



Universidade Federal do Piauí  
Rede Nordeste de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
-Ponto Focal -

**ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DE DIOSGENINA LIVRE E  
COMPLEXADA COM BETA-CICLODEXTRINA EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS E HIPERTENSAS L-NAME**

Carla Kelly Barroso Sabino

Teresina – PI  
2019

CARLA KELLY BARROSO SABINO

**ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DE DIOSGENINA LIVRE E  
COMPLEXADA COM BETA-CICLODEXTRINA EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS E HIPERTENSAS L-NAME**

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira

Teresina – PI  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

S116a Sabino, Carla Kelly Barroso.  
Atividade cardiovascular de diosgenina livre e complexada  
com Beta-ciclodextrina em ratas ovariectomizadas e hipertensas  
L-NAME / Carla Kelly Barroso Sabino. – 2019.  
169 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de  
Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.  
“Orientadora: Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira”.

1. Antiagregante. 2. Beta Ciclodextrina. 3. Diosgenina.  
4. Hipertensão. 5. Menopausa. I. Título.

CDD 660.6

# **ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DE DIOSGENINA LIVRE E COMPLEXADA COM BETA-CICLODEXTRINA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS E HIPERTENSAS L-NAME**

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que realizada de acordo com as normas da ética científica.

**Data da aprovação: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019**

## **BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aldeídia Pereira de Oliveira RENORBIO/CCS/UFPI  
(Orientadora)  
Universidade Federal do Piauí

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Regina de Castro Almeida RENORBIO/CCS/UFPI  
(Membro interno)  
Universidade Federal do Piauí

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Meneses Oliveira RENORBIO/CCS/UFPI  
(Membro interno)  
Universidade Federal do Piauí

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior RENORBIO/DEPARTAMENTO DE  
QUÍMICA/CCN/UFPI  
(Membro interno)  
Universidade Federal do Piauí

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosimeire Ferreira dos Santos NPPM/CCS/UFPI  
(Membro externo)  
Universidade Federal do Piauí

# *Dedicatória*

À minha mãe Antonia (*in memoriam*), por ter me ensinado desde pequena a sempre estudar e dar o meu melhor em tudo o que fizesse.

Ao meu pai, Raimundo Sabino, por todo amor, apoio e constante incentivo.

À minhas irmãs Eliamara e Soraia, pela amizade e companheirismo.

Ao meu noivo, Renan Araújo, pelo carinho, apoio, companheirismo e paciência.

À minhas orientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aldeídia Pereira de Oliveira e Prof<sup>a</sup>. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira por acreditar em meu potencial e pela amizade.

# Agradecimientos

Agradeço a Deus, que sempre me guiou e me protegeu durante toda essa caminhada, dando-me força nos momentos de dificuldade e colocando em meu caminho verdadeiros anjos em figuras amigas.

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira e Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira pela orientação, constante presença, ensinamentos, paciência, amizade e carinho dispensados. Verdadeiros exemplos a serem seguidos.

Aos meus familiares Raimundo Sabino Neto, Antonia Barroso de Carvalho Sabino (*in memoriam*), Eliamara Barroso Sabino, Soraia Barroso Sabino, meu noivo, Renan Araújo Barros, meus primos Lucas Climaco Rodrigues e Mikaelle Climaco, minha avó Francisca Sabino e minha tia Maria dos Santos Climaco, por todo carinho, apoio, incentivo e paciência, durante todos dias dessa jornada, e nos dias de experimento.

Aos alunos de Iniciação Científica Emersson, Dalila e Thallisson pela amizade e colaboração nos trabalhos experimentais.

À Profa. Dra. Carla Eiras, frente à Coordenação do Programa da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) – ponto focal do Piauí, por sua liderança e incentivo para a conclusão do ciclo de pós graduação.

Aos Profs. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida e Dr José Ribeiro dos Santos Júnior pelas consideráveis contribuições à execução do trabalho.

Ao Sr. Carlos Alberto de Deus, pelo exímio cuidado dispensado ao biotério, de extrema importância para o êxito dos trabalhos experimentais.

Aos meus colegas de turma 2014.1: Bruno, Taciana, Guilherme, Josynaria, Karla, Jairelda, Lúcio, Luciana, Alessandra, Marcelo, Suzana, Raimunda, Yuri e Tamnata, por compartilharem os momentos difíceis e alegres, durante esses cinco anos de luta.

A todos os amigos e colegas do NPPM, em especial: Julianne, Alessandra, Gabriela, Marcelo, Pedro, Lorranya, Aline, Márcio Edvandro, Fabiana, Kalynca, pela amizade e constante presença.

À FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí) pelo apoio financeiro.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo suporte técnico através do Portal Periódicos.



À Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho, aliado a seu potencial científico e tecnológico.

A todos que direta ou indiretamente participaram da produção desta tese.

*Agradeço especialmente a todas as vidas que foram sacrificadas para tornarem possível a realização deste estudo. A todos os animais utilizados, o meu respeitoso e sincero “Muito Obrigada”!*

*Carla Kelly Barroso Sabino.*

# *Resumo*

SABINO, C. K. B. **Atividade cardiovascular de diosgenina livre e complexada com beta-ciclodextrina com ratas ovariectomizadas e hipertensas L-NAME.**

Orientadora: Professora Doutora Aldeídia Pereira de Oliveira. 2019. 169p. Tese – Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

## RESUMO

A diosgenina é um esteróide encontrado em várias plantas farmacologicamente ativas, incluindo espécies de *Solanum* e *Dioscorea*. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito anti-hipertensivo da diosgenina e seu complexo nanoestruturado em modelos de menopausa e hipertensão L-NAME, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos observados. Uma prospecção científica e tecnológica foi realizada e revelou poucas variedades de aplicações farmacológicas da diosgenina complexada em  $\beta$  ciclodextrina (Diosg/ $\beta$ -CD) em atividade anti-hipertensiva. Dessa forma, é necessário explorar esse fitoesteróide na área científica e tecnológica, devido ao número limitado de patentes e publicações. Para isto, foram realizadas diferentes formulações do complexo Diosg/ $\beta$ -CD (Mistura física (MF), Liofilizado (LIOF) e Co-evaporação (CE)) e avaliadas físico-quimicamente quanto ao melhor método de inclusão supramolecular. A formulação nanoestruturada que apresentou melhor inclusão de Diosgenina foi a obtida pelo método CE. Conseqüentemente, os testes biológicos de atividade cardiovascular partiram desta formulação. Na caracterização e doseamento, constatou-se que o Diosg/ $\beta$ -CD apresentou 47,54 $\pm$ 1,7 % de eficiência de encapsulação e 7,13 $\pm$ 0,25 % de eficiência de carga. No teste de toxicidade aguda, os animais tratados com Diosg/ $\beta$ -CD não apresentaram sinais de toxicidade aguda até a dose de 2000 mg/kg, por via oral. Nesta mesma dose, o Diosg/ $\beta$ -CD apresentou capacidade agregante, aumentando os valores de TTPA em relação ao grupo tratado com salina, por via oral. Na atividade anti-hipertensiva, o Diosg/ $\beta$ -CD demonstrou importante efeito hipotensor dependente de dose (75, 150 e 300 mg/kg, v.o), enquanto a diosgenina isolada (300 mg/kg, v.o) não apresentou redução da pressão arterial. Além disso, o complexo Diosg/ $\beta$ -CD na dose 300 mg/kg, v.o, apresentou atividade anti-hipertensiva semelhante em modelo OVX e OVX/LNAME. Nos testes *in vitro*, a diosgenina promoveu vasorrelaxamento em anéis aórticos de ratas OVX pré-contraídos com fenilefrina de maneira dependente de concentração e dependente do endotélio vascular. A participação de mediadores endoteliais foi verificada na presença de L-NAME (100  $\mu$ M), ODQ (10  $\mu$ M), Indometacina (10  $\mu$ M), Atropina (1  $\mu$ M) ou Tiron (100 M) por 30 minutos, e nestas condições observou-se que ocorreu uma atenuação do vasorrelaxamento promovido por diosgenina. Em anéis sem endotélio pré-contraídos com KCl 80 mM, a adição cumulativa de diosgenina não promoveu efeito vasorrelaxante concentração-dependente. Dessa maneira, esse fitoesteróide demonstrou importante segurança biológica, efeito antiagregante e anti-hipertensivo, com possível envolvimento da via eNOS/CG/COX, bem como a participação dos receptores muscarínicos e dos ânions superóxidos. Não ocorre a inibição do influxo de cálcio através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem. Por outro lado, na presença de inibidores de canais para potássio, o efeito vasorrelaxante foi atenuado, sugerindo o envolvimento destes na atividade da diosgenina.

**Palavras chave:** menopausa, hipertensão, antiagregante, diosgenina,  $\beta$ -ciclodextrina.

# *Abstract*

SABINO, C. K. B. **Cardiovascular activity of free and complex diosgenin in beta-cyclodextrin in ovariectomized and hypertensive rats I-name.** Advisor: Professor Dr. Aldeidia Pereira de Oliveira. 2019. 169p. Thesis - Post-graduation in Biotechnology, Northeast Network of Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí.

## ABSTRACT

Diosgenin is a steroid found in several pharmacologically active plants, including *Solanum* and *Dioscorea* species. The objective of this study was to evaluate the antihypertensive effect of diosgenin and its nanostructured complex on menopause and L-NAME hypertension models, as well as the possible mechanisms of action involved in the observed effects. A scientific and technological prospection was performed and revealed a few varieties of pharmacological applications to diosgenin complexed in  $\beta$ -cyclodextrin (Diosg/ $\beta$ -CD) in antihypertensive activity. Thus, it is necessary to exploit this phytosteroid in the scientific and technological area due to the limited number of patents and publications. For this, different formulations of the Diosg/ $\beta$ -CD complex (Physical Mixture (MF), Lyophilized (LIOF) and Co-evaporation (EC)) were performed and physicochemically evaluated for the best supramolecular inclusion method. The nanostructured formulation that presented the best inclusion of Diosgenin was obtained by the CE method. Consequently, the biological tests of cardiovascular activity started from this formulation. In the characterization and assay, Diosg/ $\beta$ -CD presented  $47.54 \pm 1.7\%$  of encapsulation efficiency and  $7,13 \pm 0,25\%$  of load efficiency. In the acute toxicity test, animals treated with Diosg/ $\beta$ -CD showed no signs of acute toxicity up to the dose of 2000 mg / kg orally. At the same dose, Diosg/ $\beta$ -CD presented an aggregant capacity, increasing the APTT values in relation to the oral saline group. In antihypertensive activity, Diosg/ $\beta$ -CD demonstrated an important dose-dependent hypotensive effect (75, 150 and 300 mg / kg, v.o), whereas diosgenin alone (300 mg / kg, v.o) did not present a reduction in blood pressure. In addition, Diosg/ $\beta$ -CD complex at dose 300 mg / kg, v, showed similar antihypertensive activity in OVX and OVX / L-NAME model. In the in vitro tests, diosgenin promoted vasorelaxation in aortic rings of OVX rats precontracted with phenylephrine in a concentration dependent and vascular endothelium-dependent manner. The presence of endothelial mediators was observed in the presence of L-NAME (100  $\mu$ M), ODQ (10  $\mu$ M), Indomethacin (10  $\mu$ M), Atropine (1  $\mu$ M) or Tiron (100  $\mu$ M) for 30 minutes, it was observed that an attenuation of the vasorelaxation promoted by diosgenin occurred. In rings without pre-contracted endothelium with 80 mM KCl, the cumulative addition of diosgenin did not promote concentration-dependent vasorelaxant effect. Thus, this phytosteroid demonstrated important biological safety, antiplatelet and antihypertensive effects, with possible involvement of the eNOS / CG / COX pathway, as well as the participation of muscarinic and superoxide anion receptors. There is no inhibition of calcium influx through the voltage-sensitive calcium channels. On the other hand, in the presence of inhibitors of potassium channels, the vasorelaxant effect was attenuated, suggesting the involvement of these in the diosgenin activity.

**Keywords:** menopause, hypertension, diosgenin,  $\beta$ -cyclodextrin.

# *Lista de Abreviaturas e Símbolos*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Ang I</b>	Angiotensina I
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>AMPc</b>	Adenosina 3'-5'-Monofosfato
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>AT1</b>	Receptor de Angiotensina do tipo 1
<b>BKCa</b>	Canais de potássio dependente de cálcio
<b>BRS</b>	Resposta do Barorreflexo
<b>CEEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>CFMV</b>	Conselho Federal de Medicina Veterinária
<b>COX</b>	Ciclooxigenases
<b>CRE</b>	Creatinina
<b>c-HDL</b>	Colesterol- Lipoproteína de alta densidade
<b>c-LDL</b>	Colesterol- Lipoproteína de baixa densidade
<b>CT</b>	Colesterol
<b>DATASUS</b>	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde
<b>E<sub>2</sub></b>	17β-estradiol
<b>ER</b>	Receptor de estrogênico
<b>Er<sub>α</sub></b>	Receptor Estrogênio α
<b>ER<sub>β</sub></b>	Receptor Estrogênio β
<b>ERK 2/1</b>	Cinase reguladas por sinal extracelular
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FAL</b>	Fosfatase Alcalina

<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FEN</b>	Fenilefrina
<b>FRDE</b>	Fator de relaxamento derivado do endotélio
<b>GC</b>	Guanilil ciclase
<b>GDP</b>	Difosfato de guanosina
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado à proteína G
<b>G<sub>s</sub></b>	Proteína G estimulatória
<b>GSH</b>	Glutathiona Reduzida
<b>GSSH</b>	Glutathiona oxidada
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>GLI</b>	Glicose
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido Fosfórico
<b>HAS</b>	Hipertensão arterial sistêmica
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trisfosfato de inositol
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon Potássio
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KCl 80 mM 0-Ca<sup>2+</sup></b>	Solução despolarizante KCl 80 mM nominalmente sem cálcio
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>ODQ</b>	1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a] Quinoxalin-1-one
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PAD</b>	Pressão arterial diastólica
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PAS</b>	Pressão arterial sistólica
<b>pD<sub>2</sub></b>	Logaritmo negativo do valor de CE <sub>50</sub>
<b>PE</b>	Polietileno



<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PIP<sub>2</sub></b>	4,5 – bifosfato de fosfatidilinositol
<b>PKA</b>	Proteína cinase A
<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>ROCC<sub>s</sub></b>	Canais para cálcio operados por receptores
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RS</b>	Retículo sarcoplasmático
<b>RVPT</b>	Resistência vascular periférica total
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TEA (+)</b>	Tetraetilamônio
<b>TRI</b>	Triglicérides
<b>UR</b>	Uréia

# *Lista de Figuras*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Organização do trabalho de Tese.....	28
<b>Figura 2:</b> Diretriz para a prevenção, detecção, avaliação e controle da pressão arterial elevada em adultos.....	33
<b>Figura 3:</b> Estádios do envelhecimento reprodutivo em mulheres com um total de 10 estádios.....	37
<b>Figura 4:</b> Estrutura química da Diosgenina, Progesterona e Estradiol.....	41
<b>Figura 5:</b> Estrutura química da diosgenina.....	69
<b>Figura 6:</b> Número de patentes depositada por país na base WIPO, utilizando as palavras chave “diosgenin”, “diosgenin and cardiovascular” e “diosgenin and hypertension”.....	74
<b>Figura 7:</b> Evolução anual de patentes depositadas na base WIPO, utilizando as palavras chave “diosgenin”, “diosgenin and cardiovascular” e “diosgenin and hypertension”.....	75
<b>Figura 8:</b> Evolução anual de artigos publicados no <i>Science Direct</i> , usando as palavras-chave “diosgenin” e o cruzamento com “cardiovascular” e “hypertension”.....	80
<b>Figura 9:</b> Efeito da administração aguda de Diosg/ $\beta$ -CD (2000 mg/kg, v.o.), durante 14 dias consecutivos, sobre a variação do peso corporal dos animais.....	95
<b>Figura 10:</b> Tempo de Atividade de Protrombina (TAP) e Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina (TTPA) em ratas tratadas com Diosg/ $\beta$ -CD (2 g/kg, v.o). Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 2 grupos experimentais ** $p < 0,001$ , ANOVA, teste de Tukey, $n=4$ ; Diosg/ $\beta$ -CD versus controle.....	104
<b>Figura 11:</b> Complexo de Diosgenina com beta ciclodextrina na proporção de 1:2, a partir de teste computacional utilizando o programa Gaussian.....	104
<b>Figura 12:</b> <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar provenientes do biotério da UFPI.....	105
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografia das lâminas de lavado vaginal de rata fixado com álcool 95%, não - corado (aumento de 10x com seu correspondente em 40x), após 60 dias da retirada dos ovários. Período diestro II, representada pela presença majoritária de leucócitos e ausência de células cornificadas. Lavado vaginal em rata OVX, à esquerda, e em rata Sham, à direita.....	106
<b>Figura 14:</b> Aparato utilizado para aquisição dos valores de PAM e FC em ratos.....	109
<b>Figura 15:</b> Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da diosgenina complexada em $\beta$ -ciclodextrina (Diosg/ $\beta$ -CD), mistura física (MF), e respectivos complexos de inclusão obtidos por liofilização (LIOF) e co-evaporação (CE) sob atmosfera inerte de hidrogênio.....	112
<b>Figura 16:</b> Curvas de Termogravimetria (TG) da diosgenina, $\beta$ -ciclodextrina (Diosg/ $\beta$ -CD), mistura física (MF), e respectivos complexos de inclusão obtidos por liofilização (LIOF) e co-evaporação (CE) sob atmosfera inerte.....	113

