

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

**DÉBORA RIBEIRO CAMPOS**

**Avaliação do efeito vascular do diterpeno esclareol em ratos  
normotensos e hipertensos**

**Ribeirão Preto**  
**2016**

**DÉBORA RIBEIRO CAMPOS**

**Avaliação do efeito vascular do diterpeno esclareol em ratos  
normotensos e hipertensos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora

**Ribeirão Preto**

**2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Campos, Débora Ribeiro

Avaliação do efeito vascular do diterpeno esclareol em ratos normotensos e hipertensos. Ribeirão Preto, 2016.

61p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Morfologia e Cirurgia Experimental.

Orientador: Évora, Paulo Roberto Barbosa.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

DÉBORA RIBEIRO CAMPOS

Título: Avaliação do efeito vascular do diterpeno esclareol em ratos normotensos e hipertensos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos meus amigos e família por serem meus alicerces.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais por toda minha formação pessoal e profissional.

Aos meus familiares pelo amor, apoio, amizade e incentivo.

Aos meus amigos e meu amor que foram meus alicerces nos momentos difíceis e me acolheram em Ribeirão Preto.

Às companheiras de laboratório, Agnes Albuquerque e Ariadne Monteiro, que foram imprescindíveis para o bom andamento da pesquisa.

A todas as secretárias do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP, especialmente à Juliana e à Camila.

A Profa. Dra. Andrea Carla Celotto pelos ensinamentos, paciência, participação ativa na evolução e estabelecimento da nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora por ter aceitado me orientar e contribuído para minha formação científica.

Meu muitíssimo obrigada a todos!

## EPÍGRAFE

*Mesmo quando tudo parece desabar,  
cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir  
ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri,  
no caminho incerto da vida, que o mais  
importante é o decidir.*

*Cora Coralina*

## RESUMO

### Avaliação do efeito vascular do diterpeno esclareol em ratos normotensos e hipertensos

**INTRODUÇÃO.** A hipertensão arterial sistêmica é uma doença cardiovascular comum que afeta cerca de 50 milhões de pessoas nos EUA, e um número proporcional a este no Brasil. Muitos estudos têm mostrado que diversas classes de diterpenóides exercem efeito significativo sobre o sistema cardiovascular. Esses estudos apontam essa classe de metabólitos como uma fonte promissora de protótipos para o desenvolvimento de novos agentes na terapêutica cardiovascular.

**OBJETIVO.** O presente estudo foi delineado de forma a investigar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular (*in vitro* e *in vivo*) do diterpeno esclareol em ratos normotensos e hipertensos.

**MATERIAL E MÉTODOS.** Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando em média 250 – 300g provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Cirurgia e Anatomia, em ambiente com temperatura (22-25°C) e ciclo claro/escuro (12:12 horas) controlados. Para a indução da hipertensão utilizou-se o modelo 2 rins - 1 clipe (artéria renal esquerda). A pressão arterial não invasiva da cauda foi avaliada utilizando-se um manguito, conectado a um sensor para registro de pressão arterial sistólica (Kent Scientific Corporation, Connecticut, USA). A monitorização da pressão arterial média foi realizada utilizando-se o MP System 100 A (BioPac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). A reatividade vascular *in vitro* foi estudada pela avaliação de curvas concentração-resposta para esclareol construídas a partir do registro de forças isométricas obtidas em anéis de aorta, com ou sem endotélio, pré-contraídos com Phe  $10^{-7}$ M em câmaras de órgãos (“*organ chambers*”). As dosagens indiretas de NO plasmático foram realizadas pela determinação dos níveis séricos de nitrito e nitrato utilizando-se o Sievers NOAnalyzer 280i (Sievers, Boulder, CO, E.U.A.). Análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni foram realizadas para detectar possíveis diferenças entre os valores em estudo.  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

**RESULTADOS.** A análise do efeito do Esclareol sobre a  $\Delta$ PAS mostrou que, em ambos os grupos, houve uma importante redução da  $\Delta$ PAS. Os inibidores de óxido nítrico sintase e guanilato ciclase foram tão eficientes quanto a retirada do endotélio, em inibir o relaxamento induzido pelo esclareol. A análise das dosagens do NO plasmático mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos.

**CONCLUSÃO.** A partir dos dados obtidos no presente estudo, conclui-se que o esclareol mostrou-se promissor quanto aos seus efeitos vasodilatadores, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Apesar disso, o esclareol não promoveu alterações do NO, possivelmente devido ao método utilizado.



## ABSTRACT

### Evaluation of the vascular effect of diterpene Sclareol in normotensive and hypertensive rats

**INTRODUCTION.** High Blood Pressure is a common cardiovascular disease that affects about 50 million people in the US, and a proportionate number to this in Brazil. Many studies have shown that many diterpenoid classes exert significant effect on the cardiovascular system. These studies suggest these metabolites class as a promising source prototype for the development of new agents in the cardiovascular therapy. **OBJECTIVE.** This study was designed to investigate the mechanisms involved in cardiovascular effect (in vitro and in vivo) of diterpene esclareol in normotensive and hypertensive rats. **MATERIAL AND METHODS.** Male Wistar rats were used, weighing an average of 250 - 300g from the Central Animal Facility of the Campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP). The animals were kept in the animal house of the Department of Surgery and Anatomy in temperature environment (22-25°C) and light / dark cycle (12:12 hours) controlled. For the induction of hypertension, the model was used two kidney - one clip (left renal artery). The tail noninvasive blood pressure was measured using a cuff, connected to a sensor for systolic arterial blood pressure ((Kent Scientific Corporation, Connecticut, USA). The monitoring of mean arterial blood pressure was measured using MP System 100 A (BioPac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). The in vitro vascular reactivity was evaluated by measuring concentration-response curves for sclareol built from the record of isometric forces obtained in aortic rings with or without endothelium precontracted with Phe  $10^{-7}$ M in organ chambers. The indirect plasma measurements of NO were carried out by determination of serum levels of nitrite and nitrate using the Sievers NOAnalyzer 280i (Sievers, Boulder, CO, USA). One or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-tests were performed to detect possible differences between the values in the study.  $P < 0.05$  was considered significant. **RESULTS.** The analysis of the effect of Esclareol on  $\Delta$ PAS showed that there was a significant reduction in  $\Delta$ PAS in both groups. The nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase inhibitors were as efficient as the removal of endothelium, to inhibit relaxation induced by the sclareol. Analysis of the strengths of plasmatic showed no significant difference between groups. **CONCLUSION.** From the data obtained in this study, it is concluded that the sclareol showed promise as to their vasodilator effects, both in vivo and in-vitro. Nevertheless, the sclareol showed no change of NO, possibly due to the method used.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura molecular do Esclareol.....	24
<b>Figura 2</b> - Fotos da artéria renal esquerda isolada (A) e com o clipe de prata (B) ...	27
<b>Figura 3</b> - Mensuração da PA não-invasiva em ratos.....	28
<b>Figura 4</b> - Cateteres localizados na artéria e veia femorais do rato, respectivamente.....	29
<b>Figura 5</b> - Evolução temporal da pressão arterial sistólica não invasiva em animais normotensos e hipertensos .....	32
<b>Figura 6</b> - Imagem representativa da variação da PA máxima, diante da aplicação de doses de Esclareol e Veículo.....	33
<b>Figura 7</b> - Curva dose-resposta de Esclareol, na presença dos inibidores.....	34
<b>Figura 8</b> - Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores.....	35
<b>Figura 9</b> - Níveis de nitrito e nitrato (NOx) plasmático em animais normotensos e hipertensos.....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Evolução da PAS não invasiva em animais normotensos e hipertensos.....	33
<b>Tabela 2</b> - Relação entre a dose (mg/Kg) de Esclareol e Veículo na variação PA máxima.....	34
<b>Tabela 3</b> - Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**2R1C:** 2 rins-1 clipe

**Ach:** Acetilcolina

**AMP:** Monofosfato de adenosina

**Ang 2:** Angiotensina II

**Ang I:** Angiotensina I

**ATP:** Trifosfato de adenosina

**CE:** Com endotélio

**ECA:** Enzima conversora de angiotensina

**EDHF:** Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

**EDRFs:** Fatores de relaxamento derivado do endotélio

**eNOS:** Óxido nítrico sintase endotelial

**ESC:** *European Society of Cardiology* (Sociedade Europeia de Cardiologia)

**ESH:** *European Society of Hypertension*(Sociedade Europeia de Hipertensão)

**EUA:** Estados Unidos da América

**GMPc:** Monofosfato cíclico de guanosina

**GTP:** Trifosfato de guanosina

**HAS:** Hipertensão arterial sistêmica

**IFN-  $\gamma$ :** Interferon  $\gamma$

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 $\beta$

**iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível

**I-NAME:** N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester

**NADPH-oxidase:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase hidrogenase-oxidase

**nNOS:** Óxido nítrico sintase neuronal

**NO:** Óxido Nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** Nitrato

**NOS:** Óxido nítrico sintase

**ODQ:** 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

**PA:** Pressão Arterial

**PGI<sub>2</sub>:** Prostaciclina

**Phe:** Fenilefrina

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio

**RVP:** Resistência vascular periférica

**SCC:** Sistema calicreína-cinina

**SE:** Sem endotélio

**sGC:** Guanilato ciclase

**SRAA:** Sistema renina-angiotensina-aldosterona

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral

**$\Delta$ PAS:** Variação da pressão arterial sistólica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica .....	17
2.2 Disfunção Endotelial.....	18
2.3 Óxido Nítrico.....	19
2.4 Drogas anti-hipertensivas.....	20
2.4.1 Inibidores de ECA .....	20
2.4.2 Vasodilatadores diretos .....	20
2.4.3 Inibidores diretos da renina .....	21
2.4.4 Antagonistas adrenérgicos .....	21
2.4.5 Diuréticos .....	21
2.4.6 Boqueadores dos canais de cálcio .....	21
2.4.7 Antagonistas dos receptores de Ang II.....	22
2.5 Diterpenos .....	22
2.5.1 Diterpenos com ação cardiovascular.....	22
2.6 Esclareol.....	23
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Drogas.....	26
4.2 Animais.....	26
4.3 Indução da hipertensão 2 rins - 1 clipe.....	26
4.4 Avaliação da pressão arterial de cauda .....	27
4.5 Medida da pressão arterial invasiva após administração de drogas .....	28
4.6 Avaliação do efeito do composto esclareol sobre as pressões sistólica, diastólica e média em animais normotensos e hipertensos .....	28
4.7 Estudo da reatividade vascular da aorta .....	29

4.8 Determinação indireta de óxido nítrico (NO) plasmático pela da dosagem de nitrito (NO <sub>2</sub> -) e nitrato (NO <sub>3</sub> -).....	31
4.9 Análise estatística .....	31
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 Evolução temporal PAS não invasiva.....	32
5.2 Efeito da administração aguda de Esclareol e veículo na variação PA máxima .	33
5.3 Efeito dos inibidores sobre o relaxamento induzido pelo Esclareol.....	34
5.4 Efeito do Esclareol sobre o óxido nítrico plasmático .....	36
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
6.1 Modelo 2R1C .....	37
6.2 Ação do esclareol <i>in vivo</i> .....	37
6.3 Ação do esclareol <i>in vitro</i> (reatividade vascular) .....	38
6.4 Influência do esclareol nas dosagens de NO .....	40
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>8 REFERENCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>9 ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença cardiovascular comum que afeta cerca de 50 milhões de pessoas nos EUA, e um número proporcional a este no Brasil <sup>[1]</sup>. Ela é definida como pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg. Esta condição pode resultar em complicações cardiovasculares, como infarto e acidente vascular encefálico, bem como outras complicações, tais como insuficiência renal. A HAS está fortemente associada com doenças cardiovasculares, que causam morbidade e mortalidade, e a diminuição da pressão arterial é eficaz na prevenção de doença cardiovascular <sup>[1-4]</sup>.

