STOCLET; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, p. 371-377, 2003.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; CHATAIGNEAU, M.; 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. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p.1131-1136, 2004.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, M.; LOBYSHEVA, I.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINKERTH, V.B. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 455-7, 2005.

NIJVELDT, R. J.; VAN N. E.; VAN H. D. E.; et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74. p. 418-425, 2001.

ONO, K.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; CHERMANN, J. C.; BARRE `-SINOUSI F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. **European Journal of Biochemistry**, v. 190. p. 469-76, 1990.

OPIE, L.H.; LECOURE, S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signaling molecules. **European Heart Journal**, v. 28, p. 1683-1693, 2007.

PADILLA, E.; RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A., SLOWING, K., TEJERINA, T. Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. **European Journal of Pharmacology**, v. 517, p. 84-91, 2005.

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

PAPAZAFIROPOULOU, A.; SKLIROS, E.; SOTIROPOULOS, A.; PAPAFRAGOS, C.; GIKAS, A.; APOSTOLOU, O.; KALIORA, H.; TOUNTAS, C. Prevalence of target organ damage in hypertensive subjects attending primary care: C.V.P.C. study (Epidemiological Cardio-Vascular Study in Primary Care), **BMC Family Practice**, v. 12. p. 75, 2011.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUESA, J. C.; CÂMARA, J.S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry**, v. 105, p. 10, 2007.

PIMENTEL, A. M. L.; COSTA, C. A.; CARVALHO, L. C. R. M.; BRANDÃO, R. M.; RANGEL, B. M.; TANO, T.; SOARES DE MOURA, R.; RESENDE, A.C. The role of NO-GMPc pathway and potassium channels on the relaxation induced by clonidine in the rat mesenteric arterial bed. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 353-359, 2007.

RESS, D. D.; PALMER, R. J. M.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vivo and in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 746-752, 1990.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.; PRIDHAM, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 837-841, 1988.

ROBICHAUD, J. L.; NOBLE, A. C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 53, p.343-353, 1990.

RODRIGUE, C. M.; AROUS, N.; BACHIR, D.; SMITH-RAVIN J.; ROMEO, P. H. Resveratrol, a natural dietary phytoalexin, possesses similar properties to hydroxyurea towards erythroid differentiation. **British Journal of Haematology**, v. 113, p. 500-507, 2001.

ROSSI, A.; SERRAINO, I.; DUGO, P.; DIPAOLO, R.; MONDELLO, L.; GENOVESE, T.; MORABITO, D.; DUGO, G.; SAUTEBIN, L.; CAPUTI, A. P.; CUZZEREA, S. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. **Free radical research**, v. 37, p. 891-900, 2003.

SABRANE, K.; GAMBARYAN, S.; BRANDES, R. P.; HOLTWICK, R.; VOSS, M.; KUHN, M. Increased Sensitivity to Endothelial Nitric Oxide (NO) Contributes to Arterial Normotension in Mice with Vascular Smooth Muscle selective Deletion of the Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, 16, p. 17963–17968, 2003.

SAFAR, M. E.; PERONNEAU, P. P.; LEVENSON, J. A.; TOTO-MOUKOUO, J. A.; SIMON, A. C. Pulsed Doppler: Diameter, Blood Flow Velocity and Volumic Flow of the Brachial Artery in Sustained Essential Hypertension. **Circulation**, v.63, p.393-400, 1981.

SAWAYER, D. B.; BYMASTER, P. F.; CALLIGARO, O. D.; FALCONE, J.; MITCH, H. C.; WARD, S. J.; WHITESITT, C.; SHANNON, E. H. Direct pharmacological comparison of the muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rabbit thoracic aorta. **General Pharmacology**, v. 32, p. 445-452, 1999.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; PONTOGLIO, A.; GIARDINA, B. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 61-73, 2010.

SCHINI-KERTH, V. B.; AUGER, C.; JONG-HUN, K.; ÉTIENNE-SELLOUM, N.; CHATAIGNEAU, T. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, p. 853-862, 2010.

SOBEY, C.G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p.28-38, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, p. 1-5, 2010.

SOFI, F.; CESARI, F., ABBATE, R. et al. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 337 p. 1344, 2008.

SOLER, E. P.; RUIZ, V. C. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. **Current Cardiology Reviews**, v. 6, p. 138-149, 2010.

STOCLET, J. C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M. H.; BEDOUI, J. E.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 299-313, 2004.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v. 128. p. 1602-1608, 1999.

TAHVANAINEN, A.; TAURIO, J.; MÄKI-JOUPPI, J.; KÖÖBI, P.; MUSTONEN, J.; KÄHÖNEN, M.; SAND, J.; NORDBACK, I.; PÖRSTI, I. Increased wall tension in response to vasoconstrictors in isolated mesenteric arterial rings from patients with high blood pressure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, p. 440-449, 2006.

TAKESHITA, A.; MARK, A. L. Decreased Venous Distensibility in Boderline Hypertension. **Hypertension**, v.1, p.202-206, 1979.

TONIETTO, J. Valorização Do Ecossistema. Importância da Regionalização Vitivinícola na Produção de Vinhos de Qualidade. VIII Viticulture and Encology Latin-American Congress. Montevideo, Uruguay, nov. 2001.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity offlavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, p. 383-385, 1986.

TIWARI, R.; MOHAN, M.; KASTURE, S.; MAXIA, A.; BALLERO, M. Cardioprotective potential of Myricetin in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. **Phytother Research** [Epub ahead of print]. 2009.

TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside- rich purple color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2125-2130, 2003.

TZENG, S. H.; KO, W. C.; KO, F. N.; TENG, C. M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thrombosis Research**, v. 64 p. 91-100, 1991.

USUI, M.; EGASHIRA, K.; KITAMOTO, S., et al. Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. **Hypertension**, v. 34. p. 546–551, 1999.

VANHOUTTE, P. M. COX-1 and Vascular Disease. **Clinical. Pharmacology and Therapeutics**, v. 86, p.212–215, 2009.

VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M. Function of the endothelium in arterial hypertension. **La Revue Du Praticien**, v. 45, p. 2513-2518, 1995.

VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; VERSARI, D.; GHISU, N.; FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; DURANTI, E.; DAGHINI, E.; GIANNARELLI, C.; BLANDIZZI, C.; TADDEI, S.; TACCA, M. D. Atorvastatin Prevents Endothelial Dysfunction in Mesenteric Arteries From Spontaneously Hypertensive Rats Role of Cyclooxygenase 2-Derived Contracting Prostanoids. **Hypertension**, v. 53. p. 1008-1016, 2010.

VOGALIS, F.; ZHANG, Y.; GOYAL, R. K. An intermediate conductance K⁺ channel in the cell membrane of mouse intestinal smooth muscle. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1371, p. 309-16, 1998.

VUORINEN, H.; MÄÄTTÄ, K.; TÖRRÖNEN, R. Content of the flavonols myricetin, quercetin and kaempferol in Finnish berry wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 48, p. 2675-2680, 2000.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, **Free Radical. Biology and Medicine**, v. 25. p. 434–456, 1998.

WOLLIN, S. D.; JONES, P. J. H. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**, v. 131 p. 1401-1404, 2001.