<b>Figura 17:</b> Microscopia eletrônica de varredura da $\beta$ -ciclodextrina, mistura física, liofilizado e co-evaporado, obtida nos aumentos de 300 e 900x.....	117
<b>Figura 18:</b> Dados da varredura espectrofotométrica do ultravioleta visível da Diosgenina.....	119
<b>Figura 19:</b> Curva de Calibração para estabelecer a relação “Concentração versus Absorbância” em 209,0 nm.....	120
<b>Figura 20:</b> Efeito do Diosg/ $\beta$ -CD e Diosgenina sobre a PAM em ratas OVX/L-NAME (hipertensas) não-anestesiadas. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m de 4 experimentos * $p < 0,05$ ; ANOVA, teste de Tukey, $n=5$ ; OVX e OVX/L-NAME tratadas (Diosg/ $\beta$ -CD) <i>versus</i> controle (salina).....	121
<b>Figura 21:</b> Efeito do Diosg/ $\beta$ -CD sobre a PAM em ratas OVX e OVX/L-NAME (hipertensas) não-anestesiadas. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m de 4 experimentos * $p < 0,05$ ; ANOVA, teste de Tukey, $n=5$ ; OVX e OVX/L-NAME tratadas (Diosg/ $\beta$ -CD) <i>versus</i> controle (salina).....	123
<b>Figura 22:</b> Avaliação de peso corporal (A) e gordura visceral (B) das ratas normais, Sham e OVX, após 60 dias da ovariectomia. ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de Tukey, $n=6$ ).....	124
<b>Figura 23:</b> Artéria aorta isolada de rata. Com ausência de tecido conectivo (A) e seccionada em anéis do primeiro segmento da artéria (B).....	139
<b>Figura 24:</b> Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria aorta de rata em solução de Krebs.....	140
<b>Figura 25:</b> Sistemas de cubas para órgãos isolados e de aquisição de dados do NPPM/UFPI (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP). 140	140
<b>Figura 26:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da reatividade vascular à adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria aorta com endotélio funcional de ratas não-cirurgiadas e OVX.....	141
<b>Figura 27:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da reatividade vascular da Diosgenina e seu derivado nanoestrururado em anéis de artéria aorta de ratas OVX.....	142
<b>Figura 28:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo do efeito da Diosgenina e seu derivado nanoestrururado sobre anéis de artéria aorta pré-contraídos por Fen, com endotélio intacto (E <sup>+</sup> ) e endotélio removido (E <sup>-</sup> ).....	143
<b>Figura 29:</b> Representação esquemática dos protocolos experimentais para avaliação do efeito da Diosgenina livre na presença de algumas ferramentas farmacológicas em anéis de artéria aorta de ratas OVX com endotélio vascular intacto.....	143

# *Lista de Tabelas*

## LISTA DA TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Número de patentes depositadas por base de dados abrangendo diferentes termos.....	72
<b>Tabela 2:</b> Distribuição por CIP das patentes depositadas na base WIPO, utilizando as palavras chave “diosgenin”, “diosgenin and cardiovascular” e “diosgenin and hypertension”.....	77
<b>Tabela 3:</b> Número de artigos publicados por base de dados abrangendo diferentes termos.....	78
<b>Tabela 4:</b> Toxicidade aguda do Diosg/ $\beta$ -CD na dose de 2000 mg/kg, v.o.	93
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratas Wistar, tratadas com o Diosg/ $\beta$ -CD (2000 mg/kg) administrado por via oral (v.o.) durante 14 dias consecutivos.....	94
<b>Tabela 6:</b> Avaliação do peso dos órgãos internos de ratas Wistar tratadas com o Diosg/ $\beta$ -CD (2000 mg/kg) administrado por v.o. durante 14 dias consecutivos.....	94
<b>Tabela 7:</b> Percentuais de perdas de massa das amostras em diferentes faixas de temperatura obtidos por Termogravimetria (TG).....	116
<b>Tabela 8:</b> Dados da curva de calibração.....	120
<b>Tabela 9:</b> Eficiência de encapsulação e eficiência de carga (teor) da Diosgenina no complexo desenvolvido.....	121
<b>Tabela 10:</b> Composição da solução de Krebs.....	137
<b>Tabela 11:</b> Composição da solução de Krebs despolarizante - KCl (80 mM).....	138
<b>Tabela 12:</b> Reatividade vascular com fenilefrina em anéis de artéria aorta isolada de ratas controle, ovariectomizadas e na presença de Diosgenina. * $p < 0,05$ versus OVX, Teste-t-Student (n=4).....	147
<b>Tabela 13:</b> Atividade da Diosgenina em anéis de aorta com e sem endotélio vascular despolarizado com KCl 80 mM comparadas com o efeito obtido após pré-contracção por Fen (1 $\mu$ M). * $p < 0,05$ versus endotélio.....	148
<b>Tabela 14:</b> Atividade da Diosgenina em anéis de artéria aorta com endotélio e pré-contráidas com fenilefrina, na presença de L-NAME ou de ODQ, Atropina e Indometacina. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto, Teste-t-Student (n= 5). .....	149
<b>Tabela 15:</b> Atividade da Diosgenina em anéis de artéria aorta com e sem endotélio e pré-contráidas com fenilefrina, na presença de Tiron. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto, Teste-t-Student (n= 5).....	149
<b>Tabela 16:</b> Atividade da Diosgenina em anéis de artéria aorta com endotélio e pré-contráidas com fenilefrina na presença de Tetraetilamônio, Glibenclamida e 4-aminopiridina. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto, Teste-t-Student (n= 6).....	150

# *Sumário*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>32</b>
2.1 Hipertensão arterial e mecanismos de regulação da pressão arterial .....	32
2.2 Menopausa e distúrbios associados ao sistema cardiovascular.....	36
2.3 Papel do estrógeno na regulação da pressão arterial .....	40
2.4 Fitoestrógeno e seu papel na reposição hormonal .....	44
2.5 Diosgenina: uso e estudos farmacológicos.....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>64</b>
3.1 Objetivo Geral.....	65
3.2 Objetivos Específicos .....	65
<b>4 CAPÍTULO I - ATIVIDADE DA DIOSGENINA LIVRE E COMPLEADA EM BETA-CICLODEXTRINA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA E CIENTÍFICA</b> .....	<b>66</b>
<b>RESUMO:</b> .....	<b>66</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	<b>71</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
3.1 Prospecção Tecnológica .....	72
3.2 Patentes depositadas na WIPO .....	74
3.2.1 Prospecção científica .....	79
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
<b>5 CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADE COAGULANTE DA DIOSG/<math>\beta</math>-CB EM RATAS WISTAR</b> .....	<b>86</b>
<b>Resumo:</b> .....	<b>87</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>90</b>
2.1 Complexo de inclusão de diosgenina com $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) .....	90
2.2 Animais .....	90
2.3 Drogas e produtos químicos.....	91
2.4 Determinação da toxicidade aguda em ratas .....	91
2.5 Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos das ratas.....	91
2.6 Testes Bioquímicos .....	92
2.7 Coagulograma - Tempo de Atividade da Protrombina (TAP) e Tempo de Tromboplasmina Parcial Ativada (TTPA) .....	92
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>93</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>97</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>100</b>
<b>5 CAPÍTULO III - CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIHIPERTENSIVA DE COMPLEXO NANOESTRUTURADO DE DIOSGENINA EM RATAS OVX E OVX/L-NAME</b> .....	<b>103</b>
<b>Resumo:</b> .....	<b>105</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>106</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>107</b>



2.1 Preparo dos complexos de inclusão .....	107
2.2 Animais .....	108
2.3 Indução de regressão hormonal – Ovariectomia (OVX) .....	109
2.4 Citologia vaginal.....	110
2.5 Tratamento.....	111
2.6 Indução da hipertensão pela inibição da enzima sintase de óxido nítrico (NO) com L-NAME.....	111
2.7 Avaliação da atividade hipotensora em ratas não anestesiadas.....	111
<b>2.8 Análise estatística .....</b>	<b>113</b>
<b>3 RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>127</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>127</b>
<b>6 CAPÍTULO IV - ESTUDO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE VASORELAXANTE DA DIOSGENINA EM AORTA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.....</b>	<b>133</b>
<b>RESUMO:.....</b>	<b>134</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>137</b>
2.1 Preparação da Diosgenina e derivado nanoestruturado de Diosgenina .....	137
2.2 Animais .....	137
2.3 Soluções Nutritivas .....	138
2.4 Protocolos experimentais utilizados na abordagem <i>in vitro</i> .....	139
2.4.1 Preparação dos anéis de artéria aorta isolada de ratas.....	139
2.4.2 Reatividade vascular à adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria aorta de ratas controle e ovariectomizadas (OVX) na presença de endotélio funcional.....	142
2.4.3 Reatividade vascular da Diosgenina e derivado nanoestruturado em anéis de artéria aorta de ratas OVX na presença de endotélio funcional.....	142
2.4.4 Verificação do efeito da Diosgenina e seu derivado nanoestruturado sobre anéis de artéria aorta isolada de ratas OVX pré-contraídos com fenilefrina .....	143
2.4.5 Verificação da participação da enzima NO-sintase no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX .....	145
2.4.6 Verificação da participação da ciclase de guanilil solúvel no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX .....	145
2.4.7 Verificação da participação da ciclooxigenase no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX .....	145
2.4.8 Verificação da participação dos receptores muscarínicos no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX .....	146
2.4.9 Verificação da participação dos ânions superóxidos no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX .....	146
2.4.10 Efeito da Diosgenina livre sobre contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria aorta de ratas OVX .....	146
<b>2.5 Análise estatística .....</b>	<b>147</b>
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>147</b>
3.1 Efeito vasorelaxante da diosgenina nos anéis de aorta de ratos OVX .....	147
3.2 Papel do endotélio no relaxamento induzido por diosgenina das artérias aorta	148
3.3 Papel dos canais de K <sup>+</sup> no relaxamento induzido por Diosgenina das artérias aorta .....	149
3.4 Efeito da diosgenina na reatividade vascular de ratos OVX .....	152

4 DISCUSSÃO.....	153
5 CONCLUSÃO .....	155
REFERÊNCIAS .....	155
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>161</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>164</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>165</b>
ANEXO A.....	166
ANEXO B.....	168

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

A menopausa é uma condição clínica da mulher, representada pelo fim do período reprodutivo, que é caracterizada por diversas alterações metabólicas, dentre elas a disfunção na função cardiovascular, e pela redução da produção e secreção dos hormônios ovarianos, especialmente o estrógeno. O estrógeno está relacionado à produção de óxido nítrico (NO), favorecendo a vasodilatação, e, conseqüentemente, o efeito cardioprotetor (PALLOS *et al.*, 2006; CAVADAS *et al.*, 2010).

A diminuição de estrógeno tem sido correlacionada com as mudanças na distribuição da gordura corporal, que tendem a acumular-se na região abdominal, podendo ocasionar complicações metabólicas, a exemplo da dislipidemia, que gera o aumento do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e diminuição da fração de colesterol de alta densidade (HDL-c), provocando aumento na incidência de doenças cardiovasculares (DCV), dentre elas a hipertensão (PARK *et al.*, 2014).

Uma das estratégias para reduzir os riscos de DCV na menopausa é o uso da Terapia de Reposição Hormonal (TRH). Estudos epidemiológicos avaliaram a relação entre a TRH e DCV e mostraram evidências de que o tratamento hormonal era benéfico em mulheres na pós-menopausa, reduzindo o risco de DCV de 50% para 35% (MANSON; MARTIN, 2001). No entanto, os efeitos colaterais atribuídos aos estrógenos naturais e sintéticos têm limitado seu uso na TRH (LI, 2013), o que tem contribuído para o desenvolvimento de substâncias alternativas que possuem propriedades benéficas semelhantes aos estrógenos, porém com menos efeitos adversos, tais como os fitoestrógenos.

Os fitoestrógenos são hormônios vegetais que ocorrem naturalmente nas plantas, e exercem efeitos similares aos estrógenos no organismo da mulher. Segundo Grings *et al.* (2009), a administração de fitoestrógenos tem efeito benéfico nos distúrbios da pós-menopausa, atenuando o declínio da secreção de estrógeno e posteriores desajustes histomorfológicos e metabólicos conseqüentes da menopausa.

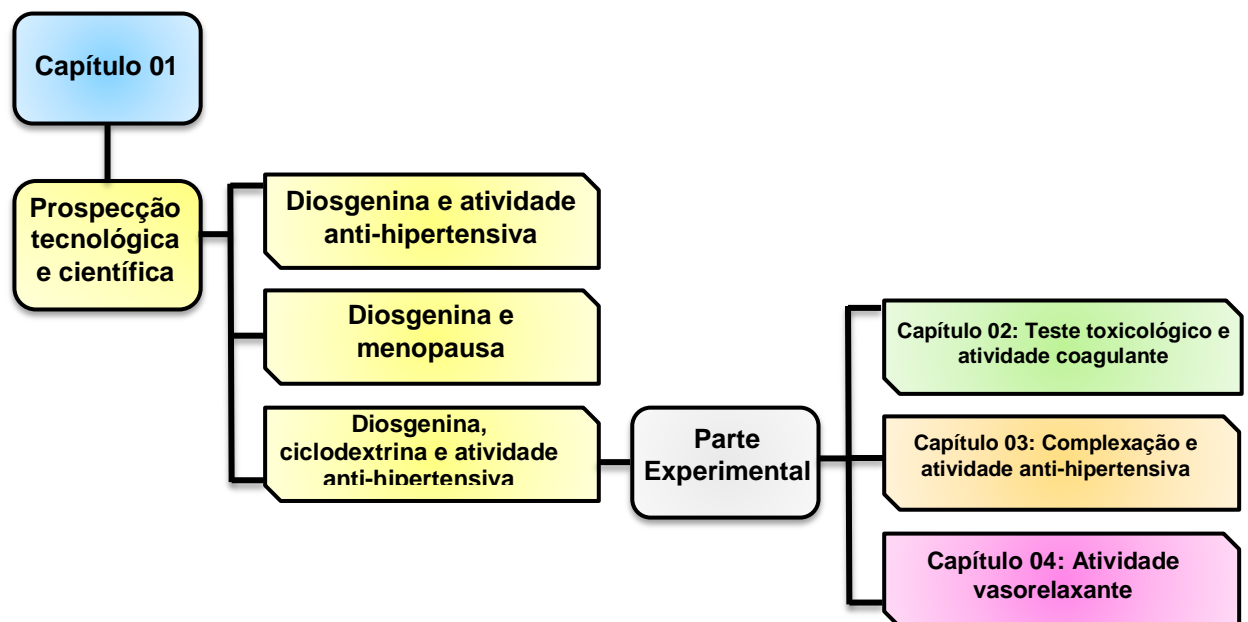
A Diosgenina é um fitoestrógeno com estrutura semelhante à progesterona e ao estradiol, que tem sido bastante utilizada em diversos estudos com modelos animais. Relatos na literatura apontam que a diosgenina possui efeito anti-inflamatório em ratos (YAMADA *et al.*, 1997), e que os glicosídeos da diosgenina alteram as

atividades mecânicas do miocárdio, provavelmente, através da modulação do fluxo de cálcio extracelular pela da membrana plasmática (DIAS, 2007). Por outro lado, um obstáculo encontrado no uso da diosgenina é a reduzida solubilidade que ela apresenta em meio aquoso, o que dificulta sua biodistribuição e formulação farmacêutica (ROGALSKI *et al.*, 2013; BEIG *et al.*, 2013). Uma alternativa é o uso da nanobiotecnologia, a fim de melhorar a diluição de moléculas apolares em meio aquoso e proporcionar um sistema de liberação direcionado para o sítio da doença (GUEDES *et al.*, 2008).