Considerando o impacto da hipertensão arterial na morbidade e mortalidade mundial, vários estudos foram realizados com o intuito de encontrar a melhor forma de tratamento. Por isso, há uma imensa variedade de medicamentos que são utilizados no tratamento da hipertensão. Dentre eles estão: os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), os antagonistas adrenérgicos, os diuréticos, os vasodilatadores diretos, bloqueadores para canais de cálcio, antagonistas do receptor da angiotensina II, inibidores de renina <sup>[3,4]</sup>.

Por outro lado, o reino vegetal tem contribuído de forma bastante significativa para o fornecimento de substâncias aplicáveis no tratamento de doenças que acometem os seres humanos <sup>[5,6]</sup>. Neste contexto, os diterpenos constituem uma extensa classe de metabólitos secundários produzidos por diversas plantas e que apresentam importantes atividades biológicas <sup>[7]</sup>.

Muitos estudos têm mostrado que diversas classes de diterpenóides exercem efeito significativo sobre o sistema cardiovascular <sup>[8-11]</sup>. Esses estudos apontam essa



classe de metabólitos como uma fonte promissora de protótipos para o desenvolvimento de novos agentes na terapêutica cardiovascular.

A forskolina, composto muito usado como ferramenta farmacológica, é um diterpeno labdano que promove ativação do AMP cíclico <sup>[9]</sup>. O diterpeno ácido caurenóico inibe a vasoconstrição pelo bloqueio do influxo extracelular de cálcio, efeito esse que é compartilhado por diversos compostos diterpenóides, como por exemplo o pimarane. Por outro lado, o Jatrophone promove a vasodilatação através da ativação de canais K<sup>+</sup>, o que se difere dos subtipos sensíveis ao ATP<sup>[8-11]</sup>.

Considerando os efeitos cardiovasculares promovidos pelos diterpenos, é importante que se estude cada vez mais compostos desta classe. O diterpeno esclareol extraído a partir de inflorescências de *Salvia sclarea* L.<sup>[12,13]</sup>, uma erva da família Lamiaceae, apresenta ações anti-inflamatórias <sup>[14]</sup>, anti microbianas, efeitos citotóxicos e citostáticos em linhagens de células leucêmicas, ações anti-tumorais <sup>[15-17]</sup>, entre outras funções. Entretanto, não há estudos avaliando os efeitos cardiovasculares do esclareol. Sendo assim, o presente estudo foi delineado de forma a investigar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular (*in vitro* e *in vivo*) do diterpeno esclareol em ratos normotensos e hipertensos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica

A Hipertensão arterial sistêmica (HAS) é definida como pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg. É uma doença cardiovascular comum que afeta cerca de 50 milhões de pessoas nos EUA, e um número proporcional a este no Brasil. Esta condição pode resultar em complicações cardiovasculares, como infarto e acidente vascular encefálico, bem como de outras complicações, tais como insuficiência renal, entre outras<sup>[1-4]</sup>.

Até o ano de 1994, as diretrizes que abordaram o tratamento da hipertensão focaram somente nos valores da pressão sanguínea para determinar a necessidade e o tipo de tratamento<sup>[3,4]</sup>. No entanto, atualmente sabe-se que a HAS está fortemente associada com doenças cardiovasculares, que causam morbidade e mortalidade, e a diminuição da pressão arterial é eficaz na prevenção de doença cardiovascular<sup>[18]</sup>. O conceito é com base no fato de que apenas uma pequena fração da população de hipertensos tem uma elevação de pressão arterial por si só, pois a maioria dos hipertensos apresentam fatores de risco cardiovascular adicionais. Além disso, quando estão concomitantemente presentes, a HAS somada a outros fatores de risco leva a um risco cardiovascular que é maior do que a soma dos seus componentes individualmente. Finalmente, em indivíduos de alto risco, as estratégias de tratamento anti-hipertensivo (Iniciação e intensidade de tratamento, a utilização de combinações de medicamentos bem como outros tratamentos) pode ser diferente daquelas a serem implementadas em indivíduos de menor risco<sup>[3,4,18]</sup>.

Há evidência de que, em indivíduos de alto risco, o controle da pressão arterial é mais difícil e mais frequentemente requer a combinação de fármacos anti-

hipertensores com outras terapias, tais como tratamentos hipolipemiantes agressivos. A abordagem terapêutica deve considerar o risco total a fim de maximizar a relação custo-eficácia da gestão da hipertensão. Esta abordagem é atualmente aceita e já tinha sido integrada nas orientações da ESH / ESC 2003 e 2007 para o tratamento da hipertensão arterial [3,4].

## 2.2 Disfunção Endotelial

O papel do endotélio vascular é muito importante para o desenvolvimento de hipertensão arterial. O endotélio saudável em repouso libera continuamente vasodilatadores potentes em resposta ao fluxo sanguíneo, sendo responsáveis por reduzir a resistência vascular diretamente<sup>[19]</sup>. As células endoteliais vasculares desempenham papéis fundamentais na manutenção homeostase cardiovascular, pois o endotélio fornece não só uma barreira física entre a parede do vaso e lúmen, mas também executa uma função crítica para a manutenção da pressão arterial, liberando fatores vasodilatadores e vasoconstritores. Fatores de relaxamento derivado do endotélio (EDRFs), incluindo o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), desempenham um papel central na regulação do tônus vascular<sup>[20]</sup>.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidos por vários sistemas de enzimas presentes no endotélio vascular, incluindo NADPH-oxidase, xantina oxidase, e a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Fatores de risco cardiovascular, tais como hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes mellitus aumentam a produção de ROS, resultando em aumento do estresse oxidativo<sup>[21]</sup>. A isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) é responsável pela a produção

de óxido nítrico no endotélio. O aumento da produção de ROS, leva a uma diminuição da tetrahidrobiopterina, um cofator da eNOS, ocasionando um desacoplamento da eNOS que passa a produzir o anion superóxido em vez de óxido nítrico, o que aumenta ainda mais o estresse oxidativo e pode induzir processos patogênicos vasculares<sup>[22]</sup>.

### 2.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é produzido por células epiteliais das vias aéreas (vias aéreas de grosso calibre, periféricas e alvéolos), células endoteliais das vias respiratórias e circulatórias, células que participam de reações inflamatórias, dentre outras<sup>[23]</sup>. É uma molécula de sinalização essencial na fisiologia do corpo humano, gerada por três isoformas da NO sintase (NOS) que são diferentemente expressas e reguladas nas vias aéreas<sup>[24]</sup>. Estas isoformas são:

- 1) NOS constitutiva neuronal (nNOS ou NOS I)
- 2) NOS induzível (NOS II ou iNOS)
- 3) NOS constitutiva endotelial (NOS III ou eNOS).

As NOS constitutivas (nNOS e eNOS) produzem pequenas quantidades de NO e são ativadas por íons de cálcio e parecem desempenhar um papel regulador local, tal como a neurotransmissão (nNOS) e regulação do fluxo sanguíneo local (eNOS)<sup>[23]</sup>. Por outro lado, a iNOS não é constitutivamente expressa, mas é induzida por estímulos inflamatórios e infecciosos por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interferon-(IFN-  $\gamma$ ), e interleucina (IL)-1 $\beta$ , produzindo grandes quantidades de NO independente do influxo de íons cálcio, sugerindo ter um efeito pro-inflamatório<sup>[23,24]</sup>.

As isoenzimas NOS convertem L-arginina em L-citrulina com a produção de NO<sup>[23-25]</sup>. A L-arginina é o único substrato fisiológico para a NOS, por isso sua regulação pode determinar as taxas de produção do NO<sup>[24]</sup>. O NO liberado pelas células endoteliais promove o relaxamento do músculo liso vascular, e inibe a adesão e agregação plaquetária, através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC). Esta enzima catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o qual atua ativando diversas proteino-cinases. Após a ação vasodilatadora, a inativação do GMPc ocorre através de sua hidrólise, catalisada por enzimas da família das fosfodiesterases<sup>[26]</sup>.

## **2.4 Drogas anti-hipertensivas**

### **2.4.1 Inibidores de ECA**

Os inibidores de ECA impedem a conversão da Angiotensina I (Ang I) no vasoconstrictor Angiotensina II (Ang II). Este medicamento é particularmente efetivo no tratamento na HAS de paciente hiper-reninêmicos<sup>[1]</sup>.

### **2.4.2 Vasodilatadores diretos**

Os vasodilatadores diretos atuam diretamente sobre a musculatura vascular, promovendo a redução da resistência vascular periférica. Também podem resultar em retenção hídrica e taquicardia reflexa, por isso não são utilizados isoladamente<sup>[1]</sup>.

### **2.4.3 Inibidores diretos da renina**

Este medicamento interage com o sítio ativo da renina, o que inibe a sua função catalítica e impede a formação da Ang I e conseqüentemente da Ang II<sup>[1]</sup>.

### **2.4.4 Antagonistas adrenérgicos**

Os antagonistas adrenérgicos são divididos em três grupos: central, alfa-1-antagonista e beta antagonista. Os anti-hipertensivos de ação central são agonistas alfa-2-adrenérgicos pré-sinápticos e/ou os receptores de imidazolidínicos no sistema nervoso central, reduzindo a descarga simpática. Por outro lado, o mecanismo de ação dos beta antagonistas é a diminuição do débito cardíaco, redução da secreção de renina e readaptação de barorreceptores<sup>[1]</sup>.

### **2.4.5 Diuréticos**

O mecanismo de ação dos diuréticos relaciona-se, primariamente, à redução de volume e, a seguir, a redução da RVP. Apresentam eficácia no tratamento da hipertensão além de diminuir morbidade e mortalidade<sup>[1]</sup>.

### **2.4.6 Boqueadores dos canais de cálcio**

Os bloqueadores dos canais de cálcio diminuem a concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares e promovem a redução da RVP<sup>[1]</sup>.

### 2.4.7 Antagonistas dos receptores de Ang II

Os antagonistas dos receptores de Ang II atuam principalmente nos receptores AT1, inibindo a maioria dos efeitos da Ang II (vasoconstrição, resposta pressórica rápida e lenta, sede, liberação de vasopressina, secreção de aldosterona, liberação de catecolaminas adrenais, aumento da neurotransmissão noradrenérgica, aumento do tônus simpático, mudança na função renal, hiperplasia e hipertrofia celular)<sup>[1]</sup>.

## 2.5 Diterpenos

A fim de encontrar novos medicamentos à base de plantas, é necessário buscar extratos com a presença de novos compostos para investigar suas atividades e características biológicas<sup>[9]</sup>. Os diterpenos são uma família de compostos isoprenóides naturais derivados do 2E,6E,10E geranylgeranylpirofosfato. Estes compostos são sintetizados em plantas, localizados nos plastídios, mas também podem ser sintetizados por certos organismos marinhos e insetos<sup>[12]</sup>. São necessárias unidades de cinco carbonos para sua formação e são produzidos através da via metileritritol fosfato (MEP)<sup>[7]</sup>.

### 2.5.1 Diterpenos com ação cardiovascular

A forskolina, composto muito usado como ferramenta farmacológica, é um diterpeno labdano que promove ativação do AMP cíclico<sup>[9]</sup>. O diterpeno ácido caurenóico inibe a vasoconstrição pelo bloqueio do influxo extracelular de cálcio<sup>[23]</sup>,

<sup>26]</sup>, efeito esse que é compartilhado por diversos compostos diterpenóides, como por exemplo o pimarane. Além disso, a ativação de isoformas endotelial e neuronal da NO sintase são necessárias para o efeito relaxante induzido pelo ácido caurenóico. Por outro lado, o Jatrophone promove a vasodilatação através da ativação de canais K<sup>+</sup>, o que se difere dos subtipos sensíveis ao ATP<sup>[8-11]</sup>.

## 2.6 Esclareol

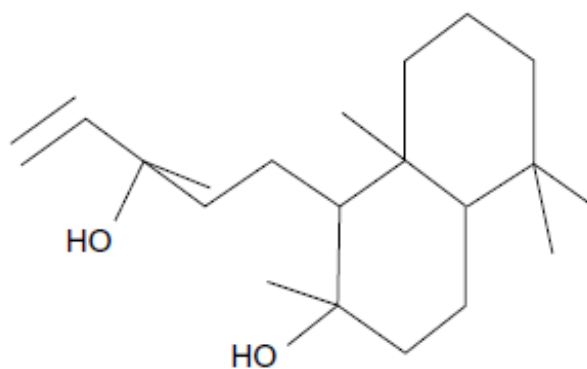
O esclareol começou a ser produzido como uma forma de substituir compostos da indústria da perfumaria, como por exemplo o ambergris, extraído do esperma de baleias e utilizado como um fixador de fragrâncias. Devido a grande demanda e diminuição no número de baleias, os químicos começaram a desenvolver vias sintéticas para a produção desta molécula utilizando produtos naturais como o esclareol. O esclareol pode ser extraído a partir de inflorescências de *Salvia sclarea* L., uma erva da família Lamiaceae, que é mais comumente cultivada por seu óleo essencial. O relativamente fácil cultivo desta erva e seu alto rendimento tem incentivado produtores de sálvia a iniciar programas de melhoramento genético e expandir suas plantações<sup>[27]</sup>.

Em 2008, o Research Institute for Fragrance Materials realizou uma revisão da literatura sobre o esclareol, publicada na revista *Food and Chemical Toxicology*, em que foram estabelecidas as principais características deste composto. Foram utilizadas as bases de dados Chemical Abstract Services e The National Library of Medicine<sup>[12]</sup>.

Os sinônimos para esclareol encontrados foram: Labd-14-ene-8,13-diol, 1-naphthalenepropanol,  $\alpha$ -ethenyldecahydro-2-hydroxy- $\alpha$ ,2,5,5,8a-pentamethyl. A



fórmula química é  $C_{20}H_{36}O_2$ . O peso molecular é 308.51. Quanto as suas propriedades físicas, o esclareol é um pó cristalino branco com ponto de ebulição  $> 340\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[12]</sup>. Sua estrutura molecular está evidenciada na figura 1.



**Figura 1 - Estrutura molecular do Esclareol.**

Apesar de, originalmente, o esclareol ser usado como um produto da indústria de perfumaria, o real potencial deste composto vem sendo estudado nos últimos 10 anos. Foram realizados uma série de estudos demonstrando suas ações anti microbianas, efeitos citotóxicos e citostáticos em linhagens de células leucêmicas e ações anti-tumorais<sup>[15-17]</sup>. Por meio da citometria de fluxo, foi possível observar que o esclareol matou as linhagens celulares através do processo de apoptose, sendo este considerado dependente da dose e do tempo<sup>[16]</sup>. Apesar destes resultados, são necessários novos estudos para que o esclareol seja efetivamente utilizado na prática clínica no tratamento de pacientes com câncer.

Como citado anteriormente, os diterpenos apresentam ações no sistema cardiovascular. O diterpeno esclareol apresenta muitas funções, no entanto nunca foram estudados os efeitos deste composto no sistema cardiovascular. Por isso, é de suma importância que tais investigações sejam realizadas, considerando que este composto é altamente disponível e seguro para testes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito vascular do diterpeno esclareol *in vitro* e *in vivo* em animais normotensos e hipertensos

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do esclareol sobre a pressão arterial dos animais, após administração de diferentes doses.
- Avaliar o perfil de relaxamento induzido pelo esclareol em anéis de aorta de ratos.
- Verificar quais os mecanismos celulares envolvidos na resposta de relaxamento mediada pelo esclareol em aorta de ratos.
- Verificar o efeito do esclareol sobre os níveis plasmáticos de NO em animais normotensos e hipertensos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Drogas**

Os compostos utilizados no projeto foram adquiridos da Sigma e foram solubilizados em DMSO e diluídos em solução etanol + água (2:10).

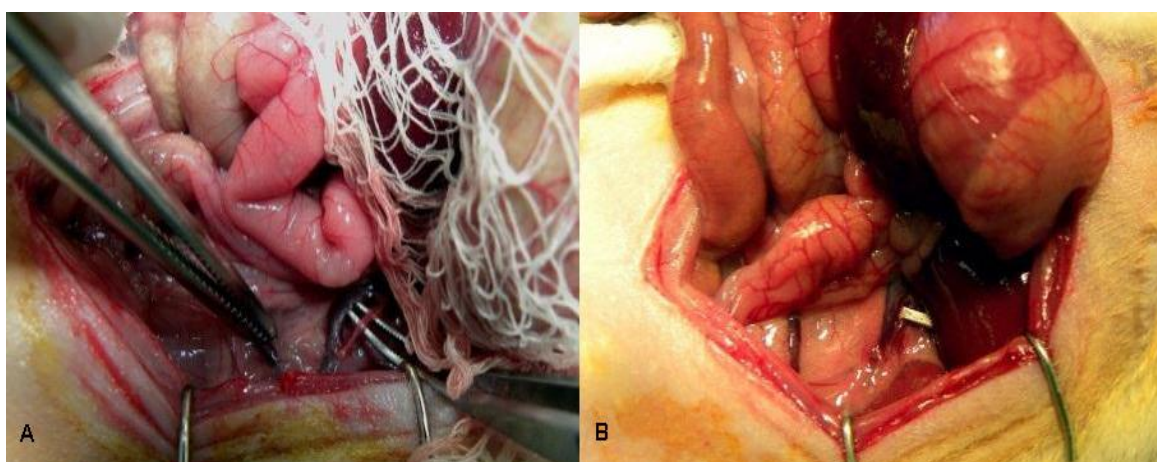
### **4.2 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando em média 250 – 300g provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Cirurgia e Anatomia, em ambiente com temperatura (22-25°C) e ciclo claro/escuro (12:12 horas) controlados. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração. Os procedimentos com os animais, bem como os protocolos experimentais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, protocolo 060/2010.

### **4.3 Indução da hipertensão 2 rins - 1 clipe**

Os animais foram anestesiados com xilazina (20mg/kg) associada à ketamina (50 mg/Kg) via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada tricotomia da região abdominal e assepsia do local. Para realização do procedimento cirúrgico, a cavidade abdominal foi aberta por incisão longitudinal na linha Alba, o intestino deslocado para visualização do rim esquerdo e a artéria renal esquerda foi

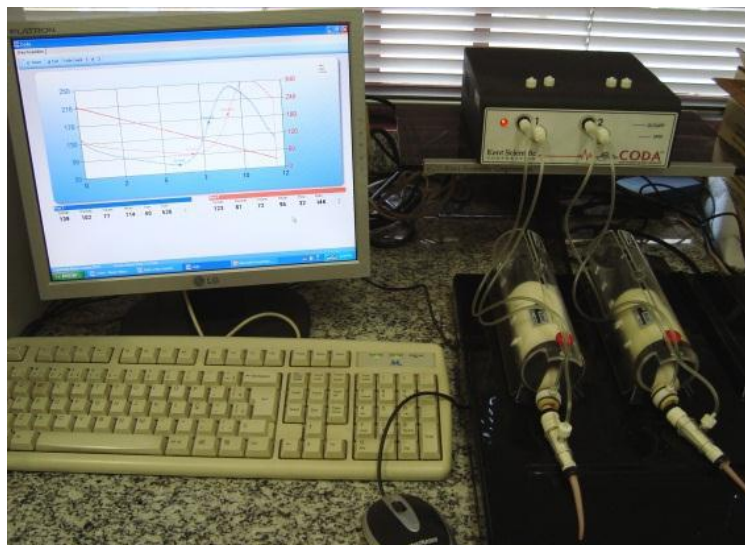
clampeada com um clipe de prata (abertura interna 0,1 mm) (Figura 2). Os ratos sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico com exceção da colocação do clipe. Após esse procedimento, a cavidade abdominal foi suturada em dois planos: no plano muscular com pontos contínuos e no plano da pele com pontos individuais. Foram considerados hipertensos os animais que apresentarem aumento mínimo de pressão arterial sistólica de cauda de 30 mmHg após 3 semanas da indução de hipertensão.



**Figura 2 - Fotos da artéria renal esquerda isolada (A) e com o clipe de prata (B).**

#### **4.4 Avaliação da pressão arterial de cauda**

A pressão arterial de cauda foi avaliada utilizando-se um manguito, conectado a um sensor para registro de pressão arterial sistólica (Kent Scientific Corporation, Connecticut, USA), colocado em torno da cauda do animal, a qual foi previamente aquecida. Esse procedimento foi realizado 24 horas antes da intervenção para avaliar o desenvolvimento da hipertensão (Figura 3).



**Figura 3 - Mensuração da PA não-invasiva em ratos.**

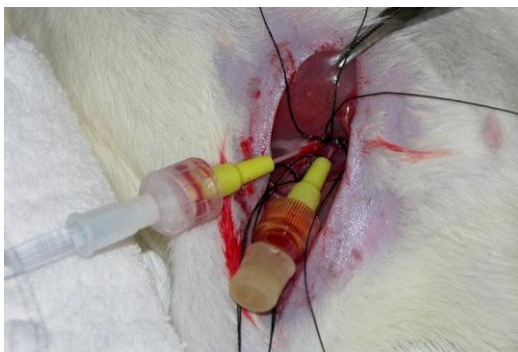
#### **4.5 Medida da pressão arterial invasiva após administração de drogas**

A monitorização da pressão arterial média invasiva foi realizada utilizando-se o MP System 100 A (BioPac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). O MP System 100 A é um sistema capaz de coletar, analisar, armazenar e recuperar dados biofísicos. O MP System 100 A é conectado a um PC Gateway (Gateway, Sioux City, SD, USA) com sistema operacional Windows 2008. Os cateteres vasculares foram colocados na artéria femoral e conectados a transdutores de pressão, e estes, ao sistema de registro contínuo MP System 100 A. Também foram inseridos cateteres na veia femoral para administração dos compostos.