Os diversos efeitos benéficos da Diosgenina têm despertado interesse pela comunidade científica em diversas áreas. No entanto, são ausentes estudos que investigam o efeito da diosgenina e seu derivado nanoestruturado na função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia e associada com hipertensão L-NAME, bem como os mecanismos envolvidos no mesmo.

Baseado nos efeitos colaterais encontrados nos fármacos atuais e considerando que os produtos naturais apresentam uma variedade de atividades farmacológicas, torna-se constante a busca pela descoberta de novos compostos derivados de produtos naturais com propriedades terapêuticas comprovadas, incluindo a atividade anti-hipertensiva.

**Figura 1:** Organização do trabalho de Tese.



O primeiro capítulo apresenta uma prospecção científica e tecnológica, a fim de conhecer o estado da arte e apresentação do cenário nacional e mundial da Diosg/ $\beta$ -CD, relacionado com suas atividades farmacológicas, incluindo as atividades anticoagulante, anti-hipertensiva e vasorelaxante.

O segundo capítulo demonstra que a Diosg/ $\beta$ -CD reduz a pressão arterial em modelos de ratas OVX hipertensas L-NAME. O terceiro capítulo aborda o efeito trombolítico da a Diosg/ $\beta$ -CD e a importância deste na menopausa e hipertensão. O quarto capítulo apresenta o efeito vasorelaxante do Diosg/ $\beta$ -CD frente à regressão estrogênica, que é um modelo de menopausa, bem como a sugestão de possíveis mecanismos de ação referentes ao efeito vasorelaxante da diosgenina.

# *Revisão de literatura*

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hipertensão arterial e mecanismos de regulação da pressão arterial

Mundialmente, a doença cardiovascular que representa maior impacto epidemiológico é a hipertensão arterial (HA) (OGIHARA *et al.*, 2005), que é um dos principais fatores de risco para o surgimento de doenças cardio e cerebrovasculares podendo ocorrer em ambos os sexos e em qualquer idade (STAESSEN *et al.*, 2003; MEIN *et al.*, 2004). Devido à ausência de sinais precoces de sua manifestação, a HA é, ainda, conhecida como "mal silencioso".

A elevação da pressão arterial pode causar, entre outras coisas, disfunções e lesões do endotélio vascular com migração de elementos aterogênicos, incluindo LDL (lipoproteína de baixa densidade), monócitos e macrófagos (NEJATIZADEH *et al.*, 2008). Essa elevação representa, também, um fator de risco independente, linear e contínuo para doenças cardiovasculares (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Por esse motivo, a hipertensão arterial apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, resultado, principalmente, das suas complicações, a exemplo da doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades (CESARINO *et al.*, 2008).

No Brasil, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por mais de 383 mil óbitos no ano de 2017, dentre as quais se destaca, em todas as regiões do país, o acidente vascular cerebral, causado em 40% dos casos por hipertensão arterial e em 25% dos casos por doença coronariana, afetando mulheres em maior proporção. Assim, a elevação da pressão arterial aumenta exponencialmente o número de mortes por doença cardiovascular, a partir de 115/75 mmHg (LOTUFO; LOLIO, 1996; SBC, 2018).

A pressão arterial (PA) é definida como força ou unidade de área (IRIGOYENI *et al.*, 2003). Assim, pode ser representada matematicamente por um valor de PA não pulsátil, a pressão arterial média (PAM), que pode ser determinada pelo produto entre o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica total (RVPT), formando a seguinte equação:  $PAM = DC \times RVPT$ , onde DC é determinado pelo produto entre o volume de ejeção sistólica (VES) e a frequência cardíaca (FC), expresso pela equação:  $DC = VES \times FC$ . Assim, a frequência cardíaca participa da homeostase da



pressão arterial média como um de seus determinantes primários (IRIGOYEN *et al.*, 2005).

A manutenção da pressão arterial (componente tônico), assim como a variação momento a momento (componente fásico), dependem de mecanismos complexos que determinam ajustes apropriados da frequência e da contratilidade cardíacas, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância, e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos, fundamentais para corrigir prontamente os desvios para mais e para menos dos níveis basais de pressão, sejam os indivíduos normotensos, hipertensos ou mesmo hipotensos (OGIHARA *et al.*, 2009).

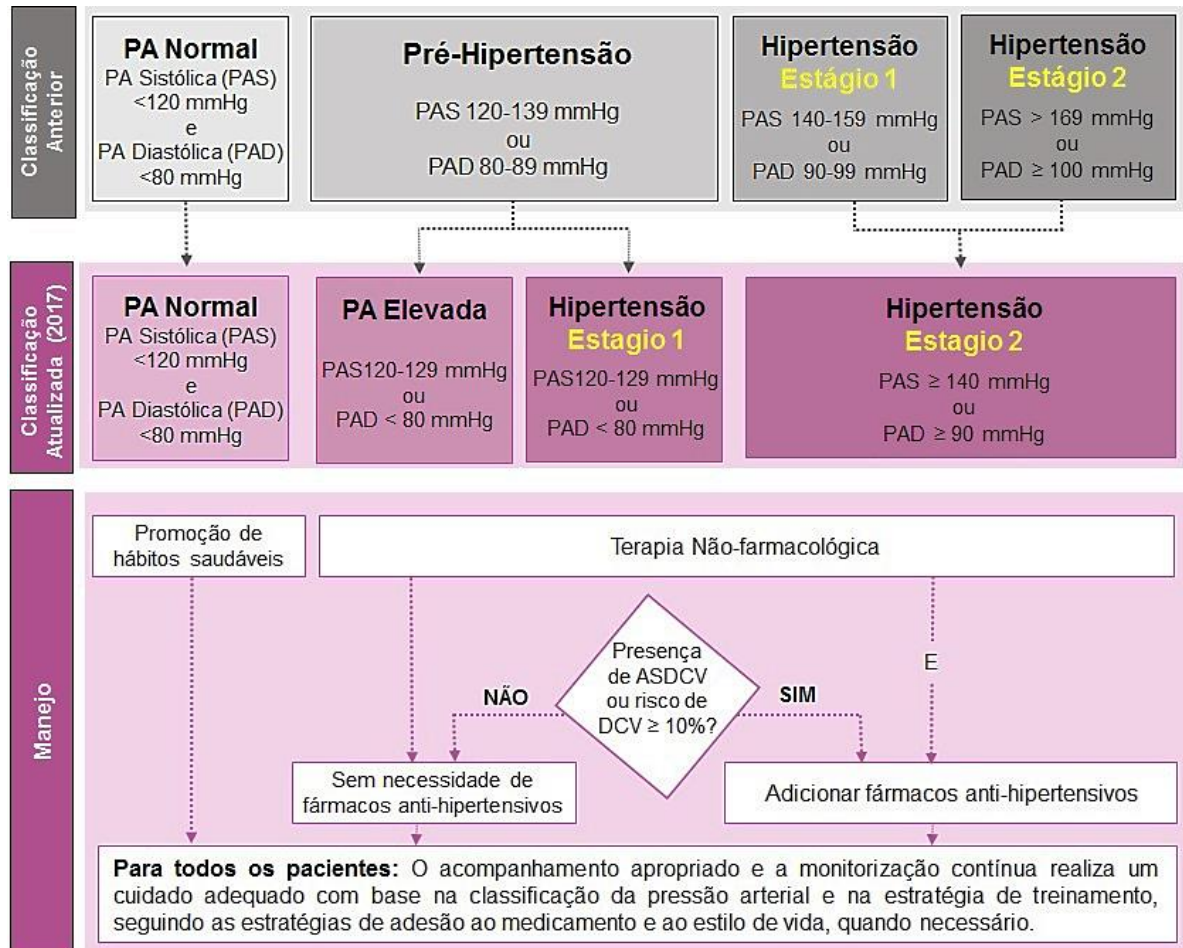
O sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação e pela manutenção da pressão arterial, que representa uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico. Para isso, ele necessita da ação integrada de outros sistemas, tais quais, o renal, o neural e o endócrino, que, por outro lado, são responsáveis pela redistribuição dos vários fluxos sanguíneos regionais através das alterações na resistência total e no débito cardíaco (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

Os mecanismos responsáveis pelo aumento da pressão arterial ainda não são completamente compreendidos, pois trata-se de uma doença multifuncional resultante da interação entre aspectos ambientais e genéticos. Além disso, sabe-se que a hipertensão arterial é poligênica e sua manifestação fenotípica depende do gene ou do grupo de genes envolvidos em cada caso. Diante disso, dentre esses possíveis mecanismos, destacam-se: o alto consumo de sal, a obesidade, a alteração dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e nervoso simpático, e disfunção endotelial (PAGE *et al.*, 1999; AMODEO; HEIMANN, 2003). Também, a pressão arterial pode ser influenciada pela ação de drogas sobre um ou ambos os parâmetros (OASTES, HARDMAN *et al.*, 1996).

Todo indivíduo adulto com valores de pressão arterial sistólica (PAS) iguais ou superiores a 160 mmHg e/ou de pressão arterial diastólica (PAD) iguais ou superiores a 95 mmHg, em pelo menos duas medições realizadas em ocasiões diferentes, é considerado hipertenso, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (KRUMEL, 2002). Por outro lado, segundo estabelece as VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010), para um indivíduo ser classificado como hipertenso, sua pressão arterial sistólica (PAS) deve ser 140 mmHG e sua pressão

arterial diastólica (PAD) deve ser  $\geq 90$  mmHg, sendo esses valores considerados "limítrofes". Assim, no Brasil, o indivíduo apresenta pressão arterial considerada ideal, com menor risco cardiovascular, com PAS < 120 mmHg e PAD < 80 mmHg.

**Figura 2:** Diretriz para a prevenção, detecção, avaliação e controle da pressão arterial elevada em adultos.



Fonte: WHELTON *et al.*, 2017.

No entanto, as diretrizes de hipertensão da sociedade americana de cardiologia (2017), como atualização do último Joint (VIII Joint 2014), apresentam regras ainda mais severas no processo de controle e prevenção da pressão arterial. Neste, para um indivíduo ser classificado como hipertenso estágio 1, sua pressão arterial sistólica (PAS) deve ser entre 130-139 mmHg e sua pressão arterial diastólica (PAD) deve ser entre 80-89 mmHg, sendo esses valores considerados "limítrofes". Assim, no Brasil, o indivíduo apresenta pressão arterial considerada ideal, com menor risco cardiovascular, com PAS <120 mmHg e PAD <80 mmHg, conforme ilustrado na Figura 2 (WHELTON *et al.*, 2017).

Os valores estão bem abaixo no último Joint, o que aumentou a prevalência da HAS de 32% para 46% da população, ou seja, uma doença que afeta quase metade de toda população. Também houve uma atualização na rotina para diagnóstico da hipertensão. Para fins diagnósticos, a PA deve ser medida 2 a 3 vezes, em 2 a 3 ocasiões distintas. Se for utilizada a auto-medida ou a medida de outros profissionais, um check-list com 6 passos deve ser seguido, além de ser utilizado equipamento validado. Entretanto o método ideal e que melhor se correlaciona com eventos é a MAPA de 24 horas (a diretriz não enfatiza tanto seu uso). (SOCIEDADE AMERICANA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Dessa maneira, a hipertensão arterial é um estado alterado de saúde, onde a pressão do sangue está acima dos valores considerados normais por um longo período de tempo (KAPLAN, 2001; OGIHARA *et al.*, 2009). Para tanto, a HA pode apresentar-se de maneira primária ou essencial, caracterizada por uma evolução da pressão sanguínea sem predisposição genética, ou de maneira secundária ou adquirida, na qual geralmente se tem elevação da pressão sanguínea por ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (PAGE *et al.*, 1999; NAGAI, *et al.*, 2008; MATSUI *et al.*, 2009).

O fator primário da hipertensão é a presença de uma resistência vascular periférica total (RVPT) elevada. Com isso, qualquer variação que possa ocorrer no débito cardíaco deve estar relacionada a uma elevação da RVPT, e não como causa própria do estado hipertensivo (PAGE, 1987), que está associado a anomalias estruturais no sistema cardiovascular (FOLKOW, 1982; NADA *et al.*, 2007), tais como o aumento na relação parede versus luz das artérias (SAFAR *et al.*, 1981), o aumento na resistência periférica, a diminuição da complacência venosa (TAKESHITA; MARK, 1979; YOON *et al.*, 2008), o aumento da quantidade da massa cardíaca e muscular lisa (FOLKOW, 1982, NADA *et al.*, 2007), além de alterações na função renal (COLEMAN *et al.*, 1994, MAMTSUI *et al.*, 2009).

Para uma maior compreensão das anomalias cardiovasculares, são realizados estudos com padrões de hipertensão arterial sistêmica em ratos, dentre os quais se destaca o de inibição da síntese de óxido nítrico (NO) por meio da administração de NG-nitro-L-arginina-metil-ester-L-NAME (BAYLIS *et al.*, 1998; ARNAL *et al.*, 1992), por simular um processo de disfunção endotelial (WIDLANSKY *et al.*, 2003, DEANFIELD *et al.*, 2007; SARAVANAKUMAR; RAJA, 2011). Isso se dá

por conta da indução de uma hipertensão sustentada em ratos normotensos causada pelo bloqueio da síntese do NO por L-NAME. Ademais, o L-NAME é solúvel em água e produz um aumento prolongado da pressão arterial em poucas horas, quando administrado oralmente pela água do animal (BAYLIS *et al.*, 1992).

Nesse modelo, ocorre um aumento sustentado da pressão arterial média, mudanças na contratilidade miocárdica, alterações histológicas que consistem em uma grande área de fibrose e de necrose miocárdica (BAYLIS e ZATZ, 1998), remodelagem miocárdica (FIALOVÁ *et al.*, 2007), agiogênese e danos mitocôndriais, bem como um aumento na resistência vascular periférica (OKRUHLICOVÁ *et al.*, 2000), disfunção endotelial e hipertensão grave, que produz estresse oxidativo, danos inflamatórios e morfológicos, mudanças funcionais, como a proteinúria, nefroesclerose, fibrose miocárdica e infarto, além de todas as condições patológicas que são consistentes com o quadro clínico da doença hipertensiva (ONO *et al.*, 1995; GONZALEZ *et al.*, 2000; DE GASPARO *et al.*, 2002).

Estudos indicam que a inibição ou a produção deficiente de NO no organismo pode ser responsável por uma série de transformações que atuam junto a outros fatores de risco cardiovasculares, para a incidência de eventos como acidentes vasculares encefálicos (AVE), infartos e vasoespasmos. Todavia, o aumento da resistência vascular sistêmica ou mesmo localizada é capaz de induzir um aumento compensatório da liberação local do NO que se contrapõe à vasoconstrição, revelando um importante mecanismo fisiológico de regulação do tônus vasomotor e, conseqüentemente, da resistência vascular e pressão arterial (RAMOS *et al.*, 2006).