#### **4.6 Avaliação do efeito do composto esclareol sobre as pressões sistólica, diastólica e média em animais normotensos e hipertensos**

Após 3 semanas da indução da hipertensão, os animais normotensos e hipertensos foram anestesiados com xilazina/ketamina (20/50 mg/Kg)

intraperitoneal. A artéria e a veia femorais foram isoladas e um cateter (24G x 0,75" Angiocath BD®) foi inserido em cada vaso, a fim de monitorar a pressão arterial e manter um acesso venoso para a administração de drogas (Figura 4).



**Figura 4 - Cateteres localizados na artéria e veia femorais do rato, respectivamente.**

Após 20 minutos de monitorização, tempo necessário para estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, os animais receberam 3 doses de esclareol nas concentrações 10, 20 e 40 mg/Kg com intervalos de 6 minutos, tempo suficiente para a pressão retornar ao nível basal. Durante a curva dose-resposta foram realizadas medidas da pressão arterial.

#### **4.7 Estudo da reatividade vascular da aorta**

Após completa anestesia (xilazina/ketamina 20/50 mg/Kg), foi realizada uma toracotomia e a aorta foi retirada cuidadosamente e imediatamente imersa em solução de Krebs a 37°. A amostra da aorta de cada animal, mantida em solução de Krebs, foi dissecada para remoção de tecidos externos à adventícia e seccionada em 4 anéis (4 mm de extensão cada) que foram utilizados no estudo da reatividade vascular. Alguns anéis tiveram o endotélio removido mecanicamente esfregando a luz do vaso com auxílio de um fio de aço, fino de maneira delicada.

Após esta preparação inicial, cada anel foi suspenso entre duas alças de aço inoxidável, passadas através de sua luz, e este conjunto foi imerso em uma cuba (10 ml) do sistema de banho orgânico para tecido isolado. As cubas foram preenchidas com solução de Krebs (composição milimolar: NaCl 118,3; KCl 4,7; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,22; CaCl<sub>2</sub> 2,5; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,1; pH 7,4), mantidas a 37°C e aeradas com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Uma das alças foi ancorada a um suporte fixo e a outra conectada a um transdutor (Grass force-displacement transducer FT03, Grass Instrument CO, Quincy, EUA) para mensuração da tensão isométrica. Os transdutores foram acoplados a um registrador de 8 canais (Gould, Cleveland, EUA), permitindo, desta forma, o registro simultâneo da tensão isométrica.

Antes de iniciar os experimentos farmacológicos propriamente ditos, os anéis vasculares foram submetidos ao ponto ótimo de estiramento-tensão de 2 g, por meio de um sistema micrométrico, e permaneceram em repouso sob esta tensão durante 40 minutos. Após este período de estabilização, foi induzida a contração dos anéis mediante adição de fenilefrina (Phe, 10<sup>-4</sup> M) ao banho, esta contração permitiu avaliar a integridade da musculatura lisa. Depois de atingido o platô de contração, a presença ou a ausência de endotélio nos anéis foi confirmada mediante a indução de relaxamento pela adição de acetilcolina (ACh, 10<sup>-3</sup> M) ao banho. Foram considerados com endotélio, os anéis vasculares não submetidos à remoção mecânica do endotélio que relaxaram ao menos em 75% a pré-contração. Subseqüentemente, a solução das cubas foi substituída por uma solução de Krebs pura e a preparação foi deixada em repouso por 30 minutos.

Após este segundo período de estabilização, curvas concentração-resposta para esclareol foram obtidas em anéis de aorta, com ou sem endotélio, pré-contraídos com Phe 10<sup>-7</sup>M. A resposta de relaxamento foi expressa como a porcentagem de relaxamento relativa à pré-contração com Phe.

Com intuito de estudar os mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo esclareol, curvas concentração-resposta para o esclareol foram obtidas em anéis de aorta com e sem endotélio, pré-contraídos com Phe, após incubação por 30 minutos com L-NAME (inibidor não seletivo da NO sintase, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) e com ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel, 100  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### **4.8 Determinação indireta de óxido nítrico (NO) plasmático pela da dosagem de nitrito (NO<sub>2</sub>-) e nitrato (NO<sub>3</sub>-)**

As dosagens indiretas de NO plasmático foram realizadas pela determinação dos níveis séricos de nitrito e nitrato utilizando-se o Sievers NOAnalyzer 280i (Sievers, Boulder, CO, E.U.A.). Amostras de sangue total foram coletadas pela artéria femoral e colocadas em tudo heparinizado. O plasma foi obtido por centrifugação e mergulhado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (-70°C) para posterior dosagem do Nitrato/Nitrito. Essa análise foi realizada em sangue de animais normais e hipertensos que receberam tratamento com cada um dos compostos ao final da terceira semana após a cirurgia de indução de hipertensão. A administração foi realizada por via endovenosa.

#### **4.9 Análise estatística**

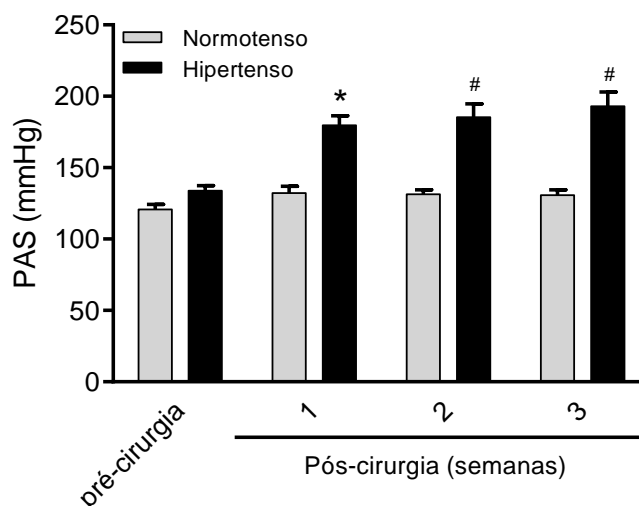
Análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni foram realizadas para detectar possíveis diferenças entre os valores em estudo.  $P < 0,05$  foi considerado significativo.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Evolução temporal PAS não invasiva

A figura 5 demonstra a evolução temporal da PAS não invasiva nos grupos normotenso e hipertenso. Diante da evolução dos animais do grupo normotenso, pode-se observar que PAS apresentou pouca alteração, variando de 120,714 (pré-cirurgia) à 130,626 (3ª semana/pós-cirurgia), ao passo que a análise feita dos animais pertencentes ao grupo hipertenso, nos evidenciou importante aumento da PAS, variando de 133,869 (pré-cirurgia) à 192,977 (3ª semana/pós-cirurgia). Os respectivos valores encontram-se na tabela 1.



**Figura 5 - Evolução temporal da pressão arterial sistólica não invasiva em animais normotensos e hipertensos.** Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$  para ambos os grupos) da PAS antes da cirurgia 2R1C (pré-cirurgia) e nas 3 semanas subsequentes a cirurgia. \* ( $p < 0,05$ ) indicada diferença significativa do grupo hipertenso em relação ao grupo normotenso referente a 1ª semana/Pós-cirurgia e # ( $p < 0,01$ ) indica diferença significativa do grupo hipertenso em relação ao grupo normotenso referente a 2ª e 3ª semanas/Pós-cirurgia.

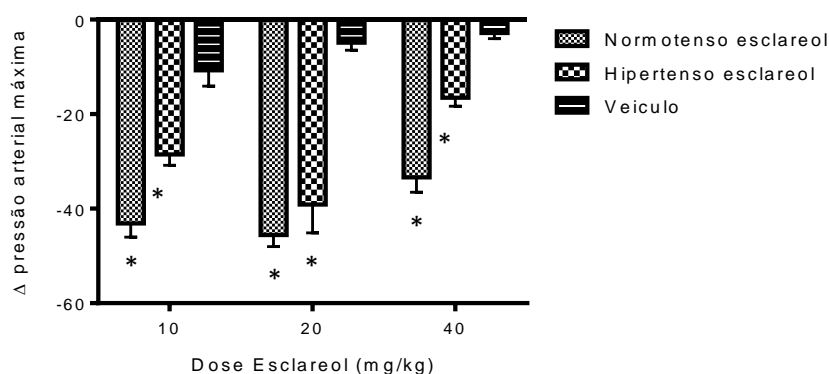
**Tabela 1- Evolução da PAS não invasiva em animais normotensos e hipertensos.**

Evolução temporal da PAS				
Grupos	Pré-2R1C	1º semana	2º semana	3º semana
Normotenso	120,714	132,119	131,388	130,626
Hipertenso	133,869	179,704*	185,368 <sup>#</sup>	192,977 <sup>#</sup>

Cada valor representa a média ± erro padrão da média. Duas vias ANOVA, pós-teste de Bonferroni. \* ( $p < 0,05$ ) e # ( $p < 0,01$ ) indicam diferença significativa entre os grupos. (n = 5).

## 5.2 Efeito da administração aguda de Esclareol e veículo na variação PA máxima

A figura 6 ilustra a variação da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS), após administrações consecutivas de 3 doses crescentes de Esclareol e veículo (10, 20 e 40 mg/Kg) em ratos normotensos e hipertensos. A análise do efeito do Esclareol sobre a  $\Delta$ PAS mostrou que, em ambos os grupos, houve uma importante redução da  $\Delta$ PAS. Em contraponto, a substância Veículo apresentou discreto efeito redutor.



**Figura 6 - Imagem representativa da variação da PA máxima, diante da aplicação de doses de Esclareol e Veículo (n=5).** \* ( $p < 0,05$ ) indicam diferença significativa entre os grupos hipertenso esclareol x veículo, e entre os grupos normotenso esclareol x veículo. A variação da pressão referente a cada a cada grupo, está descrita na Tabela 2.