## **2.2 Menopausa e distúrbios associados ao sistema cardiovascular**

O climatério corresponde às alterações biológicas que ocorrem no corpo da mulher no período da menopausa (BABER, PANAY, e FENTON, 2016). Esse processo é composto por um período de quatro fases: pré-menopausa, fase representada pela irregularidade do ciclo menstrual nos últimos doze meses, o que normalmente ocorre entre os 45 e 50 anos de idade; peri-menopausa, período entre vinte e quatro e noventa e seis meses antes da menopausa, com ciclos irregulares e menores por no mínimo doze meses consecutivos, sem amnorreia; menopausa, quando ocorre a parada permanente das menstruações; e pós-menopausa, que se

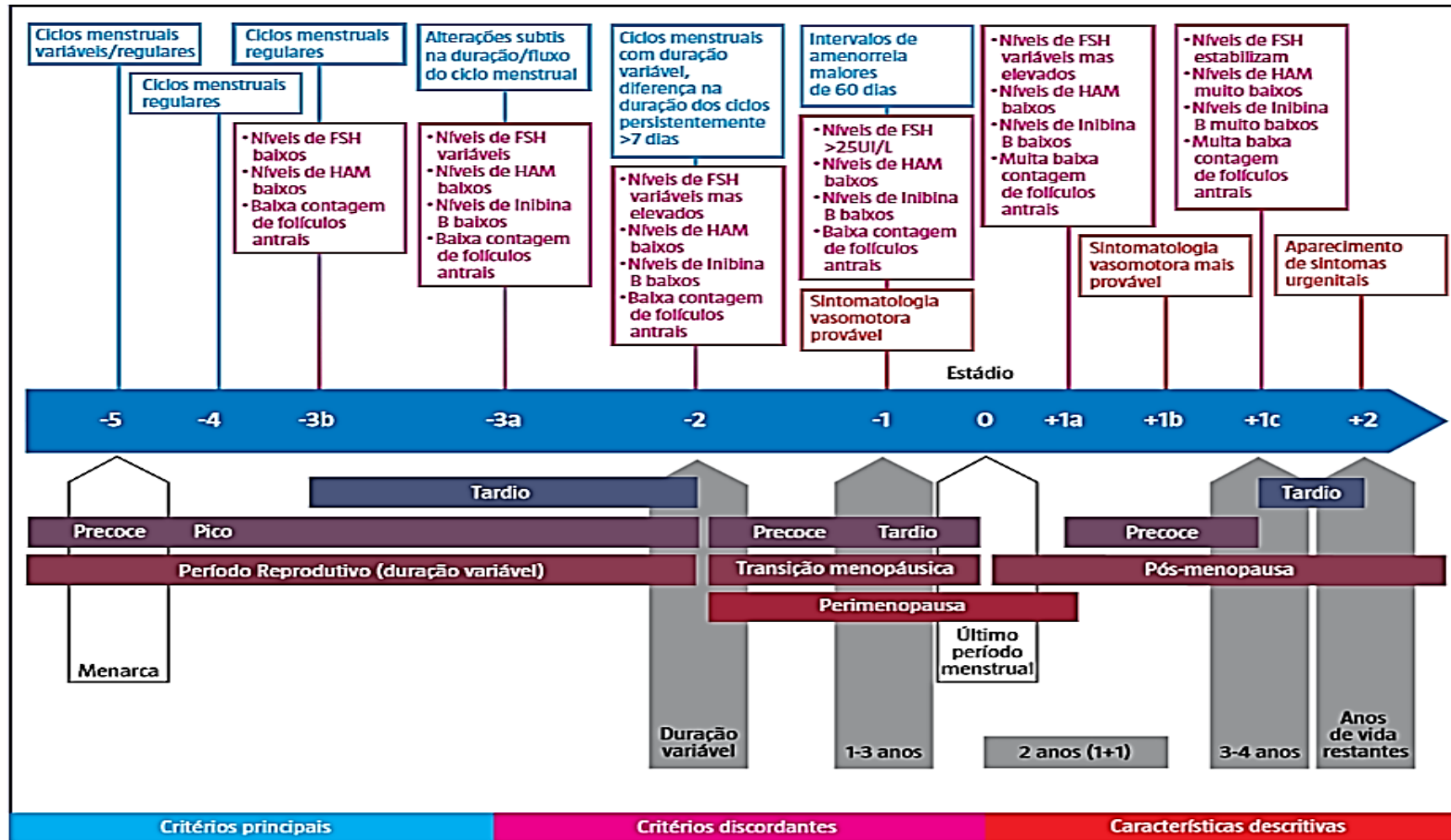
inicia doze meses após a amenorreia, segundo a OMS (2015). Com isso, a OMS prevê que até o ano 2030, mais de um milhão de mulheres estarão na menopausa, passando um terço da vida no climatério.

Ao entrar no período do climatério, a mulher sofre uma série de modificações, com sintomas vasomotores (calores súbitos/afrontamentos, sudorese e cefaleias), sintomas cardiovasculares (aumento da pressão arterial e das taxas de colesterol, pré-cordialgias e alterações electrocardiográficas), sintomas psíquicos (irritabilidade, insônias e humor depressivo), sintomas urogenitais (incontinência urinária, secura vaginal e dispareunia), além da possibilidade do surgimento de alterações nas mamas, alterações esqueléticas, aumento de peso, alterações da pele, recuo da linha do cabelo, artralgias e dores ósseas (BACELAR-ANTUNES e SOARES, 2000; BACHMANN e SANTEN, 2016). Na pós-menopausa é comum o comprometimento uretral e o surgimento de osteoporose (SHI-HUA *et al.*, 2013; NEVES-E-CASTRO *et al.*, 2015).

A menopausa é particularmente relevante como episódio marcador da evolução biológica da mulher, marco de relevância fisiológica e clínica. Esta evolução foi recentemente englobada e esquematizada no conceito de fases evolutivas, na sigla anglo-saxónica STRAW (Stages of Reproductive Aging in Women) com um total de 10 estádios específicos, descritos na Figura 3 (BABER *et al.*, 2016; CONEY, 2016).

Na menopausa, quando ocorre a cessação permanente da menstruação, os ovários naturalmente perdem sua função e ocorre a diminuição na produção de estrógeno pelas células foliculares ovarianas, que são reduzidas à medida que a idade da mulher avança, o que conseqüentemente resulta em diversas alterações fisiológicas no organismo (MENDES *et al.*, 2012). Essas alterações podem ser representadas pela irregularidade nos níveis hormonais e nos ciclos, e pelo declínio da fertilidade, decorrente da queda do número de folículos ovarianos, as quais repercutem sobre os tecidos e órgãos provocando alterações metabólicas e anatômicas (KHALIL, 2013). A queda da função ovariana após a menopausa se deve ao aumento espontâneo de moléculas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 e 6 (IL-1, IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). No entanto, apesar de um processo natural, a menopausa pode ser resultado de ovariectomia bilateral cirúrgica, realizada na mulher em idade fértil (BASSAM, 1999; SPG, 2017).

**Figura 3:** Estádios do envelhecimento reprodutivo em mulheres com um total de 10 estádios.



Fonte: (SPG, 2017)

A incidência de doença cardiovascular aumenta consideravelmente, sendo a principal causa de morte na pós-menopausa (BASSUK e MANSON, 2014; DOUGLAS e POPPAS, 2016). Estudos epidemiológicos mostram a menor susceptibilidade de mulheres na pré menopausa à hipertensão e doenças cardiovasculares que em homens na mesma faixa etária (LLOYD-JONES *et al.*, 2010). No entanto, após a menopausa, as mulheres se tornam mais vulneráveis a doenças coronarianas e hipertensão comparadas aos homens da mesma idade (RECKELHOFF, 2001), o que sugere a importância do 17- $\beta$  estradiol na prevenção dessas doenças cardiovasculares.

Mulheres jovens também apresentaram alterações cardiovasculares após a remoção cirúrgica dos ovários (EAKER *et al.*, 1993; YIM *et al.*, 1998), o que, nesse caso, reforça os indícios de que a diminuição ou ausência da produção de hormônios sexuais produzidos pelos ovários estão relacionados ao aumento da ocorrência de doenças cardiovasculares, e não o fator idade (BHAVNANI *et al.*, 2001).

As doenças cardiovasculares configuram um problema de saúde pública expressivo em todo o mundo, com custos significativos decorrentes de tratamento e de complicações (BALU; THOMAS, 2006). No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 1.150.000 internações/ano e representam, há décadas, a primeira causa de morte (HIPERDIA, 2006; AZAMBUJA *et al.*, 2008). Com isso, estudos estimam que 33% do total de óbitos, em adultos acima de 35 anos, são causados por doenças cardiovasculares (AZAMBUJA *et al.*, 2008).

A hipertensão arterial, quando não tratada ou com tratamento inadequado, está fortemente relacionada ao aumento do risco do surgimento de doenças cardíacas, renais e oftalmológicas (CARDIOLOGIA e NEFROLOGIA, 2006). Além disso, quando associada à pós-menopausa, aumenta o risco de doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, doença vascular periférica e aneurisma dissecante da aorta (LIMA, 2001; MENDES *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2015).

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é definida pelos valores de pressão arterial sistólica (PAS)  $\geq 140$  mmHg e/ou de pressão arterial diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg medidas em condições ideais, em três ocasiões, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2010). Durante a pós-menopausa, devido à deficiência de estrógeno, um potente vasodilatador, esses valores podem ser alterados. Estudos

mostram uma alteração de 4-5 mmHg na PAS independente do fator idade (HAGE, 2013).

Outro aspecto que favorece o surgimento de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa é a síndrome metabólica, mais prevalente após a menopausa, da qual todos os componentes (obesidade visceral, dislipidemia, hipertensão arterial e alterações do metabolismo glicídico) se associam a maior incidência não só de doenças cardiovasculares, mas também da doença cerebrovascular, doença arterial periférica/ claudicação intermitente e aneurismas da aorta (MENDES *et al*, 2012; BOARDMAN *et al*, 2015). Isso ocorre porque a síndrome metabólica está associada à significativa elevação dos níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TRI), LDL-c e uma diminuição de HDL-c. O perfil lipídico torna-se mais aterogênico com o aumento da oxidação de LDL-c, fator que contribui para o surgimento de obesidade abdominal (ZHOU *et al.*, 2015). A síndrome metabólica é mais observada em mulheres na pós-menopausa, podendo repercutir sobre a ocorrência de infarto do miocárdio e outras morbidades cardiovasculares (MEIRELLES, 2014).

### **2.3 Papel do estrógeno na regulação da pressão arterial**

A regulação da pressão arterial é uma atividade complexa envolvendo mecanismos neurais e neurohumorais, em curto prazo regulados pelo sistema nervoso simpático e em longo prazo regulados pelos rins. Esse processo se dá por meio de quatro sistemas: cardiovascular, através da vasoconstrição periférica e insuficiência cardíaca; nervoso, por meio da hiperestimulação do sistema nervoso simpático; renal, pela liberação do hormônio renina-angiotensinaaldosterona; e endócrino, com a liberação dos hormônios estrógeno, renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial, etc (MONTEIRO *et al.*, 2012).

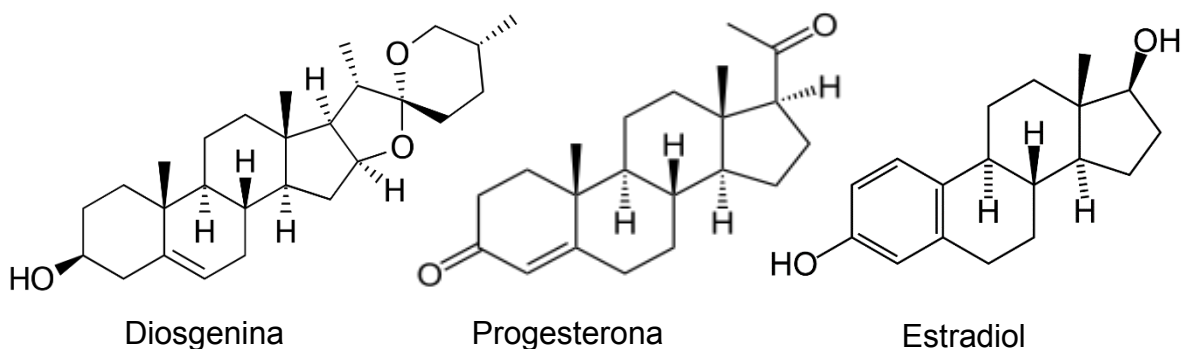
A participação do sistema endócrino na regulação da pressão arterial, como citado anteriormente, pode se dar por meio da liberação do hormônio estrógeno, que é secretado pelos ovários da mulher desde a puberdade até o climatério e em menor quantidade pelas adrenais (RECKELHOFF, 2001; HUSS; GARBACZ; XIE, 2015). O estrógeno é um grupo de hormônio esteróides com 18 carbonos, dos quais três desses são estruturalmente semelhantes: 17- $\beta$  estradiol - E<sub>2</sub> (Figura 4), estrona-E<sub>1</sub> e estriol-



E<sub>3</sub> (IGNACIO *et al.*, 2014). Os receptores de estrogênio (ERs) pertencem à família dos receptores de hormônios esteróides (NRs) e têm sua estrutura primária caracterizada por três domínios funcionais principais: o domínio responsável pela ligação com o ligando (hormônio, fitoestrogênio), a região responsável pela interação com o DNA (ácido desoxirribonucleico) e a região reguladora da transcrição (MICHEL *et al.*, 2013)

As funções biológicas do estrogênio são mediadas pela ligação aos seus receptores: receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) e receptor de estrogênio beta (ER $\beta$ ), além de um terceiro receptor acoplado à proteína G (GPER) ou GPR30, porém, existem poucos estudos acerca desse receptor. A ação do estrogênio é estimulada ou inibida de maneira seletiva, dependendo de um equilíbrio entre as atividades ER, além de possuir elevada especificidade nos tecidos alvos (MAYRA *et al.*, 2014). Essa ação pode ocorrer frequentemente por meio dos efeitos genômicos, quando há participação, principalmente, do receptor nuclear ER $\alpha$  que envolve a ligação do ligando estrogênio (E<sub>2</sub>) ao receptor, dos efeitos não-genômicos (rápidos) de E<sub>2</sub> que são mediados pelos ER $\alpha$  e/ou ER $\beta$  localizados na membrana plasmática e incluem a regulação do Ca<sup>2+</sup>, além de serem responsáveis, também, por regular a transcrição do gene do ER no miocárdio, dos efeitos apoptóticos e do metabolismo mitocondrial. (KNOWLTON; KORZICK, 2014)

**Figura 4:** Estrutura química da Diosgenina, Progesterona e Estradiol.



Os receptores de estrogênio são expressos em células do endotélio e do músculo liso vascular (MLV), o que sugere que a sinalização desses receptores esteja em função das células musculares lisas. O receptor de estrogênio alfa tem sua expressão destacada em tecidos envolvidos no metabolismo da glicose e dos lipídios (tecido adiposo, fígado e coração) e o receptor de estrogênio beta nos demais tecidos (epitélio da próstata, testículos, células da granulosa do ovário, da medula óssea, do

miocárdio e do cérebro) (LEE; KIM; CHOI, 2012). Esses receptores têm sido identificados em centros cerebrais relacionados à regulação cardiovascular, a exemplo, a área pré-óptica, o núcleo paraventricular, o núcleo supraóptico, o núcleo do trato solitário, a área ventrolateral da medula e a área postrema. Assim, mulheres que fazem terapia de reposição hormonal na pós-menopausa, têm a frequência de disparo de um nervo simpático reduzida, o que constitui outro mecanismo de efeitos benéficos do estradiol (TAO *et al.*, 2012).

Em alterações pressóricas, há grande dilatação da parede dos vasos e ativação dos barorreceptores nas artérias, especialmente na aorta, que geram os potenciais de ação. Os sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS), via nervo glossofaríngeo (fibras carótídeas) e vago (fibras aórticas). Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do nervo vago e no núcleo ambíguo, que, por sua vez, se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando o aumento da atividade vagal e redução da frequência cardíaca (IRIGOYEN *et al.*, 2005). Por outro lado, o tônus simpático é reduzido para o coração, rins e vasos, uma vez que outros neurônios do NTS excitam o bulbo ventrolateral caudal, quando estimulados por aumento da pressão arterial. Tal fato, inibe os neurônios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral, levando à redução da contratilidade cardíaca e bradicardia, assim como na redução da resistência vascular periférica e renal, resultando na redução da pressão arterial (MENDONÇA *et al.*, 2007).

Existem vários estudos que comprovam o papel dos esteróides sexuais femininos no controle vascular por meio do equilíbrio entre as substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras no endotélio vascular e no músculo liso subjacente. Dentre esses esteróides, o estrogênio diminui o tônus vascular e aumenta as respostas dilatadoras endotélio-dependentes nos vasos sanguíneos (MILEWICZ *et al.*, 2013)

Os receptores específicos de estrógeno no endotélio e na célula muscular lisa têm uma ação modulatória sobre o óxido nítrico (NO), e consequente efeito cardioprotetor (LE *et al.*, 2013). A síntese de NO é um processo dependente de  $Ca^{2+}$ , que ocorre no endotélio a partir do grupo guanidina da L-arginina, por ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e dessa maneira, o NO pode ter efeito protetor

às células. A enzima NOS possui múltiplos sítios propícios à fosforilação que pode ser realizada por várias proteínas-quinases, incluindo Akt e ERK 2/1, que por estimulação de estrógeno, fosforila PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub> e rapidamente a serina/treonina-quinase Akt. As proteínas Akt ativadas, por sua vez, fosforilam a serina 1177 de NOS nas células endoteliais (YI, 2012).

Por se tratar de um gás, o NO difunde-se para as áreas adjacentes às células musculares lisas e ativa a guanilil ciclase solúvel (GCs), o que eleva os níveis celulares de guanosina-monofosfatato-cíclico (GMPc), a qual atua como mensageiro intercelular amplificando a resposta celular. Com o aumento da concentração desse nucleotídeo, GMPc, a proteína quinase G (PKG) é ativada na célula muscular e ocorre o relaxamento muscular devido à diminuição do influxo de Ca<sup>2+</sup> e à inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático, que ocorre devido à fosforilação da serina e treonina, promovendo a interação entre a miosina e a actina. O GMPc pode, de maneira alternativa, ativar diretamente canais iônicos, principalmente os de potássio (K<sup>+</sup>), contribuindo para o relaxamento muscular via hiperpolarização das membranas celulares (KUBACKA *et al.*, 2014)

A redução de NO e a disfunção endotelial decorrentes da pós-menopausa podem, também, ocasionar a síntese e liberação de endotelina (ET-1), substância vasoconstrictora, que a liberação e atividade de fatores de crescimento, resultando na hiperplasia da musculatura lisa e na migração para dentro da camada íntima, além do aumento das moléculas pró-inflamatórias (YUAN *et al.*, 2013). No entanto, o estradiol é capaz de reduzir a vasoconstrição dependente da endotelina em artérias coronárias, através da expressão gênica de seus receptores, fato comprovado em mulheres que foram submetidas à reposição hormonal e que demonstraram redução dos níveis séricos de ET-1 e de seus receptores (XING *et al.*, 2009).

Outro possível mecanismo vasodilatador do estrógeno ocorre através da regulação da entrada de cálcio (canais de cálcio) nas células do músculo liso vascular (CHENG *et al.*, 2012). Esse efeito do estrógeno sobre a concentração de cálcio pode ser explicado pelo fato desse hormônio alterar a densidade e a permeabilidade dos canais de Ca<sup>2+</sup> nas células de músculo liso vascular (MLV). Os efeitos do estrógeno sobre a produção de NO podem ser dependentes das concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>), que são aumentados pela ativação dos receptores de membrana, os quais causam, também, a liberação de NO (CERAVOLO *et al.*, 2007).

Além disso, o estrógeno participa do controle da pressão arterial mediado pelos rins, por meio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O E<sub>2</sub> é capaz de promover o aumento dos níveis de renina plasmática e propicia a elevação da expressão gênica e dos níveis séricos de angiotensinogênio. Conseqüentemente, há elevação da concentração de angiotensina I (Ang I) que é convertida por uma enzima, conversora da angiotensina (ECA), produzida nos pulmões, em angiotensina II (Ang II), um agente vasoconstrictor que induz a proliferação da camada vascular. Inclusive, podem ainda existir alterações sobre a vasoatividade, com aumento da atividade do sistema nervoso simpático, levando a um aumento do tônus vascular e da pressão arterial (O'DONELL; FLORAS; HARVEY, 2014).

Esses efeitos do estradiol sobre os vasos poderiam resultar na elevação da pressão arterial, porém, esse hormônio é capaz de inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA). Com isso, ocorre uma significativa redução nos níveis de Ang II, além de incidir em uma maior expressão de receptores de angiotensina tipo 1 (AT-1). A Ang 1-7, por sua vez, apresenta efeitos opostos aos da Ang II, e contribui para uma vasodilatação dependente do NO, além de acionar o reflexo barorreceptor. Assim, os níveis de Ang II e Ang 1-7 são inversamente proporcionais (BUNDALO *et al.*, 2015).

Outrossim, o estrógeno possui ação resultante na proteção cardiovascular, que é a sua participação na manutenção dos níveis adequados de c-HDL e na promoção de vasodilatação arterial por meio da estimulação e da produção de NO. Assim, o efeito protetor do estradiol por meio do NO é atribuído à capacidade de reduzir a granulação e a liberação de mediadores dos mastócitos, reduzir as citocinas, e, por fim, acelerar o mecanismo de reparo das lesões. Dessa maneira, esses aspectos alicerçam o uso da TRH relacionado ao controle pressórico na menopausa (XING *et al.*, 2009; YING-HUI *et al.*, 2012; DOWLING *et al.*, 2013).

## **2.4 Fitoestrógeno e seu papel na reposição hormonal**

Estudos relatam que mulheres na pós-menopausa, portadoras de hipertensão arterial essencial, quando submetidas à reposição com estrogênios, apresentam melhora no quadro hipertensivo. Diante disso, a terapia de reposição hormonal (TRH)

tem sido muito utilizada para reduzir os riscos de doenças cardiovasculares (BABER *et al.*, 2016).

Em 1930, o médico e pesquisador Dr. Serge Voronoff mostrou a necessidade de tratamentos hormonais na menopausa. Seu estudo constituía em transplantes de ovários de macacas em mulheres na pós-menopausa, e após várias mortes, concluiu que os sintomas da pós-menopausa eram devidos a diminuição hormonal e para tratá-los era preciso sintetizar hormônios (LELLOUCH; SEGAL, 2001).

Em 1966, o ginecologista Robert Wilson lançou o best-seller “Femine Forever”, onde a terapia com hormônio sexual feminino sintético não combinado era descrita como a pílula da juventude, em quem toda mulher, independentemente da idade, poderia ter vida sexual segura e satisfatória pelo resto da vida (HOUCK, 2003).

Em meados de 1970, estudos observacionais como o Nurses Health Study (NHS) sugeriu que a terapia com estrógenos em mulheres na pós- menopausa reduzia os riscos de doenças cardiovasculares de 50% para 35% (MANSON; MARTIN, 2001). Assim como, usuárias de TRH apresentaram aproximadamente 33% menos DCV fatal do que aquelas não usuárias (STEFANICK, 2005).

Diversos estudos epidemiológicos avaliando a relação entre a TRH e DCV mostraram evidências de que o tratamento hormonal era benéfico em mulheres na pós-menopausa, reduzindo significativamente a mortalidade por essas doenças (BASSUK e MANSON, 2014).

Estudos também sugerem os efeitos benéficos do estrógeno na vasculatura em humanos e animais, assim como, em tecidos e células. A administração de estrógeno melhorou as respostas vasodilatadoras para acetilcolina em artéria coronária e na isquemia do miocárdio (ROSANO *et al.*, 1993). Além disso, os efeitos benéficos do 17- $\beta$  estradiol demonstrados in vivo e in vitro, promoveram vasodilatação em arteríolas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (DANTAS *et al.*, 1999, 2002; SILVA-ANTONIALLI *et al.*, 2004) e em aorta de ratos DOCA-sal (TOSTES *et al.*, 2000).

Alguns autores sugerem que a TRH possa oferecer proteção cardiovascular quando iniciada no período da peri-menopausa para o pós-menopausa, o que seria denominado “The timing hypothesis”. Modelos de aterosclerose demonstraram que, quando a TRH com estrógeno é iniciada antes da queda dos hormônios ovarianos o desenvolvimento da placa de ateroma é reduzido (PARDINI, 2007; SHERWOOD *et al.*, 2007).

A terapia de reposição estrogênica diminui o risco de enfermidade cardiovascular por melhorar o perfil lipídico (redução dos níveis circulantes de LDL-c e aumento da concentração plasmática de HDL-c), modulação do funcionamento endotelial, síntese de prostaciclina e óxido nítrico e diminuição da agregação plaquetária e de fibrinogênio (MARQUES *et al.*, 2006).

É bem reportado na literatura que a suplementação do estrogênio causa relaxamento em vasos pré-contraídos na ausência do endotélio funcional, incluindo artéria aorta (JIANG, 1991), coronária (MUGGE, 1993) e mesentérica (SHAW, 2000).

Vários mecanismos têm sido propostos para tentar elucidar os efeitos diretos e indiretos do estrógeno no sistema cardiovascular, como por exemplo, redução da pressão arterial e atividade oxidante, alterações no metabolismo lipídico e de depósito do tecido adiposo (TOSTES *et al.*, 2003).

Os efeitos do estrógeno sobre o sistema cardiovascular podem estar relacionados à sua ação direta sobre os vasos sanguíneos reduzindo a pressão arterial (MURPHY; KHALIL, 2000), ação central no sistema nervoso autônomo (SALEH, CONNELL, SALEH, 2000), pela inibição da formação e/ou ação de substâncias vasoconstritoras, como as prostaglandinas (PG) H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) e F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (Dantas *et al.*, 1999) e angiotensina II (TAKEDA-MATSUBARA *et al.*, 2002), ou pela formação de substâncias vasodilatadoras, como óxido nítrico (TOSTES *et al.*, 2003).

Dentre os principais estrógenos produzidos pela mulher está o estradiol (E2), a estrona (E1) e o estriol (E3), sendo a estrona e o estriol (que exibem baixa afinidade pelas isoformas α e β do receptor do estrogênio) produzidos em maior parte no fígado a partir do estradiol e no tecido adiposo a partir androstenodiona, esteróide da supra-renal (DIAS, 2006).

O estrógeno afeta a reatividade vascular através de efeitos diretos nas células endoteliais e parece ser ativo também no músculo liso (FARHAT *et al.*, 1996). Receptores para o estrógeno têm sido identificados tanto no músculo como no endotélio (DANTAS *et al.*, 2002), reforçando a idéia que os estrogênios podem regular a função das células vasculares.

A modulação da função endotelial, em parte, se faz aumentando a liberação de NO e promovendo a vasodilatação. No leito vascular as respostas do estrógeno são mediadas através de seus receptores nucleares (ERα e ERβ) e de membrana (GPR30).

A expressão do ER $\alpha$  destaca-se em tecidos envolvidos no metabolismo da glicose e dos lipídios, como tecido adiposo, fígado e coração e o ER $\beta$  nos demais tecidos, como por exemplo, no epitélio da próstata, testículos, células da granulosa do ovário, da medula óssea, miocárdio e cérebro (LEE; KIM; CHOI, 2012). A respeito do receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER) ou GPR30, são necessários estudos mais aprofundados.

O estrógeno induz a liberação de NO através do receptor ER $\alpha$  mediado por mecanismos genômicos e não genômicos. Este evento ocorre através da ativação da eNOS, como também por aumentar a transcrição do RNAm da eNOS (MENDELSON; KARAS, 2007) e prostaciclina sintase (SIMONCINI *et al.*, 2004).

O ER $\alpha$  funcional é importante para a função vascular normal e influencia a biodisponibilidade de NO independente da concentração de estrógeno circulante (MENDELSON; KARAS, 2007). Dessa forma, a falta prolongada de estrógeno resulta em redução acentuada dos níveis protéicos de ER $\alpha$ , levando a diminuição da sinalização ER $\alpha$ /eNOS.

Os níveis protéicos de ER $\alpha$  estão fortemente relacionados com a dilatação dependente do endotélio e alguns estudos demonstraram uma diminuição em mulheres na pós-menopausa quando comparado com aquelas na pré-menopausa.

A disfunção endotelial e redução do NO na pós-menopausa pode desencadear a síntese e liberação de endotelina (ET-1), substância vasoconstrictora que estimula a liberação e a atividade de fatores de crescimento, resultando em hiperplasia na musculatura lisa, migração para o interior da camada íntima e aumento das moléculas pró-inflamatórias (YUAN *et al.*, 2013). O estradiol é capaz de reduzir a vasoconstrição dependente de ET-1 em artérias coronárias, através da expressão gênica de seus receptores. Mulheres submetidas à reposição hormonal demonstram redução dos níveis séricos de ET-1 e de seus receptores (XING *et al.*, 2009).

O estrógeno pode exercer papel modulatório na atividade e expressão da ciclooxigenase (COX) (DAVIDGE; ZHANG, 1998) e também na geração de ânion superóxido em ratas SHR através da modulação na expressão dos Receptores de Angiotensina do tipo 1 (AT1) (WASSMAN *et al.*, 2000).

Outro provável mecanismo pelo qual o estrógeno pode diminuir a concentração de radicais livres é através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Em modelos de fêmeas SHR, a

retirada dos hormônios ovarianos por ovariectomia acarretou em aumento da concentração de ânion superóxido no leito mesentérico arteriolar isolado. O tratamento das preparações de fêmeas SHR com SOD restaurou a sensibilidade à acetilcolina diminuída pela ovariectomia (DANTAS *et al.*, 2002). Nenhuma alteração de sensibilidade à acetilcolina foi observada em preparações de fêmeas em estro fisiológico, sugerindo uma menor geração de ânion superóxido na presença do estrógeno (DANTAS *et al.*, 1999). Portanto, a reduzida vasodilatação dependente do endotélio é determinante da disfunção endotelial (FURCHGOTT; ZAWARDZKI, 1980).

Resultados de estudos tanto em animais como em mulheres na pós-menopausa reforçam a idéia de que o estrógeno melhora a função do endotélio vascular e aumenta a biodisponibilidade do NO. Dessa forma, a vasodilatação endotélio-dependente, as concentrações plasmáticas de nitrato/nitrito os quais são marcadores da produção de NO, e as respostas vasoconstritoras ao bloqueio agudo da eNOS estão todos aumentados na vasculatura periférica após exposição ao estrógeno (BEST *et al.*, 1998; KAWANO *et al.*, 1997; LIEBERMAN *et al.*, 1994).

Os diversos efeitos adversos dos estrógenos naturais e sintéticos têm limitado seu uso na terapia de reposição hormonal e este fato vem contribuindo para o desenvolvimento de substâncias alternativas, com propriedades benéficas semelhantes aos estrógenos e com menos efeitos colaterais. Dentre estas substâncias alternativas, estão os fitoestrógenos.

Os fitoestrógenos são componentes de plantas polifenólicos não-esteroidais com atividade biológica semelhante à do estrogênio e que se ligam aos receptores de estrógeno humano, exercendo as características do hormônio endógeno. São considerados como uma fonte alternativa para a terapia de reposição hormonal em mulheres durante a menopausa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Estudos demonstram os efeitos benéficos da administração de fitoestrógenos nos distúrbios da pós-menopausa, através da atenuação do declínio da secreção de estrogênio e, conseqüentemente, nos desajustes histomorfológicos e metabólicos (GRINGS *et al.*, 2009). E uma menor incidência de doenças arteriais coronárias e distúrbios em homens e mulheres com deficiências de estrogênio que possuem uma dieta abundante em fitoestrógenos (CHEN; LIN; LIU, 2015).

De acordo com sua estrutura química, os fitoestrógenos podem ser classificados em quatro grupos: isoflavonas, flavonóides, estilbenes e ligninas



(WUTTKE *et al.*, 2002). As isoflavonas são o grupo mais estudado, sendo encontradas primariamente na soja *Glycine max* (L.) Merrill e mais tarde descobertos em outras plantas, como a Mexican Wild Yam (*Dioscorea compósita* (L.)), “red clover” (*Trifolium pratense* (L.)), *Cimicifuga racemosa* (L.), no linho, centeio e outros (EDEN, 2001) (XU *et al.*, 1995). Dentre as principais isoflavonas estão: genisteína, formononetina, biochanina A e daidzeína (BAKHIT; KLEIN; ESSEX-SORLIER, 1994).

É sugerido que principalmente as isoflavonas podem reduzir os efeitos do climatério e suas consequências, com efeitos colaterais reduzidos comparados à terapia hormonal (VERHOEVEN *et al.*, 2005). Em relação aos sintomas da menopausa alguns estudos afirmam que o uso de isoflavonas diminui a ocorrência de ondas de calor (COS *et al.*, 2003); e quanto à hemostasia demonstraram um menor efeito colateral quando comparadas a TRH clássica (RIOS *et al.*, 2008).

Quanto à osteoporose estudos afirmam que as isoflavonas aumentam a densidade óssea através da menor reabsorção óssea. Pessoas em uso de isoflavonas têm menores índices de PTH (paratormônio) e osteocalcina (MEI; YEUNG; KUNG, 2001). Entretanto, já é conhecido que a ingestão de soja e seus metabólitos (genisteína e daidzeína) reduzem os triglicérides e o colesterol total, principalmente pela redução de LDL, e aumentam o HDL (NESTEL *et al.*, 1997; WASHBURN *et al.*, 1999; MERRITT, 2004).

O efeito cardioprotetor dos alimentos com soja contendo isoflavonas é mediada pela eliminação de radicais livres e propriedade antioxidante, que podem ocorrer devido à configuração do grupo hidroxila no anel B, que doa hidrogênio e elétrons para radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito para que ocorra a estabilização e origine um radical flavonóide relativamente estável (MESSINA, 2014).

## **2.5 Diosgenina: uso, estudos farmacológicos e biotecnológicos**

Dentre a gama de fitoestrógenos existentes, a Diosgenina, 3 $\beta$ -hidroxil-5-spirostene, ganha destaque, pois é uma sapogenina esteroidal com peso molecular de 414 presente em várias espécies do gênero (*Dioscorea*), dentre elas, (*Dioscorea caynensis*), (*Dioscorea compósita*) e (*Dioscorea dodecaneura*), sendo essa última conhecida popularmente como inhame, uma raiz bastante consumida no nordeste brasileiro (AU *et al.*, 2004, DIAS *et al.*, 2006).