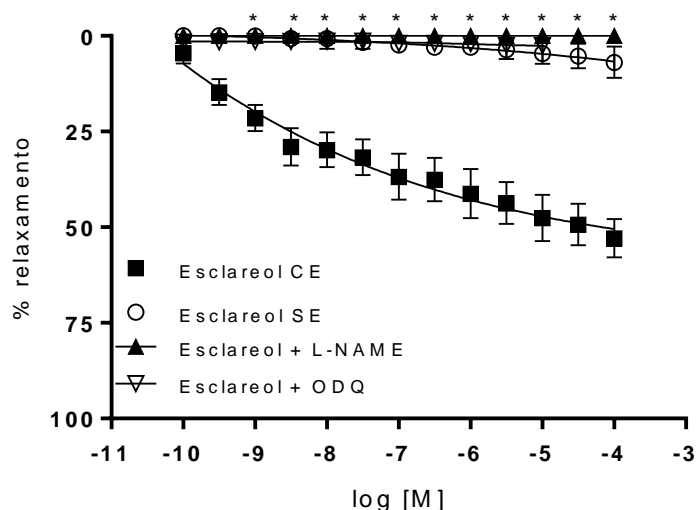
**Tabela 2 - Relação entre a dose (mg/Kg) de Esclareol e Veículo na variação PA máxima (n=5).**

Dose (mg/Kg)	Normotenso Esclareol	Hipertenso Esclareol	Veículo
10	-43,13333*	-28,52857*	-10,7300
20	-45,56000*	-39,14000*	-4,8600
40	-33,38000*	-16,50286*	-2,8475

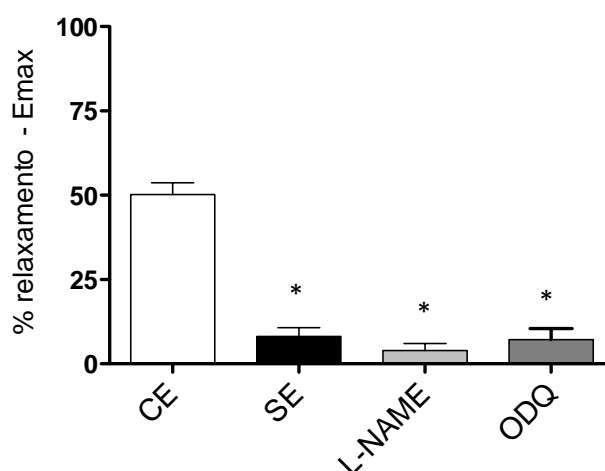
**Cada valor representa a média ± erro padrão da média. One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.**

### 5.3 Efeito dos inibidores sobre o relaxamento induzido pelo Esclareol

O Esclareol foi utilizado nas curvas concentração-resposta, na presença dos inibidores L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e ODQ (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Os inibidores de óxido nítrico sintase e guanilato ciclase foram tão eficientes quanto a retirada do endotélio, em inibir o relaxamento induzido pelo Esclareol (Figura 7 e 8). A variação da porcentagem de relaxamento - Emax está presente na tabela 3.



**Figura 7 - Curva dose-resposta de Esclareol, na presença dos inibidores.** Após a pré-contracção com Phe  $10^{-7}\text{M}$ , os anéis foram submetidos a uma curva dose-resposta de  $10^{-10}$  a  $10^{-4}$  na presença dos inibidores L-NAME e ODQ. \* ( $p < 0,05$ ) indicam diferença significativa entre os grupos Esclareol SE, Esclareol + L-NAME e Esclareol + ODQ em relação ao grupo Esclareol CE. CE: Com endotélio. SE: Sem endotélio.



**Figura 8 - Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores.** Todos os anéis foram submetidos a 11 doses crescentes e diferentes de Esclareol, porém, cada grupo apresentava uma condição particular: 1) anéis CE, 2) anéis SE, 3) anéis CE e L-NAME e 4) anéis CE e ODQ. Cada grupo foi submetido à análise e comparação de seu respectivo efeito sobre o anel (n = 5 para cada grupo). . \* (p<0,05) indicam diferença significativa entre os grupos SE, L-NAME e ODQ em relação ao grupo CE. CE: Com endotélio. SE: Sem endotélio.

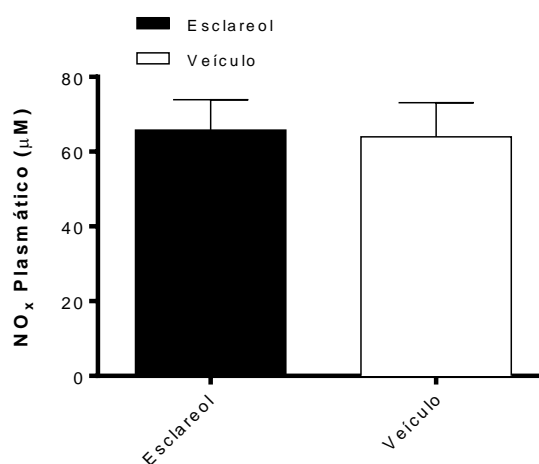
**Tabela 3 - Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores.**

Grupos	% de relaxamento
Esclareol CE	52,94
Esclareol SE	25,79*
L-NAME	3,94*
ODQ	7,18*

Cada valor representa a média ± erro padrão da média. One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. \* (p<0,05) indica diferença significativa entre os grupos (n = 5).

#### 5.4 Efeito do Esclareol sobre o óxido nítrico plasmático

A análise das dosagens do NO plasmático mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos (figura 9).



**Figura 9 - Níveis de nitrito e nitrato (NO<sub>x</sub>) plasmático em animais normotensos e hipertensos.** Os animais foram pré-tratados com veículo ou esclareol. (n = 5 para todos os grupos). One-way ANOVA, pós teste de Bonferroni.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Modelo 2R1C

O modelo 2R1C, utilizado para a indução de hipertensão, apresentou resultados satisfatórios, com um aumento significativo na PA dos animais. Os valores da PAS encontrados nos animais hipertensos estão em acordo com outros autores que avaliaram modelo semelhante. Estudos revelaram que, o modelo experimental em questão, apresenta aumento de atividade da ECA tanto no plasma, quanto no tecido cardíaco de ratos com hipertensão renovascular com duas e doze semanas de evolução, e concluíram que o aumento de atividade da enzima contida no tecido, tem papel importante nas alterações de órgão-alvo nesse modelo experimental <sup>[28]</sup>.

### 6.2 Ação do esclareol *in vivo*

Os resultados obtidos após a administração de 3 doses crescentes de esclareol demonstram que ele promoveu uma redução na PA, tanto no grupo normotenso quanto no grupo hipertenso. Os mecanismos envolvidos nesse efeito relaxante ainda permanecem desconhecidos. Apesar disto, este efeito pode estar ligado ao fato de que estes compostos são possivelmente responsáveis pela atividade vasodilatadora através da ativação das vias do NO.

Analisando mais profundamente os dados coletados, no modelo 2R1C, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é o principal fator no desenvolvimento da HAS <sup>[29]</sup>. Na HAS há uma ativação do SRAA e por sua vez, uma

maior inibição do sistema calicreína-cinina (SCC) pela ECA <sup>[30,31]</sup>, isso pode implicar em menor redução da PAS induzida pelo esclareol no grupo hipertenso. A maior redução na PAS, no grupo normotenso, em resposta a administração do esclareol, pode ser um indicativo de uma interação entre o SRAA e o SCC <sup>[30,31]</sup>, no entanto é necessário mais experimentos para determinar a real causa.

### 6.3 Ação do esclareol *in vitro* (reatividade vascular)

O efeito vasorrelaxante de vários diterpenos tem sido investigado em anéis com e sem endotélio. Diversos estudos enxergam estas substâncias como sendo uma fonte promissora de novos protótipos, para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes destinados à terapêutica cardiovascular <sup>[9]</sup>.

O diterpeno esclareol é extraído a partir de inflorescências de *Salvia sclarea* L., uma erva de relativamente fácil cultivo e alto rendimento <sup>[13, 27]</sup>. Os estudos que utilizaram este composto evidenciaram suas ações anti microbianas, efeitos citotóxicos e citostáticos em linhagens de células leucêmicas e ações anti-tumorais <sup>[14-17]</sup>. Não há estudos prévios que avaliam suas ações cardiovasculares.

Por isso, é necessário que seja realizado uma comparação entre os estudos realizados previamente utilizando-se de outros diterpenos e os resultados evidenciados no presente estudo. Como por exemplo, O KA-OCH<sub>3</sub>, um composto semi-sintético derivado do ácido caurenóico induziu relaxamento vascular e hipotensão, por mecanismos que envolvem o bloqueio do influxo de cálcio e a ativação da via NO-cGMP. A incubação de anéis de aorta de ratos com L-NAME e ODQ provocou um deslocamento para a direita da curva de concentração - resposta do KA - OCH<sub>3</sub> <sup>[8]</sup>. Já no presente estudo, o relaxamento vascular foi totalmente

inibido pelo L-NAME, o que evidencia que a ação do esclareol é totalmente dependente de NO.

Tirapelli e colaboradores também descreveram os mecanismos envolvidos no efeito vasorelaxante do diterpeno pimarane. O pimarane inibiu a contração induzida por fenilefrina e por KCl, em anéis de aorta de ratos com endotélio intacto ou sem endotélio. Além disso, o pimarane relaxou anéis intactos e com o endotélio desnudado pré-contraídos com fenilefrina ou KCl. A pré-incubação de anéis aórticos sem endotélio com L-NAME promoveu a redução do relaxamento induzido pelo pimarane. Estes resultados proporcionam evidência funcional de que os efeitos induzidos pelo pimarane envolvem o bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular e também são mediados pela ativação de NO-GMPc<sup>[11]</sup>.

Duarte e colaboradores investigaram a resposta de relaxamento de anéis de aorta de ratos em resposta ao diterpeno jatrophone. Os resultados encontrados indicam que jatrophone relaxa a aorta de ratos, pelo menos em parte, através da ativação de canais  $K^{+}$ , o que se difere dos subtipos sensíveis ao ATP. Há evidências de que este diterpeno pode também bloquear o influxo de  $Ca^{2+}$  através de canais sensíveis a voltagem<sup>[32]</sup>.

Outro composto intensamente estudado é a forskolina, um diterpeno ativador de adenilato ciclase. Os estudos com este composto iniciaram-se nos anos 80. Lincoln e Fisher-Simpson compararam a resposta de relaxamento da forskolina e do nitroprussiato em aorta de ratos. Os resultados mostraram que a forskolina produziu aumentos de AMPc tempo e de dose-dependentes, ativação da proteína quinase dependente de AMPc e relaxamento na aorta de rato contraída, mas não teve nenhum efeito sobre os níveis de GMPc. O nitroprussiato aumentou os níveis de GMPc e promoveu relaxamento, mas não teve efeito sobre os níveis de AMPc<sup>[33]</sup>.



Após analisar os estudos citados acima, que destacam os efeitos vasculares dos diterpenos, é possível realizar uma comparação com o presente estudo, em que foram analisadas as respostas vasculares sob efeito da administração do esclareol. Sendo assim, os anéis incubados com L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) e os anéis incubados com ODQ (inibidor da guanilato ciclase) não apresentaram relaxamento, o que evidencia que o esclareol além de ser totalmente dependente de NO, também sofre influência do GMPc, no entanto não altera os níveis de AMPc. Por isso, evidencia-se que o esclareol apresenta características similares ao nitroprussiato, que é uma droga altamente utilizada na prática clínica.

#### **6.4 Influência do esclareol nas dosagens de NO**

No presente estudo, foram realizadas dosagens indiretas de NO plasmático pela determinação dos níveis séricos de nitrito e nitrato utilizando-se o Sievers NOAnalyzer 280i. Não houveram diferenças significativas entre o grupo tratado com esclareol e o grupo veículo. No entanto, a análise do NO em plasma pode sofrer interferências em diferentes etapas do processo, por se tratar de uma análise bastante delicada. A partir desse resultado o ideal seria uma medida em tempo real do NO em células endoteliais isoladas estimuladas com os compostos.

O protocolo utilizado no estudo foi testado de diferentes formas, mas não obtivemos sucesso. Depois de diversas tentativas acreditamos que os compostos, de alguma forma, interferem com a leitura da sonda (DAF) utilizada.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no presente estudo, conclui-se que o esclareol mostrou-se promissor quanto aos seus efeitos vasodilatadores, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Apesar disso, o esclareol não promoveu alterações do NO, possivelmente devido ao método utilizado. Além disso, por motivos desconhecidos, o esclareol não é seletivo em animais hipertensos. Por isso, é importante que se realizem mais estudos envolvendo o diterpeno esclareol para que se evidencie mais detalhadamente seus mecanismos de ação.

## 8 REFERENCIAS

1. Sociedade Brasileira de Cardiologia/ Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq Bras Cardiol 2010;95(1 supl.1):1-51.
2. Izzo JL, Black HR. The hypertension primer project: An educational experiment. Hypertension. 1999;33(1):167-8.
3. Hypertension EETFFtMoA. 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. J Hypertens. 2013;31(10):1925-38.
4. Taylor J. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension. Eur Heart J. 2013;34(28):2108-9.
5. Montanari CA, Bolzani VS. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Química Nova. 2001;24(1): 105-11.
6. Robbers, JE; Speedie, MK; Tyler, VE. Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia. Benedetti IC, tradutor.1ª ed. São Paulo:Editorial Premier; 1997. 372 p.
7. Rieder C, Strauss G, Fuchs G, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W. Biosynthesis of the diterpene verrucosan-2beta-ol in the phototrophic eubacterium Chloroflexus aurantiacus. A retrobiosynthetic NMR study. J Biol Chem. 1998;273(29):18099-108.
8. Tirapelli CR, Ambrosio SR, Da Costa FB, De Oliveira AM. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. Fitoterapia. 2002;73(1):56-62.
9. Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB, de Oliveira AM. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2008;3(1):1-8.
10. Tirapelli CR, de Andrade CR, Cassano AO, De Souza FA, Ambrosio SR, da Costa FB, et al. Antispasmodic and relaxant effects of the hidroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* (Apiaceae) on rat anococcygeus smooth muscle. J Ethnopharmacol. 2007;110(1):23-9.

11. Tirapelli CR, dos Anjos Neto Filho M, Bonaventura D, Melo MC, Ambrosio SR, de Oliveira AM, et al. Pimaradienoic acid inhibits vascular contraction and induces hypotension in normotensive rats. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(4):453-9.
12. Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on sclareol. *Food Chem Toxicol*. 2008;46 Suppl 11:S270-4.
13. Ulubelen A, Topcu G, Eriş C, Sönmez U, Kartal M, Kurucu S, et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*. 1994;36(4):971-4.
14. Huang GJ, Pan CH, Wu CH. Sclareol exhibits anti-inflammatory activity in both lipopolysaccharide-stimulated macrophages and the  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema model. *J Nat Prod*. 2012;75(1):54-9.
15. Noori S, Hassan ZM, Mohammadi M, Habibi Z, Sohrabi N, Bayanolhagh S. Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. *Cell Immunol*. 2010;263(2):148-53.
16. Dimas K, Kokkinopoulos D, Demetzos C, Vaos B, Marselos M, Malamas M, et al. The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leuk Res*. 1999;23(3):217-34.
17. Mahaira LG, Tsimplouli C, Sakellaris N, Alevizopoulos K, Demetzos C, Han Z, et al. The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action. *Eur J Pharmacol*. 2011;666(1-3):173-82.
18. Lawes CM, Vander Hoorn S, Law MR, Elliott P, MacMahon S, Rodgers A. Blood pressure and the global burden of disease 2000. Part 1: estimates of blood pressure levels. *J Hypertens*. 2006;24(3):413-22.
19. Brandes RP. Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension*. 2014;64(5):924-8.
20. Kang KT. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol Res*. 2014;30(3):141-8.
21. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):208-19.

22. Li Q, Youn JY, Cai H. Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *J Hypertens*. 2015;33(6):1128-36.
23. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest*. 2010;138(3):682-92.
24. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004;84(3):731-65.
25. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:749-74.
26. Barreto RL, Correia CRD, Muscará MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*. 2005;28(6):1046-54.
27. Caissard JC, Olivier T, Delbecque C, Palle S, Garry PP, Audran A, et al. Extracellular localization of the diterpene sclareol in clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). *PLoS One*. 2012;7(10):e48253.
28. Sharifi AM, Akbarloo N, Heshmatian B, Ziai A. Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Pharmacol Res*. 2003;47(3):201-9
29. Ferrario C, Carretero O. Hemodynamics of experimental renal hypertension. In: Jong W, editor. *Handbook of Hypertension, vol.4: Experimental and Genetic Models of Hypertension*. Amsterdam:Elsevier Science Publishers B.V.; 1984. p. 54-80.
30. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991;17(5):707-19.
31. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol Sci*. 1998;13:170-6.
32. Duarte DF, Sant'Ana AE, Calixto JB. Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers. *Eur J Pharmacol*. 1992;215(1):75-81.
33. Lincoln TM, Fisher-Simpson V. A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 1984;101(1-2):17-27.

## 9 ARTIGO CIENTÍFICO

### EVALUATION OF THE VASCULAR EFFECT OF DITERPENE SCLAREOL IN AORTS OF NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE RATS

#### INTRODUCTION

High Blood Pressure (HBP) is a common cardiovascular disease that affects about 50 million people in the US, and a proportionate number to this in Brazil <sup>[1]</sup>. It is defined as systolic blood pressure (SBP)  $\geq 140$  mmHg and / or diastolic blood pressure (DBP)  $\geq 90$  mmHg. This condition can lead to cardiovascular complications such as heart attack and stroke, as well as other complications such as kidney failure. HBP is strongly associated with cardiovascular diseases that cause morbidity and mortality, and low blood pressure is effective in preventing cardiovascular disease <sup>[1-4]</sup>.

Considering the impact of hypertension on morbidity and mortality worldwide, several studies have been conducted in order to find the best treatment. Therefore, there is a wide variety of medicaments which are employed for treating hypertension. Among them are: angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, adrenergic antagonists, diuretics, direct vasodilators, calcium channel blockers, angiotensin II receptor antagonists, renin inhibitors <sup>[3,4]</sup>.

Moreover, the plant kingdom has contributed in a significant way to provide substances useful in the treatment of diseases that affect humans <sup>[5,6]</sup>. In this context, diterpenes are a large class of secondary metabolites produced by plants and have many important biological activities <sup>[7]</sup>.

Many studies have shown that many diterpenoid classes exert significant effect on the cardiovascular system <sup>[8-11]</sup>. These studies suggest that metabolites class as a promising source of prototype for the development of new agents in the cardiovascular therapy.

Considering the cardiovascular effects caused by diterpenes, it is important to study more and more compounds of this class. The esclareol diterpene extracted from *Salvia sclarea* L. inflorescences <sup>[12, 13]</sup> a herb of the family Lamiaceae, exhibits anti-inflammatory <sup>[14]</sup>, anti-microbial, cytotoxic and cytostatic effects on leukemic cell lines, anti-tumor actions <sup>[15-17]</sup>, among other functions. However, there are no studies assessing the cardiovascular effects of sclareol. Therefore, this study was designed in order to investigate the mechanisms involved in cardiovascular effect (in vitro and in vivo) of diterpene sclareol in normotensive and hypertensive rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Male Wistar rats (250-300 g) from the Vivarium of Ribeirão Preto campus of the Central University of São Paulo (USP), were used in this study. The animals were placed in temperature environment (22-25°C) and light / dark cycle (12:12 hours) controlled. They had free access to water and food. Procedures and experimental protocols of this study were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments (CETEA) Ribeirão Preto Medical School (FMRP), USP.

## **Study design**

The animals were randomly divided into two groups: normotensive and hypertensive. The beasts of the hypertensive group underwent the surgical procedure 2K1C for hypertension induction while the animals of the normotensive group were sham-operated.

## **Hypertension induction 2K1C**

For the induction of high blood pressure, 2K1C animals were anesthetized with ketamine (50 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) intraperitoneally. Then it was performed shaving and disinfecting the abdominal region of the spot. For surgical procedure, the abdominal cavity was opened by a longitudinal incision in the linea alba (laparotomy), the intestine was moved to left kidney view, and the left renal artery was clamped with a silver clip (inner opening 0.1 mm). The normotensive animals underwent the same surgical procedure except for the placement of the clip. After this procedure, the abdominal cavity was sutured on two levels: the muscular plane with solid points and skin flat with individuals. There were considered hypertensive the animals with a minimum increase in systolic blood pressure (SBP) tail of 30 mmHg after three weeks of hipertensão. A PA noninvasive induction was measured using a cuff, connected to a sensor for registration PA (Kent Scientific Corporation, Connecticut, USA), placed around the tail of the animal, the which was previously heated. This procedure was performed 24 hours before surgery, the animal to evaluate the pressure table (tail plethysmography)



### **Curves dose / response**

Three weeks after surgery, the animals were submitted to a new grouping, according to the held approach: (1) study the direct effect of sclareol on BP, the administration of three escalating doses of the compound and (2) the possible effect of the vehicle (DMSO + ethanol + water) on BP, the administration of three escalating doses of vehicle solution. Subsequently, the animals were anesthetized with urethane intraperitoneally. The femoral artery and vein were isolated, and a catheter (24G x 0.75 "Angiocath BD®) was inserted into each vessel to monitor blood pressure and to maintain venous access for drug administration, respectively. After 15 minutes monitoring, time required for stabilization of hemodynamic parameters, some animals received a single dose of L-NAME (non-selective NO synthase inhibitor), after 6 minutes, were applied three doses of the substance with respect to each group, in concentrations of 10, 20 and 40 mg / Kg, at intervals of 6 minutes between each dose, the pressure is enough time to return to baseline. During the dose-response curve, BP measurements were performed. The BP monitoring was performed using the System 100 The MP (BioPac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). The System 100 The MP is a system able to collect, analyze, store and retrieve biophysical data. Connected to a PC Gateway (Gateway, Sioux City, SD, USA) with Windows operating system installed 2008. The catheter in the femoral artery was connected to pressure transducers, and these, the continuous registration system MP System 100 A. For As the plasmatic was performed using the chemiluminescence NO/ozone (O<sub>3</sub>) using the Sievers® analyzer 280 Nitric Oxide Analyzer (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA).

### **Vascular reactivity**

After full anesthesia (xylazine/ketamine 20/50 mg/kg), a thoracotomy was performed, and the aorta was carefully removed and immediately immersed in Krebs solution at 37. The specimen of the aorta of each animal maintained in Krebs solution was dissected to remove the external adventitial tissue and sectioned into four rings (4 mm wide each) that were used in the study vascular reactivity.