Com estrutura semelhante à progesterona e ao estradiol, esse fitoestrógeno é utilizado como precursor químico na preparação industrial de muitos esteróides sintéticos, inclusive pílulas anticoncepcionais orais, e corresponde a cerca de 50% da matéria-prima utilizada na produção de cortisona, progesterona e noretisterona (RAJU *et al.*, 2009).

Por não conseguir ser sintetizada ou convertida em esteróides no organismo, a Diosgenina é considerada segura (RAJU; BIRD, 2007). Além disso, estudos mostram que o fitoesteróide em questão não causa toxicidade sistêmica, genotoxicidade e, possivelmente, não possui atividade estrogênica muito significativa. Outrossim, a Diosgenina tem sido objeto de estudos a respeito da atividade antineoplásica e apoptótica, a exemplo, um estudo utilizando células de carcinoma epidermóide de pele *in vitro* e tumores de sarcoma *in vitro*, onde a Diosgenina inibiu a proliferação celular e a citotoxicidade induzida em células epidermóides cancerosas humanas (HEp-2) e células tumorais da linhagem A431. Com isso, a ativação de caspases, clivagem da enzima poli-(ADP-ribose)-polimerase-1 (PARP-1), um importante alvo terapêutico contra o câncer, foram observadas nas células tratadas. Ainda, a Diosgenina pode inibir a fosforilação das vias da proteína quinase B/Akt, inibindo a proliferação celular, enquanto induz a apoptose (DAS *et al.*, 2012).

A Diosgenina tem como característica importante a sua vasta aplicação terapêutica em diversas áreas. Com isso, em alguns países, alimentos naturais contendo Diosgenina foram divulgadas como sendo eficientes no tratamento de doenças como osteoporose e tensão pré-menstrual em mulheres, possivelmente devido à sua potencial ação estrogênica (NOGUCHI *et al.*, 2006). Diante disso, estudos apontam que esse fitoestrógeno possui ação sobre a formação óssea e reabsorção conjuntamente. Segundo ZHANG *et al.* (2014), a Diosgenina possui efeito inibitório sobre a perda óssea induzida pela regressão de estrogênio ocasionada pela ovariectomia.

Outra ação da Diosgenina é seu efeito vasodilatador, podendo estar relacionado ao endotélio, especificamente ao fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE), como o NO, as cicloxigenases (COX) e derivados, além da ativação de canais de potássio dependente de cálcio (BKca). Porém, a participação da Diosgenina nos mecanismos de vasodilatação independentes do endotélio ainda não está esclarecida (DIAS *et al.*, 2007).

Além da sua eficiência no combate a várias doenças metabólicas, a diosgenina, também apresenta atividade antibacteriana, antiviral (WANG *et al.*, 2011), antifúngica, antiinflamatória e antitumoral (PATEL *et al.*, 2012), através de diferentes mecanismos/alvos.

Outrossim, estudos demonstram que a Diosgenina estimula o crescimento da glândula mamária em ratas ovariectomizadas, assim como causa relaxamento agudo na artéria coronária de porcos, podendo, futuramente, beneficiar pacientes com obstrução coronariana. Além disso, os glicosídeos da Diosgenina alteram as atividades mecânicas do miocárdio, provavelmente, por meio da modulação do fluxo de cálcio extracelular através da membrana plasmática (AU *et al.*, 2004).

A Diosgenina possui várias atividades farmacológicas, como ação hipocolesterolêmica em ratos (JUAREZ OROPEZA *et al.*, 1987), o retardo da progressão da osteoporese (HUGHES *et al.*, 2001) e possui efeito relaxante independente do endotélio em artéria coronária de porco via sinalização da cascata da proteína cinase G (PKG) e ativação do canal BKcálcio (AU *et al.*, 2004).

Ainda, a Diosgenina induz efeito vasorrelaxante dependente do endotélio vascular em anéis mesentéricos de ratos normotensos, mediado pela liberação de óxido nítrico através da ativação de receptores muscarínicos e uma possível ativação de canais para K<sup>+</sup> sensíveis à voltagem (K<sub>v</sub>), sensíveis ao ATP (K<sub>atp</sub>) e sensíveis ao cálcio de larga condutância (BKCa<sup>2+</sup>), segundo DIAS (2006), além de efeitos relaxantes independentes do endotélio funcional envolvendo o bloqueio dos canais para Ca<sup>2+</sup> operados por voltagem nas maiores concentrações (1 e 2 mM) e a inibição da liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares sensíveis a trifosfato de inositol (IP3) e cafeína nas menores concentrações (2x10<sup>-6</sup> M-7x10<sup>4</sup> M).

Dias, ainda em 2006, concluiu, por meio de uma avaliação de toxicidade aguda da Diosgenina em grupos de camundongos machos e fêmeas, que, na dose de 100 mg/kg via veia caudal, a Diosgenina não provocou nenhuma alteração macroscópica ou no peso dos órgãos vitais avaliados: coração, fígado e rim, durante 14 dias de observação. Além disso, esse fitoestrógeno parece não apresentar nenhuma arividade toxica na dose testada, pois, durante as 72 horas após sua administração, na dose supracitada, não foi observada a morte de nenhum camundongo.

Além disso, a diosgenina natural mostrou importante efeito antioxidante e cardioprotetor (MESSINA, 2014). Contudo, novas formulações terapêuticas de uso oral são propostas a fim de superar os inconvenientes farmacocinéticos. Por outro lado, um obstáculo encontrado no uso da diosgenina é a reduzida biodisponibilidade quando administrada por via oral, devido à baixa solubilidade que ela apresenta em meio aquoso, o que dificulta sua formulação farmacêutica (ROGALSKI *et al.*, 2013; BEIG *et al.*, 2013). Uma das alternativas é o uso da nanobiotecnologia, a fim de melhorar a diluição de moléculas apolares em meio aquoso e proporcionar um sistema de liberação direcionado para o sítio da doença, tornando a diosgenina uma aliada em potencial no tratamento de distúrbios cardiovasculares, a exemplo da hipertensão arterial (GUEDES *et al.*, 2008).

A solubilidade é um fator importante na comercialização de fármacos, uma vez que é determinante para a biodisponibilidade e perfil terapêutico, devendo ser um parâmetro essencial no processo de seleção de candidatos a novos medicamentos (LIMA *et al.*, 2008).

A taxa de solubilidade e dissolução dos ingredientes ativos são de fundamental importância em estudos de preformulação das formas farmacêuticas. (SOARES-SOBRINHO *et al.*, 2010b). Para que um medicamento seja absorvido, deve estar presente na forma de uma solução aquosa no local da absorção. Se determinado fármaco é insolúvel ou muito pouco solúvel, tal propriedade coloca-se como um problema na dissolução e absorção. Assim, a solubilidade aquosa de fármacos é de importância central na descoberta e desenvolvimento de medicamentos, desde a concepção molecular até a formulação farmacêutica (FENICAL *et al.*, 2009).

Na indústria farmacêutica, as ciclodextrinas têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes, por aumentar a solubilidade, dissolução dos fármacos pouco solúveis, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, além de prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; GUEDES *et al.*, 2009).

Dados publicados por Pretis *et al.* (1988), demonstraram que aproximadamente 40% dos fármacos em desenvolvimento eram retirados da pesquisa devido à problemas com a característica biofarmacêutica, ocasionados por deficiência de solubilidade. Neste panorama justifica-se a vetorização com sulfo-butil- $\beta$ -ciclodextrina,

visando melhorar os problemas de biodisponibilidade deste fármaco sintético, promovendo um perfil terapêutico desejável.

Contudo, já pode-se afirmar que esta molécula vem, de alguma forma, ampliar o arsenal terapêutico disponível contra as doenças que acometem a população humana, uma vez que em triagens farmacológicas, mostrou-se uma molécula promissora para tratamento de doenças, em que muitas vezes a terapêutica é tóxica, sendo objeto de interesse de diversos estudos.

## REFERÊNCIAS

AU, A. L. S.; KWOK, C. C.; LEE, A. T. C.; KWAN, Y. W.; LEE, M. M. S.; ZHANG, R. Z.; NGAI, S. M.; LEE, S. M. Y.; HE, G. W.; FUNG, K. P. **Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by Diosgenin.** European Journal of Pharmacology, v. 502, p. 123-133, 2004.

AMODEO, C.; HEIMANN, J.C. **Endotélio e Hipertensão Arterial Sistêmica: mecanismo de lesão / novo alvo terapêutico?** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, v. 13, n.1, 2003.

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.

AZAMBUJA, M.; FOPPA, M.; MARANHÃO, M. F. C.; ACHUTTI, A. C. **Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.91, n.3, p.148-155, 2008.

BABER, R. J., PANAY, N., e FENTON, A. **2016 IMS Recommendations on women's midlife health and menopause hormone therapy.** 2016.

BACELAR-ANTUNES, A. **Como viver a sua menopausa.** Gondomar: Xerezade, 2005.

BACHMANN, G., e SANTEN, R. **Clinical manifestations and diagnosis of genitourinary syndrome of menopause (vulvovaginal atrophy).** 2016.

BALU, S.; THOMAS, J. **Incremental expenditure of treating hypertension in the united states.** American Journal of Hypertension, v.19, p.810-816, 2006.

BASSAM, R. **Alterações Cardiovasculares e Cardiomorbidade da Menopausa. Efeitos da Reposição Hormonal.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 72, p. 85-91, 1999.

BASSUK, S. S., e MANSON, J. E. **Menopausal Hormone Therapy and Cardiovascular Disease Risk: Utility of Biomarkers and Clinical Factors for Risk Stratification**. *Clinical Chemistry*, v. 60, n. 1, p. 68–77, 2014.

BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. **Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage**. *Journal Clinical Investigation*, v. 90; p. 278–281. 1992.

BAYLIS, C.; ZATZ, R. M. **Chronic nitric oxide inhibition model six years on**. *Hypertension*, v. 32; p. 958–964. 1998.

BEIG, A.; AGBARIA, R.; DAHAN, A. **Oral Delivery of Lipophilic Drugs: The Tradeoff between Solubility Increase and Permeability Decrease When Using Cyclodextrin-Based Formulations**. *PLoS One*, v. 8, n. 7, 2013.

BHAVNANI, B. R.; CECUTTI, A.; GERULATH, A.; WOOLEVER, A. C.; BERCO, M. **Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women**. *Menopause*, v. 8, n. 6, p. 408-19, 2001.

BOARDMAN, H. M. P., HARTLEY, L., EISINGA, A., MAIN, C., ROQUÉ I FIGULS, M., BONFILL COSP, X.; KNIGHT, B. **Hormone therapy for preventing cardiovascular disease in post-menopausal women**. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 3, n. 3, 2015.

BUNDALO, M; ZIVKOVIC, M; TEPAVCEVIC, S; CULAFIC, T; KORICANAC, G ; STANKOVIC, A. **Fructose-Rich Diet-Induced Changes in the Expression of the Renin Angiotensin System Molecules in the Heart of Ovariectomized Female Rats**. *Could be Reversed by Estradiol Hormone and Metabolic Research*. V. 47, n. 7, p. 521-7, 2015.

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

CARDIOLOGIA, S. B. D.; NEFROLOGIA, S. B. D. **V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial**, 2006.

CERAVOLO, G.S; FERNANDES, L; MUNHOZ, C.D; FERNANDES, D.C; TOSTES, R.C; LAURINDO, F.R; SCAVONE, C; FORTES, Z.B; CARVALHO, M.H. **Hypertension**. V. 50, n. 4, p. 756-61, 2007.

CESARINO, C.B. *et al.* **Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto – SP**. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, São Paulo, v. 91, n. 1, 2008.

CHENG, J; ZENG, X.R; LI, P.Y; LU, T.T, TAN, X.Q; WEN, J; YANG, Y. **[β-estradiol activates BK(Ca) in mesenteric artery smooth muscle cells of post-menopause women]**. *Sheng Li Xue Bao*. V. 25, n. 2, p.121-8, 2012.

COLEMAN, T. G.; MANNING, R. D. Jr.; NORMAN, R. A. Jr.; DECHEE, J. **The role of the kidney in spontaneous hypertension.** American Heart Journal, v. 89, p. 94-98, 1994.

CONEY, P. **Menopausa.** 2016

DAS, S.; DEY, K. K.; DEY, G.; PAL, I.; MAJUMDER, A.; MAITICHOUDHURY, S.; KUNDU, S. C.; MANDAL, M. **Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma.** Plos One, v. 7, n. 10, p. 46641, 2012.

DE GASPARO, M.; HESS, P.; CLOZEL, M.; PERSOHN, E.; ROMAN, D.; GERMANN, P. G. **Combination of low-dose valsartan and enalapril improves endothelial dysfunction and coronary reserve in Noreginitro-L-arginine methyl ester-treated spontaneously hypertensive rats.** Journal Cardiovascular of Pharmacology; v. 40, p. 789-800. 2002.

DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. **Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance.** Circulation. v. 115, p. 1285–1295. 2007.

DIAS, KATY LÍSIAS GONDIM. **Avaliação da atividade cardiovascular de fitoestrógenos e caracterização do mecanismo de ação de Diosgenina em ratos: estudos in vivo e in vitro.** Tese doutorado - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 115, 2006.

DOUGLAS, P., e POPPAS, A. **Overview of cardiovascular risk factors in women.** Retrieved from [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com), 2016.

DOWLING, Maritiza et al. **Characterization of vascular disease risk in postmenopausal women and its association with cognitive performance.** PLoS One. V. 17, n. 7, 2013.

EAKER, E. D.; CHESEBRO, J. H.; SACKS, F. M.; WENGER, N. K.; WHISNANT, J. P.; WINSTON, M. **Cardiovascular disease in women.** Circulation, v. 88, p. 1999-2009, 1993.

FENICAL W, JENSEN PR, PALLADINO MA, LAM KS, LLOYD GK, POTTS BC. **Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052).** Bioorg Medical Chemistry, v. 17, p. 2175–80, 2009.

FIALOVÁ, M; DLUGOŠOVÁ, K; OKRUHLICOVÁ, L.; KRISTEK, F.; MANOACH, M.; TRIBULOVÁ, N: **Adaptation of the heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodelling.** Physiology Research, v. 56, 2007.

FOLKOW, B.; **Physiological aspects of primary hypertension.** Physiologic Reviews. v. 62, p. 347-504, 1982.

GONZALEZ, W.; FONTINE, V.; PUEYO, M. E.; LAQUAY, M.; MESSIKA-ZEITOUN, D.; PHILIPPE, M. **Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals.** Hypertension, v.3, p.103-09. 2000.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J. L.; MARTÍNEZ-LARRAD, M. T.; SÁEZ, M. E.; ZABENA, C.; MARTÍNEZ-CALATRAVA, M. J.; SERRANO-RÍOSA, M. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with features of metabolic syndrome. **Clinical and Chemical**, v.53, p.91–97, 2007.

GUEDES FL, ALVES GMC, SANTOS FLA, LIMA LF, ROLIM LA, ROLIM NETO PJ. **Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos.** Revista Brasileira Farmacologia, v. 89, n. 3, p. 220-5, 2009.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM NETO, P.J. **Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos.** Revista Brasileira Farmacologia, v. 89, n. 3, p. 220-225, 2008.

HAGE, F. G; MANSUR, S. J; XING, D; OPARIL, S. **Hypertension in women.** *Kidney International Supplements*. V. 3, p. 352–356, 2013.

HIPERDIA - **Sistema de cadastramento e acompanhamento de hipertensos e diabéticos.** Ministério da Saúde. <http://hiperdia.datasus.gov.br/> Acesso em 04/01/2016.

HUGHES, J. **The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting asa novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model.** Biomedical Sciences Instrumentation, v. 37, p. 281-286, 2001.

IGNACIO, D. L; FRANKENFELD, T. G. P; FORTUNATO, R.S; VAISMAN, WERNECKDE-CASTRO, J. P. S; CARVALHO, D. **Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física.** Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. V. 53, n. 3, 2009.

IRIGOYEN M.C.; FIORINO P.; DE ANGELIS K.; KRIEGER E.M. **Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios.** Revista Brasileira de Hipertensão v.12, n. 4, p. 229-233, 2005.

IRIGOYEN, M. C. *et al.* **Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos?** Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão, v. 13, n. 1, 2003.

IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. **Controle fisiológico da pressão arterial pelo sistema nervoso.** Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão, v. 8, n. 1, p. 6-10, 2005.