After this initial preparation, each ring was suspended by two stainless steel clips passed through its lumen, and this set was immersed in a tub (10 ml) of the organic bath system for isolated tissue. The vats were filled with Krebs solution (millimolar composition: NaCl 118.3; KCl 4.7; MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.22; CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 and 11.1 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, pH 7, 4) maintained at 37 ° C and bubbled with carbogênica mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). One clip was anchored to a fixed support and the other connected to a transducer (Grass FT03 force-displacement transducer, Grass Instrument CO, Quincy, USA) for measurement of isometric tension. The transducers were coupled to an 8-channel recorder (Gould, Cleveland, USA), thereby enabling simultaneous recording of isometric tension. Before starting the actual pharmacological experiments, the vascular rings were subjected to the optimum stretch-tension of 2 g, using a micrometer system and remain at rest in this voltage for 40 minutes. After this stabilization period was induced contraction of rings by using phenylephrine (Phe, 10<sup>-7</sup>M), this contraction possible to evaluate the integrity of the smooth muscle. After the contraction had reached a plateau, the presence or absence of endothelium on the rings was confirmed in the relaxation induced by the use of acetylcholine (ACh, 10<sup>-6</sup> M). There were considered to endothelium relaxed rings that at least 75% of pre-contraction. Subsequently, the solution vat was replaced by pure Krebs solution, and the preparation was allowed to

stand for 30 minutes. After this second stabilization period curves were obtained cumulative concentration-response curve with concentrations of the compound to be tested in arteries with and without endothelium in the presence and absence of inhibitors of NO-production pathways.

Concentration-response curves for diterpene sclareol were obtained in the aorta rings with endothelium precontracted with Phe  $10^{-7}$ M. The relaxation response was expressed as a percentage of relaxation relative to the pre-contraction with Phe. Com order to observe the mechanisms involved in the relaxation induced by compound concentration-response curves for sclareol were obtained in the aorta rings with endothelium pre-contracted Phe  $10^{-7}$ M, after incubation for 30 minutes with two different inhibitors (such substances are not used simultaneously): [1H-[1,2,4] oxadiazol [4, 3-a] quinoxalin-1-one ] (ODQ - 100 mmol / L, specific inhibitor of soluble guanylate cyclase, sGC) and NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME - 100 mmol / L, non-selective inhibitor of NO synthase, NOs)

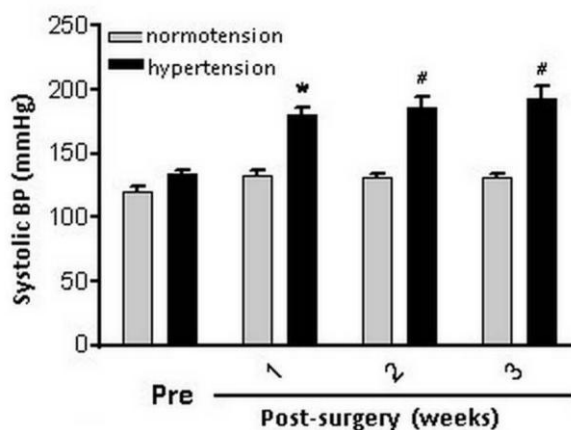
### **Statistical analysis**

The statistical analysis used was the analysis of variance (ANOVA) two pathways followed by the Bonferroni post-test by GraphPad Prism program (GraphPad Software Corporation, Version 4.0). The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### SBP noninvasive

Figure 1 shows the evolution of noninvasive SBP in normotensive and hypertensive groups. The evolution of the animals in normotensive group, it can be observed that SBP showed little change, ranging from 120.714 (pre-surgery) to 130.626 (3rd week / post-surgery), while the analysis of the animals belonging to the hypertensive group evidenced in the significant increase in SBP, ranging from 133.869 (pre-surgery) to 192.977 (3rd week / post-surgery). The respective values are shown in table 1.



**Figure 1 - Temporal evolution of noninvasive systolic blood pressure in normotensive and hypertensive animals.** The values represent the mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 5$  for both groups) SBP 2K1C before surgery (pre-operative) and at the 3 weeks following surgery. \* ( $P < 0.05$ ) indicated significant difference in the hypertensive group compared to the normotensive group regarding the 1st week / Post-surgery and # ( $p < 0.01$ ) indicates significant difference in the hypertensive group compared to the normotensive group regarding the 2nd and 3rd weeks / post-surgery.

**Table 1- Evolution of the SBP non-invasive in normotensive and hypertensive animals.**

<b>Temporal evolution of the SBP</b>				
<b>Groups</b>	<b>Pre-2K1C</b>	<b>1<sup>o</sup> week</b>	<b>2<sup>o</sup> week</b>	<b>3<sup>o</sup> week</b>
<b>Normotensive</b>	120,714	132,119	131,388	130,626
<b>Hipertensive</b>	133,869	179,704*	185,368 <sup>#</sup>	192,977 <sup>#</sup>

**Each value represents the mean ± standard error of the mean. Two-way ANOVA Bonferroni post-test. \* (P <0.05) and # (p <0.01) indicates significant difference between groups. (N = 5).**

**Effect of the acute administration of Sclareol and vehicle on the maximum variation of BP**

Figure 2 illustrates the variation of systolic blood pressure ( $\Delta$ SBP) after 3 consecutive administrations of increasing doses of Esclareol and vehicle (10, 20 and 40 mg / Kg) in normotensive and hypertensive rats. The analysis of the effect of Esclareol on  $\Delta$ SBP showed that in both groups there was a significant reduction in  $\Delta$ SBP. In contrast, the effect of vehicle substance presented discreet lowering effect.

\* (P <0.05) indicates significant difference between groups hypertensive sclareol x vehicle and between the normotensive esclareol x vehicle.

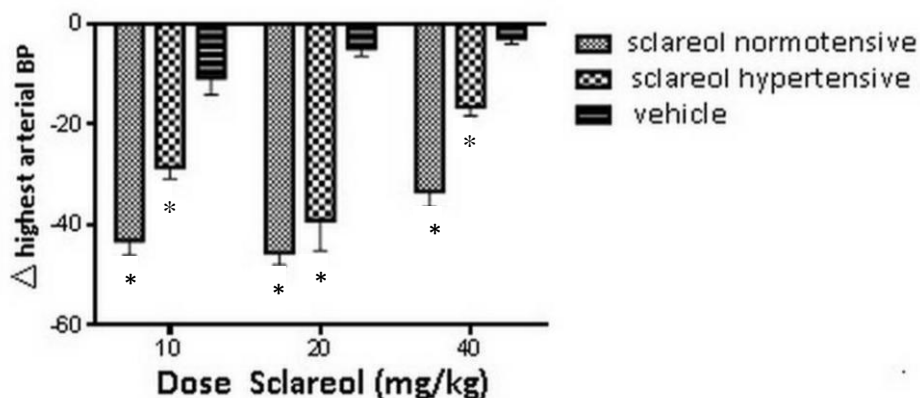


Figure 2 - Representative image of the maximum BP variation, on the application of doses of Esclareol and vehicle (n = 5). The pressure variation for each group is shown in Table 2.

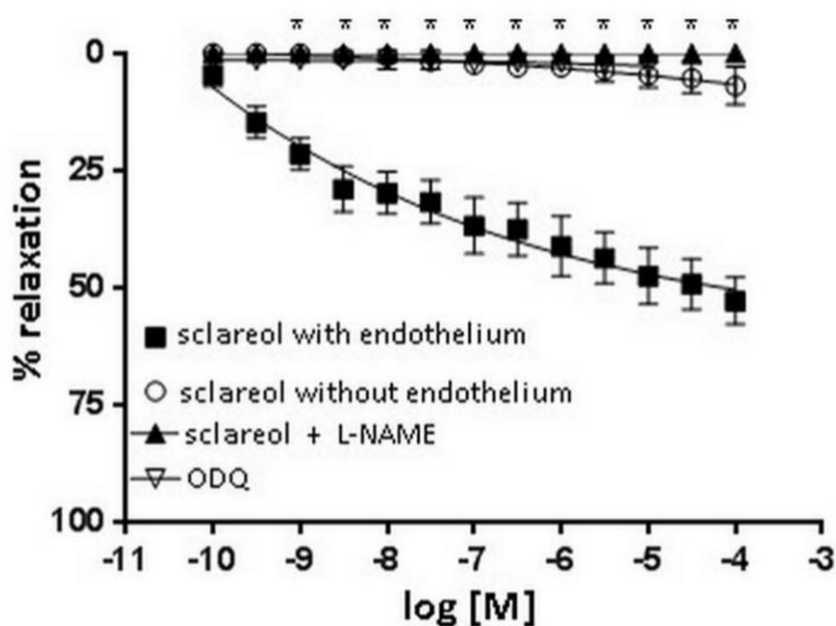
Table 2 - Relation between the dose (mg / kg) of Sclareol and vehicle in maximum BP variation

Dose (mg/Kg)	Normotensive Sclareol	Hipertensive Sclareol	Vehicle
10	-43,13333*	-28,52857*	-10,7300
20	-45,56000*	-39,14000*	-4,8600
40	-33,38000*	-16,50286*	-2,8475

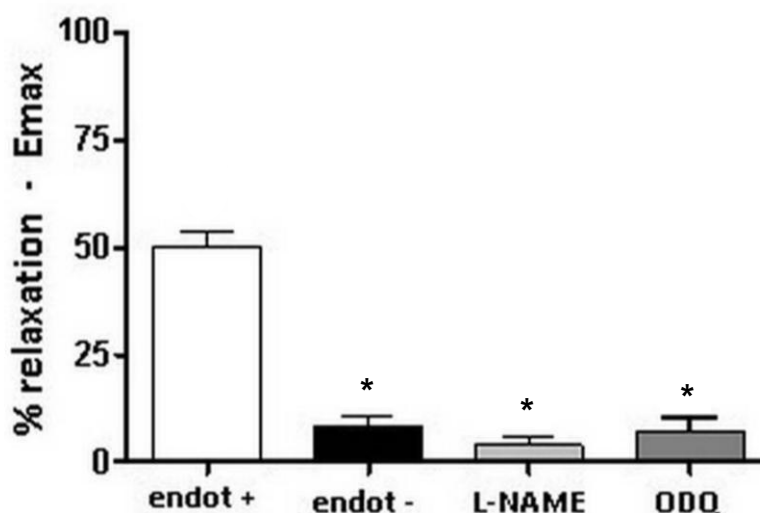
Each value represents the mean  $\pm$  standard error of the mean. One-way ANOVA, Bonferroni post-test (n=5).

### Effect of inhibitors on Sclareol induced relaxation

The Sclareol was used in the concentration-response curves in the presence of inhibitor L-NAME (100 mmol / L) and ODQ (100 mmol / L). The nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase inhibitors were as efficient as the removal of the endothelium to inhibit relaxation induced Sclareol (Figure 3 and 4). The variation of the percentage of relaxation - Emax is present in Table 3.



**Figure 3 - Dose response curve Sclareol in the presence of inhibitors.** After the pre-contraction with  $10^{-7}$ M Phe, the rings were subjected to a dose response curve from  $10^{-10}$  to  $10^{-4}$  in the presence of L-NAME and inhibitor ODQ. \* ( $P < 0.05$ ) indicate a significant difference between the groups with inhibitors and control.