JUAREZ-OROPEZA, M. A.; DIAZ-ZAGOYA, J. C.; RABINOWITZ, J. L. **In vivo and in vitro studies of hypocholesterolemic effects of diosgenin in rats.** International Journal of Biochemistry, v. 19, p. 679-683, 1987.



KAPLAN, N. M. Systemic Hypertension: **Mechanisms and Diagnosis IN Braunwald, Zipes, Libby** – Heart Disease, a textbook of Cardiovascular Medicine – Cap 28, p. 958-60, 2001.

KHALIL, R. A. **Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease**. Biochemical Pharmacology, v. 86, p. 1627-1642, 2013.

KNOWLTON, A.A; KORZICK, D.H. **Estrogen and the female heart**. *Molecular and Cellular Endocrinology*. V. 389, p. 31–39, 2014.

KRUMMEL, D. **Nutrition in hypertension**. In: Mahan LK, Escott-Stump S, eds. **Krause's food nutrition diet therapy**. Pennsylvania: Saunders. p.596-10. 2002.

KUBACKA, M; MOGILSKI, S; BEDNARSKI, M; RAŻNY, K; SAPA, J; WASZKIELEWICZ, A.M; MARONA, H; FILIPEK, B. **The nitric oxide/soluble cyclic guanylate/cyclic guanosine monophosphate pathway is involved in the cardiovascular effects of a novel  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenoceptor antagonist**. *Pharmacology*. V. 94, n.5-6, p. 287-95, 2014.

LE, T.P; SUN, M; LUO, X; KRAUS, W.L; GREENE, G.L. **Mapping ER $\beta$  Genomic Binding Sites Reveals Unique Genomic Features and Identifies EBF1 as an ER $\beta$  Interactor**. *PLoS One*. 2013.

LEE, H; KIM, T; CHOI, K. **Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse**. *Laboratory Animal Research*; v. 28, n. 2, p. 71–76, 2012.

LIMA, A. A. N.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; CORREA JUNIOR, R. A. C.; ROLIM NETO, P. J. **Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs**. *Acta Farmacologia Bonaerense*; v. 27, p. 789-797, 2008.

LIMA, S. M. R. R.; ALDRIGHI, J. M.; COLOMBO, F. C.; GEORGI, D. M. A. Hipertensão arterial e climatério. **Hipertensão**, v. 4, n. 2, p. 51-4, 2001.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R. J.; BROWN, T.M. *et al*. **Heart disease and stroke statistics - 2010 update: a report from the American Heart Association**. *Circulation*, v. 121, p. 46-215, 2010.

LOFTSSON, T., VOGENSEN, S.B., BREWSTER, M.E., KONRÁDSDÓTTIR, F. **Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes**. *J. Pharmacology Science*; v. 96, p. 2532–2546, 2007.

LOTUFO, P.A.; LOLIO, C.A. **Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil**. In: **SOCEPS CARDIOLOGIA**. São Paulo: Atheneu, v. 2, 1996.

MATSUI, Y.; EGUCHI, K.; O'ROURKE, M. F.; et al. **Differential effects between a calcium channel blocker and a diuretic when used in combination with**

**angiotensin II receptor blocker on central aortic pressure in hypertensive patients.** *Hypertension*; v.54, p.716–723. 2009.

MAYRA, P.R, ROSALINA, V.L; LÓPEZ, G; IRURETAGOYENA, J; MAGNESS, R. **Regulation of uterine blood flow. II. Functions of estrogen and estrogen receptor  $\alpha/\beta$  in genomic and non-genomic actions of the uterine endothelium.** *Revista Chilena de Obstetricia e Ginecología*, v.79, n. 3, p. 218-228, 2014.

MEIN, C. A.; CAULFIELD, M. J.; DOBSON, R. J.; MUNROE, P. B. **Genetics of essential hypertension.** *Human Molecular Genetic*, v.13, p.169–175, 2004.

MEIRELLES, R. M. **Menopause and metabolic syndrome.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologista*, v. 58, n. 2, p. 91-6, 2014.

MENDES, K., THEODORO, H., RODRIGUES, A., e OLINTO, M. **Prevalência de síndrome metabólica e seus componentes na transição menopáusicas: uma revisão sistemática.** *Cad Saúde Pública*, v. 28, n. 8, p. 1423–1437, 2012.

MENDONÇA, L.DE S; FERNANDES-SANTOS, C; MANDARIM-DE-LACERDA,C.A. **Cardiac and aortic structural alterations due to surgically-induced menopause associated with renovascular hypertension in rats.** *International Journal of Experimental Pathology*; v. 88, n. 4, p.301-9, 2007.

MESSINA, M. **Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 1, p. 423-430, 2014.

MICHEL, T; HALABALAKI, M; SKALTSOUNIS, A.L. **New Concepts, Experimental Approaches, and Dereplication Strategies for the Discovery of Novel Phytoestrogens from Natural Sources New Concepts, Experimenta.** *Planta Med*; v. 79, p. 514–532, 2013.

MILEWICZ, A; KRZYŻANOWSKA-ŚWINIARSKA,B; MIAZGOWSKI, T; JĘDRZEJUK, D; ARKOWSKA, A; MIESZCZANOWICZ, U; BAR-ANDZIAK, E. **The reference values of sex hormones and SHBG serum levels in subjects over 65 years old.** *The PolSenior Study. Endokrynologia Polska*; v. 64, n. 2, p.82-93, 2013.

MONTEIRO, F. S.; SILVA A. C. L.; MARTINS I .R. R.; CORREIA A. C. C.; BASÍLIO I. J. L. D.; AGRA M.F.; BHATTACHARYYAB J.; SILVA B.A. **Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels.** *Journal Ethnopharmacol*; v. 141, n. 3, p. 895-900, 2012.

NADA, T.; NOMURA, M.; KOSHIBA, K.; et al. **Clinical study with azelnidipine in patients with essential hypertension. Antiartherosclerotic and cardiac hypertrophy-inhibitory effects and influence on autonomic nervous activity.** *Arzneimittelforschung*, v.57, p.698–704. 2007.

NAGAI, M.; HOSHIDE, S.; ISHIKAWA, J.; et al. **Ambulatory blood pressure as an independent determinant of brain atrophy and cognitive function in elderly hypertension.** *Journal of Hypertensive*, v.26, p.1636–1641. 2008.

NEJATIZDEH, A; KUMAR, R; STOB DAN, T; GOYAL, A. K; SIKDAR, S; GUPTA, M; JAVED, S; PASHA, M. A. Q. **Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and circulating nitric oxide levels significantly associate with risk of essential hypertension.** *Free Radical Biology e Medicine*, v.44, p.1912–1918, 2008.

NEVES-E-CASTRO, M., BIRKHAUSER, M., SAMSIOE, G., LAMBRINOUDAKI, I., PALACIOS, S., BORREGO, R. S.; REES, M. **EMAS position statement: The ten point guide to the integral management of menopausal health.** *Maturitas*, v. 81, n. 1, p. 88–92., 2015.

NOGUCHI, E.; FUJIWARA, Y.; MATSUSHITA, S.; IKEDA, T., *et al.* **Metabolism of tomato steroidal glycosides in humans.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 54, p. 1312, 2006.

O'DONNELL, E; FLORAS, J.S; HARVEY, P.J. **Estrogen status and the renin angiotensin aldosterone system.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* V. 307, n.5, p.498-500, 2014.

OGIHARA, T.; KIKUCHI, K.; MATSUOKA, H. **For the Japanese Society of Hypertension Committee. The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension.** *Hypertension Research*, v.32, p.3–107. 2009.

OGIHARA, T.; MATSUZAKI, M.; MATSUOKA, H.; SHIMAMOTO, K.; SHIMADA, K.; RAKUGI, H. **The combination therapy of hypertension to prevent cardiovascular events (COPE) trial: rationale and design.** *Hypertension Research*, v.28, p.331–8. 2005.

OKRUHLICOVÁ, L.; TRIBULOVÁ, N.; BERNÁTOVÁ, I.; PECHÁNOVÁ, O: **Induction of angiogenesis in NO-deficient rat heart.** *Physiology Research*, v. 49, p. 71-76, 2000.

ONO, H.; ONO, Y.; FROHLICH, E. D. **Nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. Systemic, renal, and glomerular hemodynamics.** *Hypertension*; v.26, p.249-55. 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Investigaciones sobre la menopausia em los años noventa. (Serie de Informes Técnicos, Nº 866).** (GENERIC) Ref Type: Conference Proceeding. Ref ID: 132, 2015.

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

PAGE, I.H. **Hypertensive mechanisms.** Grune Stratton, 1987.

PRETIS, R.A.; LIS, Y.; WALKER, S.R. **Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985)**. Br. Journal Clinical and Pharmacology, v. 25, p. 387-396, 1988.

RAJU, J.; BIRD, R. P. **Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells**. Cancer letters, v. 255, p. 194-204, 2007.

RAJU, J.; MEHTA, R. **Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin**. Nutricion and Cancer, v. 61, p. 1, p. 27-35, 2009.

RAMOS, L.; LABAT, R.; AIMBIRE, S. F.; CARVALHO, A. B. M.; LOPES, R. Á. B. **Efeito da administração oral de arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico**. Revista Brasileira de Medicina e Esporte, v.12, n. 4, 2006.

RECKELHOFF, J. F. **Gender differences in the regulation of blood pressure**. Hypertension, v. 37, p. 1199-1208, 2001.

RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. **Chronic Inhibition Of Nitric Oxide Synthesis. A New Model of Arterial Hypertension**. Hypertension, v. 20, p. 298–303. 1992.

ROGALSKI, M.; MODARESSI, A.; MAGRI, P.; MUTELET, F.; GRYDZIUSZKO, A. A.; WLAZŁO, M.; DOMAŃSKA, U. **Physico-Chemical Properties and Phase Behavior of the Ionic Liquid- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes**. International Journal of Molecular Sciences. V. 13; n.14, n. 8, 2013.

SAFAR, M. E.; PERONNEAU, P.P.; LEVENSON, J.A.; TOTO-MOUKOUO, J. A. e SEAMON, K. B.; PADEGETT, W.; DALY, J. W. **Forskolin: unique diterpene activator of adenilate ciclase in membranes and intact cells**. Product Natural Academic. Science, v.78, p. 3363 – 3367, 1981.

SARAVANAKUMAR, M.; RAJA, B. **Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats**. European Journal of Pharmacology, v. 671, p. 87–94, 2011.

SHI-HUA, F. *et al.* **Relationship between Female Menopause and Hypertension/Isolated Systolic Hypertension in Rural Districts of Hanzhong in Shaanxi Province**. Yi Xue Ke Xue Xue Yuan Bao, v. 35, n. 4, p. 422-426, 2013.

SOARES SOBRINHO, J. L.; SOARES, M. F. L. R.; ROLIM NETO, P. J.; LABANDEIRA, J. J. T. **Physicochemical Study of Solid State Benzimidazole-Cyclodextrin Complexes**. Journal Thermic Analogy and Calorimetric; v. 10, p. 10973-010, 2010.

SOCIEDADE AMERICAVA DE CARDIOLOGIA. **Jornual American College of Cardiology**, v. 71, p 15-115, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 95, p. 1-51, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Cardiometro**. 2018.

SPG. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. **Conselho Nacional sobre Menopausa 2016**. Portugal, 2017.

STAESSEN, J. A.; WANG, J.; BIANCHI, G.; BIRKENHÄGER, W. H. **Essential hypertension**. Lancet, v.361, p.1629–1641, 2003.

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

TAO, Q; FAN, X; Li, T; TANG, Y; YANG, D; LE, W. **Gender Segregation in Gene Expression and Vulnerability to Oxidative Stress Induced Injury in Ventral Mesencephalic Cultures of Dopamine Neurons**. Journal of Neuroscience Research; v. 90, p.167–178, 2012.

WHELTON, P. K.; CAREY, R. M.; ARONOW, W. S. *et al.* **Diretriz para a prevenção, detecção, avaliação e controle da pressão arterial elevada em adultos: um relatório do American College of Cardiology/ Força tarefa Americana da associação do coração sobre diretrizes de prática clínica**. Journal American College of Cardiology, v. 71, p 15-115, 2017.

WIDLANSKY, M.E. *et al.* **The clinical implications of endothelial dysfunction**. Journal American College Cardiology. v.42, p.1149–1160. 2003.

XING, D.; NOZELL, S.; CHEN, Y.; HAGE, F.; OPARIL, S. **Estrogen and Mechanisms of Vascular Protection**. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2009.

YI, H. *et al.* **17 $\beta$ -estradiol antagoniza a sub-regulação de E $\alpha$  / nos -3 sinalização na disfunção endotelial vascular de ratos diabéticos fêmea**. PLoS One, 2012.

YIM, S. F.; LAU, T. K.; SAHOTA, D. S.; CHUNG, T. K.; CHANG, A. M.; HAINES, C. J. **Prospective randomized study of the effect of “add-back” hormone replacement on vascular function during treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists**. Circulation, v. 98, p. 1631-1635, 1998.

YING – HUI. **Gao et al, Chronic intermittent hypoxia aggravates cardiomyocyte apoptosis in rat ovariectomized model**. Chinese Medical Journal; v. 125, n. 17, p. 3087-92, 2012.

YOON, N.; LTEIF. A. A.; HAN, H.; MATHER, K. J. **Endothelin contributes differently to peripheral vascular tone and blood pressure in human obesity and diabetes**. Journal of the American Society of Hypertension, v. 2, p.182–191, 2008.

YUAN, P; WU, W.H, GAO, L; ZHENG, Z.Q; LIU, D; MEI, H.Y; ZHANG, Z.L; JING, ZC. **Oestradiol ameliorates monocrotaline pulmonary hypertension via NO, prostacyclin and endothelin-1 pathways.** European Respiratory Journal; v.41, n. 5, p.1116-25, 2013.

ZHANG, D. M.; CHAI, Y.; ERICKSON, J. R.; BROWN, J. H.; BERS, D. M.; LIN, Y. F. **Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes.** Journal of Physiology, v. 592, p. 971–990, 2014.

ZHOU, E. S.; FALK, S. J.; BOBER, S. L. **Managing premature menopause and sexual dysfunction.** Current Opinion in Supportive and Palliative Care, 2015.

# *Objetivos*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- ❖ Investigar os efeitos do fitoestrógeno diosgenina e do complexo Diosg/ $\beta$ -CD sobre o sistema cardiovascular em ratas OVX e OVX/L-NAME, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos farmacológicos observados.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Realizar uma prospecção científica e tecnológica para estabelecer o estado da arte do fitoestrógeno Diosg/ $\beta$ -CD;
- ❖ Desenvolver e caracterizar o complexo nanoestruturado com Diosg/ $\beta$ -CD;
- ❖ Determinar o potencial toxicológico do Diosg/ $\beta$ -CD através do estudo da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>);
- ❖ Apurar o efeito trombolítico do Diosg/ $\beta$ -CD em ratas.
- ❖ Avaliar o efeito da administração oral aguda de diosgenina e Diosg/ $\beta$ -CD sobre o sistema cardiovascular de ratas OVX e OVX/L-NAME;
- ❖ Verificar a influência do modelo OVX na reatividade vascular;
- ❖ Caracterizar a resposta vasorrelaxante induzida por Diosgenina em anéis de artéria aorta isolada de ratas OVX, com endotélio funcional e endotélio removido;
- ❖ Analisar a participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio no efeito induzido por Diosgenina;
- ❖ Analisar a participação dos canais para cálcio sensíveis a voltagem na resposta vascular induzida por Diosgenina.