**Figure 4 - Maximum relaxation effect in the presence of inhibitors.** All rings were subjected to 11 and increasing doses of different Sclareol, however, each group had a particular condition: 1) Endot+ rings, 2) Endot- rings, 3) Endot+ rings and L-NAME, and 4) Endot+ rings and ODQ. Each group was subjected to analysis and comparison of their respective effect on the ring. (N = 5 for each group).

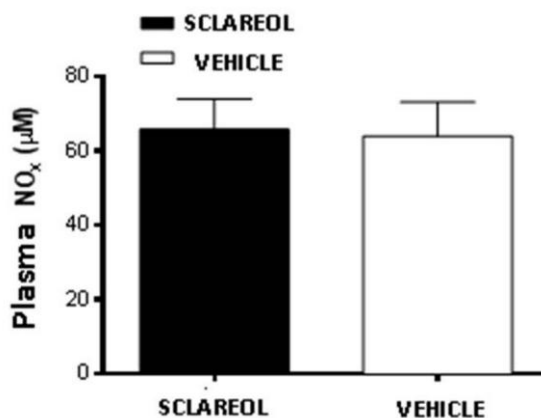
**Table 3 – Maximum relaxation effect in the presence of inhibitors**

Groups	% of relaxation
Sclareol CE	52,94
Sclareol SE	25,79*
L-NAME	3,94*
ODQ	7,18*

Each value represents the mean  $\pm$  standard error of the mean. One-way ANOVA, Bonferroni post-test. \* ( $P < 0.0001$ ) shows a significant difference between the groups. (N = 5).

#### The effect of Sclareol on plasmatic nitric oxide

The analysis of the doses of plasmatic NO showed no significant difference between groups (Figure 5).



**Figure 5 - Plasmatic nitrite and nitrate levels (NO<sub>x</sub>) in normotensive and hipertensive animals.** The animals were pretreated with vehicle or esclareol (n = 5 for all groups). One-way ANOVA and Bonferroni post test.



## **DISCUSSION**

### **2K1C Model**

The 2K1C model used for the induction of hypertension, exhibited satisfactory results with a significant increase in PA animals. The SBP found in hypertensive animals are in agreement with other authors who evaluated similar model. Studies revealed that the experimental model in question presents angiotensin-converting enzyme (ACE) activity increased both in plasma and in cardiac tissue of rats with renovascular hypertension with two and twelve weeks and concluded that the enzyme activity increased contained in the tissue, plays an important role in target organ changes in this experimental model <sup>[18]</sup>.

### **Action of the Sclareol in vivo**

The results obtained after administration of three escalating doses of sclareol demonstrate that it promoted a reduction in BP, both in the normotensive group and the hypertensive group. The mechanisms involved in this relaxing effect remain unknown. Nevertheless, this effect may be connected with the fact that these compounds are possibly responsible for vasodilator activity via activation of NO pathways.

Looking more deeply into the data collected in 2K1C model, the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is the main factor in the development of hypertension <sup>[19]</sup>. In hypertension there is an activation of the RAAS and in turn, a greater inhibition of kallikrein-kinin system (CMS) by ACE <sup>[20,21]</sup>, this can result in a smaller reduction in SBP induced by the sclareol in the hypertensive group. The largest reduction in SBP in normotensive group, in response to administration of

sclareol, may be indicative of an interaction between the RAAS and the SCC [20,21], however it takes more experiments to determine the actual cause.

### **Action of the Sclareol in vitro (vascular reactivity)**

The vasorelaxant effect of various diterpenes have been investigated in rings with and without endothelium. Several studies sighted these substances as a promising source of new leads for the discovery and development of new agents for use in cardiovascular therapy [9].

The diterpene sclareol is extracted from inflorescences *Salviasclarea* L., relatively easy to grow grass and high throughput [13]. Studies using this compound showed its anti microbial action, cytotoxic and cytostatic effects on leukemic cell lines and anti-tumor actions [14-17]. There are no previous studies that assess their cardiovascular action.

Therefore, it must be made a comparison between this study and the previous studies using others diterpenes. As an example, KA-OCH<sub>3</sub>, a semi-synthetic compound derived from kaurenoic acid induced vascular relaxation and hypotension, by mechanisms that involve blocking calcium influx and activation of the NO-cGMP pathway. Incubation of rat aortic rings with ODQ and L-NAME caused a right shift of the concentration - response KA - OCH<sub>3</sub> [8]. In the present study, the vascular relaxation was completely inhibited by L-NAME, which shows that the action of sclareol is totally dependent on NO.

Tirapelli and colleagues also describe the mechanisms involved in the vasorelaxant effect of diterpene pimarane. The pimarane inhibited the contraction

induced by phenylephrine and KCl in rat aortic rings with intact endothelium or without endothelium. Furthermore, the pimarane relaxed rings intact and denuded endothelium pre-contracted with phenylephrine or KCl. Pre-incubation of aortic rings without endothelium with L-NAME caused a reduction in the induced relaxation pimarane. These results provide functional evidence that the effects induced pimarane involve blocking the influx of extracellular  $Ca^{2+}$  and are also mediated by the activation of NO-cGMP <sup>[11]</sup>.

Duarte and colleagues investigated the relaxation response of rat aorta rings in response to diterpeno jatrophone. The results indicate that jatrophone relaxes rat aorta, at least in part, through activation of  $K^{+}$  channels, which are different from subtypes sensitive to ATP. There is evidence that this diterpene can also block the influx of  $Ca^{2+}$  through voltage-sensitive channels <sup>[22]</sup>.

Another compound intensively studied is forskolin, one diterpene activator of adenylate cyclase. Studies with this compound started up in the 80s, when Lincoln and Fisher-Simpson compared relaxation response of forskolin and nitroprusside in rat aorta. The results showed that forskolin increases cAMP produced time and dose-dependent activation of cAMP-dependent protein kinase and relaxation of the contracted rat aorta, but had no effect on cGMP levels. The nitroprusside increased levels of cGMP and relaxation, but had no effect on cAMP levels <sup>[23]</sup>.

After analyzing the studies cited above, which highlight the vascular effects of diterpenes, it is possible to compare with the present study, in which we analyzed the vascular effects of sclareol administration. Thus, the rings incubated with L-NAME (non-selective NOS inhibitor) and rings incubated with ODQ (inhibitor of guanylate cyclase) showed no relaxation, which indicates that the sclareol besides being

completely dependent on NO, also influenced by the cGMP, however does not alter cAMP levels. Therefore, it is evident that the sclareol presents similar characteristics with the nitroprusside, which is a highly drug used in clinical practice.

### **Sclareol Influence of the dosage of NO**

In the present study, plasma indirect measurements of NO were carried out by determination of serum levels of nitrite and nitrate using the SieversNOAnalyzer 280i. There were no significant differences between the group treated with sclareol and the vehicle group. However, the analysis of NO in plasma can be influenced in different stages of the process, because it is a very delicate analysis. From this result, the ideal would be measured in real time of NO in isolated endothelial cells stimulated with the compounds. This protocol has been tested in different ways, but we were unsuccessful. After several attempts we believe that the compounds, in any way interfere with the reading of sly (DAF) used.

### **CONCLUSION**

From the data obtained in this study, it is concluded that the sclareol showed promise as to its vasodilating effects, both in vivo and in vitro. Nevertheless, the sclareol did not change NO dosages, possibly due to the method used. Also, for unknown reasons, the sclareol is not selective in hypertensive animals. So it is important that further research involving the diterpene sclareol to that evidence in more detail their mechanisms of action.

**REFERENCES**

1. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão . Arq Bras Cardiol 2010;95(1 supl.1):1-51.
2. Izzo JL, Black HR. The hypertension primer project: An educational experiment. Hypertension. 1999;33(1):167-8.
3. Hypertension EETFFtMoA. 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. J Hypertens. 2013;31(10):1925-38.
4. Taylor J. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension. Eur Heart J. 2013;34(28):2108-9.
5. Montanari CA, Bolzani VS. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Química Nova. 2001;24(1): 105-11.
6. Robbers, JE; Speedie, MK; Tyler, VE. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. Benedetti IC, tradutor. 1ª ed. São Paulo:Editorial Premier; 1997. 372 p.
7. Rieder C, Strauss G, Fuchs G, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W. Biosynthesis of the diterpene verrucosan-2beta-ol in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. A retrobiosynthetic NMR study. J Biol Chem. 1998;273(29):18099-108.
8. Tirapelli CR, Ambrosio SR, Da Costa FB, De Oliveira AM. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. Fitoterapia. 2002;73(1):56-62.
9. Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB, de Oliveira AM. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2008;3(1):1-8.
10. Tirapelli CR, de Andrade CR, Cassano AO, De Souza FA, Ambrosio SR, da Costa FB, et al. Antispasmodic and relaxant effects of the hidroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* (Apiaceae) on rat anococcygeus smooth muscle. J Ethnopharmacol. 2007;110(1):23-9.
11. Tirapelli CR, dos Anjos Neto Filho M, Bonaventura D, Melo MC, Ambrosio SR, de Oliveira AM, et al. Pimaradienoic acid inhibits vascular contraction and induces hypotension in normotensive rats. J Pharm Pharmacol. 2008;60(4):453-9.
12. Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on sclareol. Food Chem Toxicol. 2008;46 Suppl 11:S270-4.
13. Ulubelen A, Topcu G, Eriş C, Sönmez U, Kartal M, Kurucu S, et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*. Phytochemistry. 1994;36(4):971-4.
14. Huang GJ, Pan CH, Wu CH. Sclareol exhibits anti-inflammatory activity in both lipopolysaccharide-stimulated macrophages and the  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema model. J Nat Prod. 2012;75(1):54-9.
15. Noori S, Hassan ZM, Mohammadi M, Habibi Z, Sohrabi N, Bayanolhagh S. Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. Cell Immunol. 2010;263(2):148-53.

16. Dimas K, Kokkinopoulos D, Demetzos C, Vaos B, Marselos M, Malamas M, et al. The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leuk Res.* 1999;23(3):217-34.
17. Mahaira LG, Tsimplouli C, Sakellaridis N, Alevizopoulos K, Demetzos C, Han Z, et al. The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* 2011;666(1-3):173-82.
18. Sharifi AM, Akbarloo N, Heshmatian B, Ziai A. Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Pharmacol Res.* 2003;47(3):201-9
19. Ferrario C, Carretero O. Hemodynamics of experimental renal hypertension. In: Jong W, editor. *Handbook of Hypertension, vol.4: Experimental and Genetic Models of Hypertension.* Amsterdam:Elsevier Science Publishers B.V.; 1984. p. 54-80.
20. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension.* 1991;17(5):707-19.
21. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol Sci.* 1998;13:170-6.
22. Duarte DF, Sant'Ana AE, Calixto JB. Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers. *Eur J Pharmacol.* 1992;215(1):75-81.
23. Lincoln TM, Fisher-Simpson V. A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 1984;101(1-2):17-27.