## **CAPÍTULO I**

**Atividade da Diosgenina e seu derivado  
nanoestruturado sobre o sistema  
cardiovascular: uma prospecção tecnológica e  
científica**

**Diosgenina activity and its nanostructured  
derivative on the cardiovascular system: a  
technological and scientific prospect**

Artigo submetido na revista **Expert Opinion on  
Therapeutic Patents**

**Qualis: A1 - Biotecnologia**

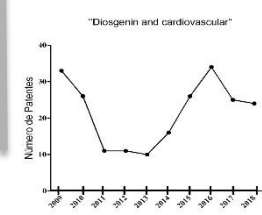
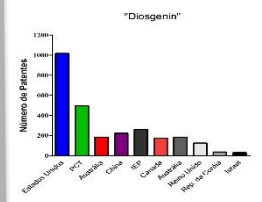
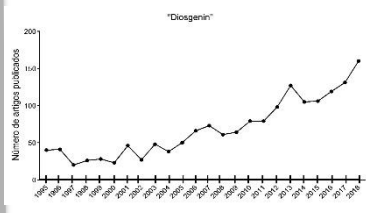
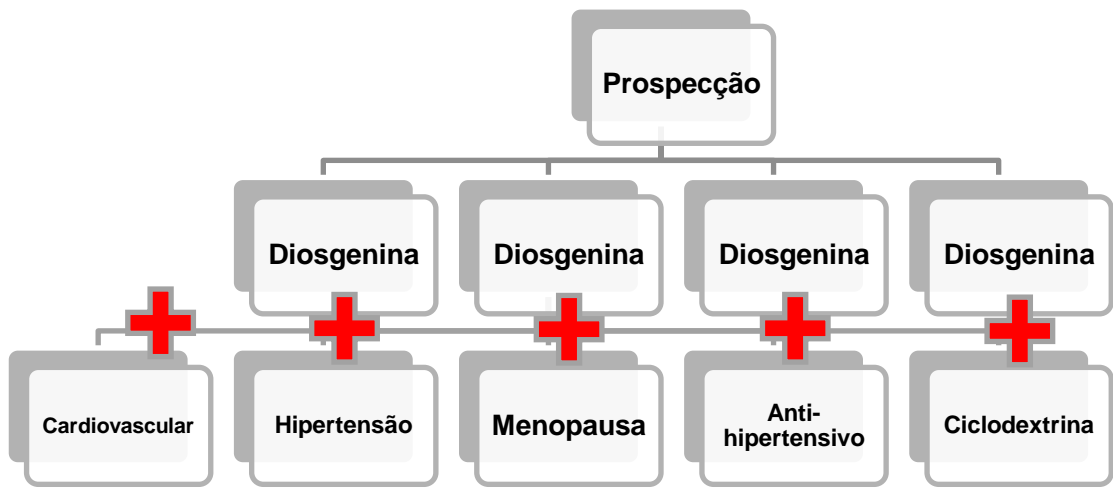
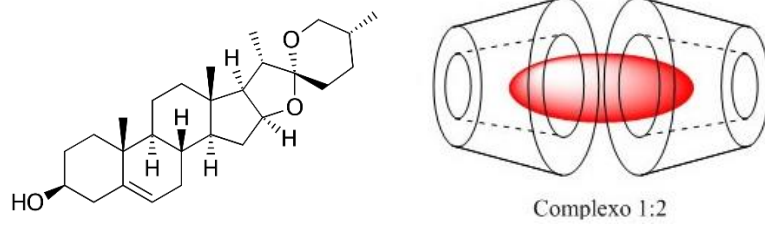
## **Atividade da Diosgenina e seu derivado nanoestruturado sobre o sistema cardiovascular: uma prospecção tecnológica e científica**

### **RESUMO:**

Nos últimos anos, a síntese de novas moléculas e a modificação molecular de substâncias naturais e sintéticas com propriedades farmacológicas definidas têm sido o método de escolha na obtenção de novas drogas. Os óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Solaun* e *Dioscorea* são ricos em sapogeninas esteroides, dentre eles a diosgenina, são de grande importância nas indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica. Além disso, a diosgenina natural mostrou importante efeito antioxidante e cardioprotetor. O objetivo do trabalho foi realizar um mapeamento abordando a atividade da diosgenina sobre o sistema cardiovascular em bases de dados de patentes e de artigos científicos. Foi analisado que a maioria das patentes e artigos com este tema são escritos em inglês e que os países com maior volume de pesquisa a respeito são os Estados Unidos e Canadá. O Brasil possui poucas pesquisas relacionadas com a atividade cardiovascular da diosgenina. Entre as patentes publicadas, nenhuma correlaciona diretamente o uso da diosgenina para fins cardiovasculares na menopausa.

**Palavras-Chave:** diosgenina, cardiovascular, hipertensão, menopausa, ciclodextrina

# Resumo Gráfico



## 1 INTRODUÇÃO

O uso das espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças e alívio de sintomas se perpetuaram na história da civilização e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte terapêutica (BEIG *et al.*, 2013). Muitos produtos de plantas medicinais têm sido utilizados popularmente para o tratamento de diversas patologias relacionadas ao sistema cardiovascular, tais como hipertensão, aterosclerose e diabetes mellitus. (SILVA-FILHO *et. al.*, 2011).

Considerando a diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas brasileiros, a sua importância reconhecida no tratamento de doenças, e sabendo-se que as patologias cardiovasculares são as principais causas de morte a nível mundial (SHI-HUA *et al.*, 2010), fica notória a necessidade de busca de novas substâncias com atividades sobre o músculo liso vascular. Tal fato reforça a crescente investigação do potencial terapêutico de plantas medicinais, em que alguns de seus metabólitos secundários, como flavonóides (DIAS, 2007), alcaloides, esteróides e outros compostos dos óleos essenciais (CHENG *et al.*, 2012) têm apresentado atividade vasorrelaxante, sendo objetos de interesse para o estudo da farmacologia cardiovascular. Um exemplo disto é a reserpina, um alcalóide isolado da espécie *Rauwolfia serpentina* em 1953, que revolucionou o tratamento da hipertensão arterial (LI, 2013).

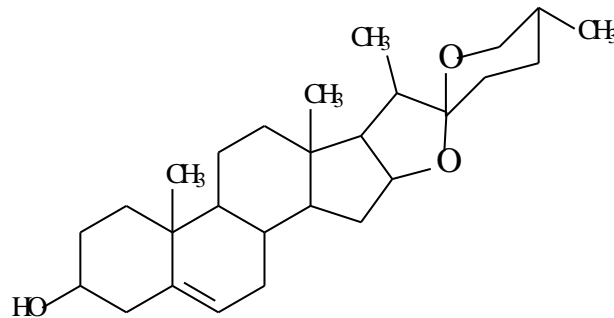
Os óleos essenciais são produtos naturais e possuem uma variedade de substâncias, sendo os esteroides um dos componentes com atividades biológicas de plantas aromáticas (GRASSMANN *et. al.*; 2005). Dentre as atividades biológicas comprovadas, é possível citar a atividade cardiovascular (GUEDES *et. al.*, 2008; BASTOS *et. al.* 2009).

Estudos também sugerem uma menor incidência de doenças coronárias e de doenças relacionadas com deficiências de estrogênio em seres humanos que têm uma dieta rica no consumo de fitoestrógenos (ie, a genisteína, daidzeína e diosgenina) (ESFANDIAREI *et al.*, 2011).

A diosgenina é uma saponina esteróide encontrada em várias plantas, incluindo espécies de *Solanum* e *Dioscorea* (Figura 5). Na China, a *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright (DZW) é uma planta cultivada principalmente usada para a produção de

diosgenina, mas também pode ser extraída a partir a raiz selvagem inhame (*Dioscorea villosa*), feno-grego (*Trigonella foenum graecum*), e o de soja (*Glycine max*) (ESFANDIAREI *et al*, 2011). A diosgenina (25R-espirost-5-en-3-β-OH) é uma das mais importantes saponinas esteróides na indústria farmacêutica e é usada principalmente como matéria prima para a síntese parcial de contraceptivos orais, hormônios sexuais e outros esteróides (INTAPAD *et al.*, 2012).

**Figura 5:** Estrutura química da diosgenina.



A diosgenina existe principalmente nas células da planta sob a forma ligada à saponina, com o carbono C3 e C26 ligados a cadeias de açúcar vinculadas à saponina. As saponinas existem nas células que estão envolvidas firmemente por grandes quantidades de lignocelulose e amido (CASANOVA *et al.*, 2012). A maioria das saponinas presentes nas células DZW são solúveis em água, o que favorece a sua biodistribuição no corpo humano (YI, 2012).

Os fitoestrógenos, um grupo de derivados de plantas compostos não esteroidais que podem se comportar como estrógenos ligando-se aos receptores de estrogênio, têm atraído grande atenção para os seus efeitos potencialmente benéficos na saúde humana. Esses compostos podem também não apresentar afinidade para receptores de estrogênio e, neste caso, agem por demais mecanismos, tais como inibição ou ativação de enzimas específicas implicado em uma resposta estrogênica ou a alteração do total quantidade de estrógenos livres no organismo (WOCLAWEK-POTOCKA *et al*, 2013).

De acordo com dados do ano de 2000, a prevalência global de hipertensão arterial foi de aproximadamente 1 bilhão de pessoas, e para 2025, estima-se que mais de 1,5 bilhão de adultos serão hipertensos (FIALOVÁ, *et al.*, 2007). O início da

equivalência nas taxas de eventos cardiovasculares entre os sexos coincide com o advento da menopausa e, conseqüentemente, da privação estrogênica (DIAS, 2007).

Vários outros estudos apontam para uma função dos esteróides sexuais femininos favorecendo o equilíbrio dos vasodilatores em relação aos vasoconstritores no endotélio vascular e músculo liso subjacente no controle vascular (JOFFRES, 2013). O estrogênio, de maneira geral, afeta o sistema vascular diminuindo o tônus e aumentando as respostas dilatadoras endotélio-dependentes nos vasos sanguíneos (YING – HUI *et al.*, 2012; LI, 2013). Outro possível mecanismo vasodilatador do estrogênio é através de sua participação na entrada de cálcio (canais de cálcio) nas células do músculo liso vascular (YI *et al.*, 2012; LI, 2013).

Dessa maneira, esta prospecção teve por objetivo realizar um mapeamento de patentes e produção científica em nível nacional e internacional sobre a atividade da diosgenina no sistema cardiovascular.

## 2 METODOLOGIA

A prospecção tecnológica foi realizada nas bases dos bancos de dados de patentes *European Patent Office* (ESPACENET), na *World Intellectual Property Organization* (WIPO), no *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e no Banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A prospecção científica foi realizada no banco de dados de artigos da *Web of Science*, *Science Direct*, *Scielo* e *PubMed*.

Foi usado o termo “Diosgenina” e “*Diosgenin*”, e em seguida foram cruzados os termos com “Cardiovascular” e “*Cardiovascular*”, “Hipertensão” e “*Hypertension*”, “Menopausa” e “*Menopause*”, “Antihipertensivo” e “*Antihypertensive*”, “Ciclodextrina” e “*Cyclodextrin*”. A pesquisa foi realizada em janeiro de 2019, onde foram analisadas patentes até a presente data, e os artigos foram considerados os publicados a partir de 1986.

A análise dos dados foi feita com o *software GraphPad Prism®*.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Prospecção Tecnológica

Estudos de Prospecção constituem a ferramenta básica para a fundamentação nos processos de tomada de decisão em diversos níveis na sociedade moderna. O propósito dos estudos de prospecção não é desvendar o futuro, mas sim delinear e testar visões possíveis e desejáveis para que sejam feitas, hoje, escolhas que contribuirão, da forma mais positiva possível, na construção do futuro. A análise da documentação patentária, em determinado segmento tecnológico de interesse, permite que empresas e centros de PeD determinem o rumo dos investimentos e linhas de pesquisas que devem ser adotadas e evitam as “re-invenções” (JANNUZZI *et al.*, 2007).

Inicialmente foi analisado o número de pedidos de patentes depositados nas bases de dados, de acordo com os termos utilizados (Tabela 1). Dentre as bases de dados pesquisadas a que apresentou a maior quantidade de depósitos de patentes relacionadas aos termos da pesquisa foi a WIPO com 2621 documentos para o termo “*diosgenin*”, 414 para o termo “*diosgenin*” cruzado com “*cardiovascular*” e 334 para o termo “*diosgenin*” cruzado com “*hypertension*”, 46 para o termo “*diosgenin*” cruzado com “*hypertension and menopause*”, 18 para o termo “*diosgenin*” cruzado com “*antihypertensive and menopause*”, 7 para o termo “*diosgenin*” cruzado com “*cyclodextrin and antihypertensive and menopause*”. Na base de dados brasileira (INPI) não foi encontrado nenhum trabalho registrado com as palavras chave utilizadas.

**Tabela 1:** Número de patentes depositadas por base de dados abrangendo diferentes termos.

Palavra-Chave	INPI	WIPO	USPTO	ESPACENET
Diosgenina	0	0	0	0
<i>Diosgenin</i>	0	2621	883	390
Diosgenina e Cardiovascular	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Cardiovascular</i>	0	414	179	5
Diosgenina e Hipertensão	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Hypertension</i>	0	334	124	0
Diosgenina e Hipertensão e Menopausa	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Hypertension and Menopause</i>	0	46	12	0
Diosgenina e Antihipertensivo e Menopausa	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Antihypertensive and Menopause</i>	0	18	5	0
Diosgenina e Ciclodextrina e Menopausa e Antihipertensivo	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Cyclodextrin and Menopause and Antihypertensive</i>	0	7	0	0

Fonte: Autoria própria (2019)

Apenas a base WIPO mostrou resultados expressivos com os termos “Diosgenin”, “*Diosgenin and Cardiovascular*” e “*Diosgenin and Hypertension*”. Desse modo, a pesquisa foi direcionada no sentido de examinar melhor os documentos que esta base pudesse mostrar com relação à distribuição de patentes por país, ano de depósito e por Classificação Internacional de Patente (CIP).



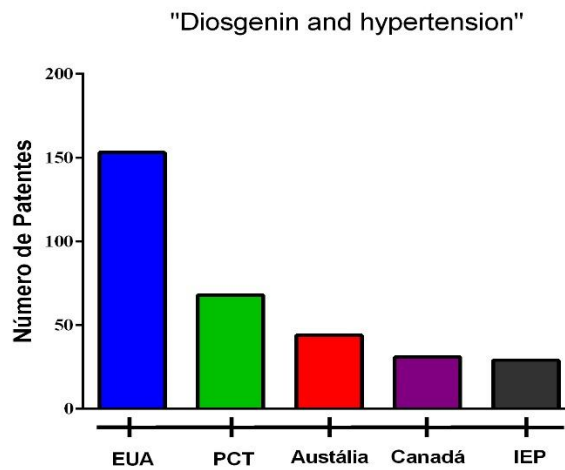
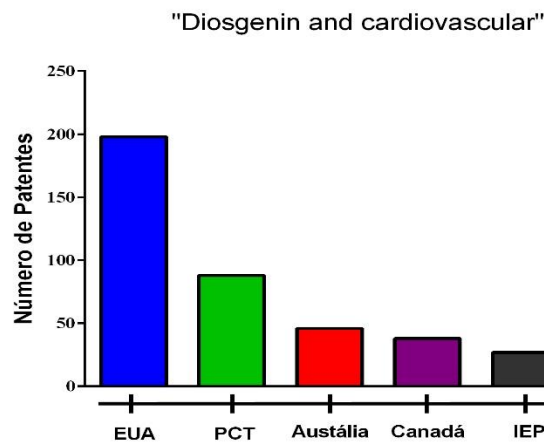
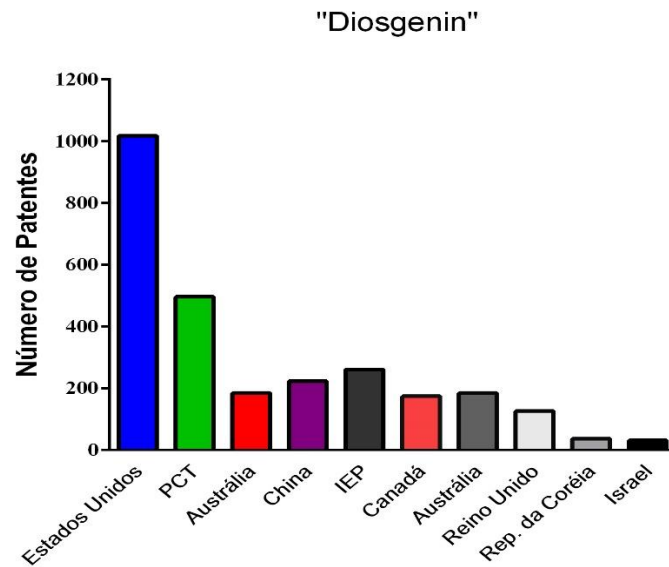
### 3.1.2 Patentes depositadas na WIPO

A Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI) é uma das 17 agências especializadas das Nações Unidas. A OMPI foi criada em 1967 para incentivar a atividade criativa, para promover a proteção da propriedade intelectual em todo o mundo.

De acordo com a Figura 6, o país que mais detém patentes envolvendo a diosgenina são os Estados Unidos, com um total de 1.018 documentos, sendo 198 deles envolvendo a atividade da diosgenina sobre o sistema cardiovascular. Não houve registro de nenhuma patente brasileira nesta base de dados, o que não corrobora com a biodiversidade encontrada no Brasil, com uma grande quantidade de plantas que contém a diosgenina como constituinte de seus óleos essenciais (LIU *et al.*, 2010; ESFANDIAREI *et al.*, 2011).

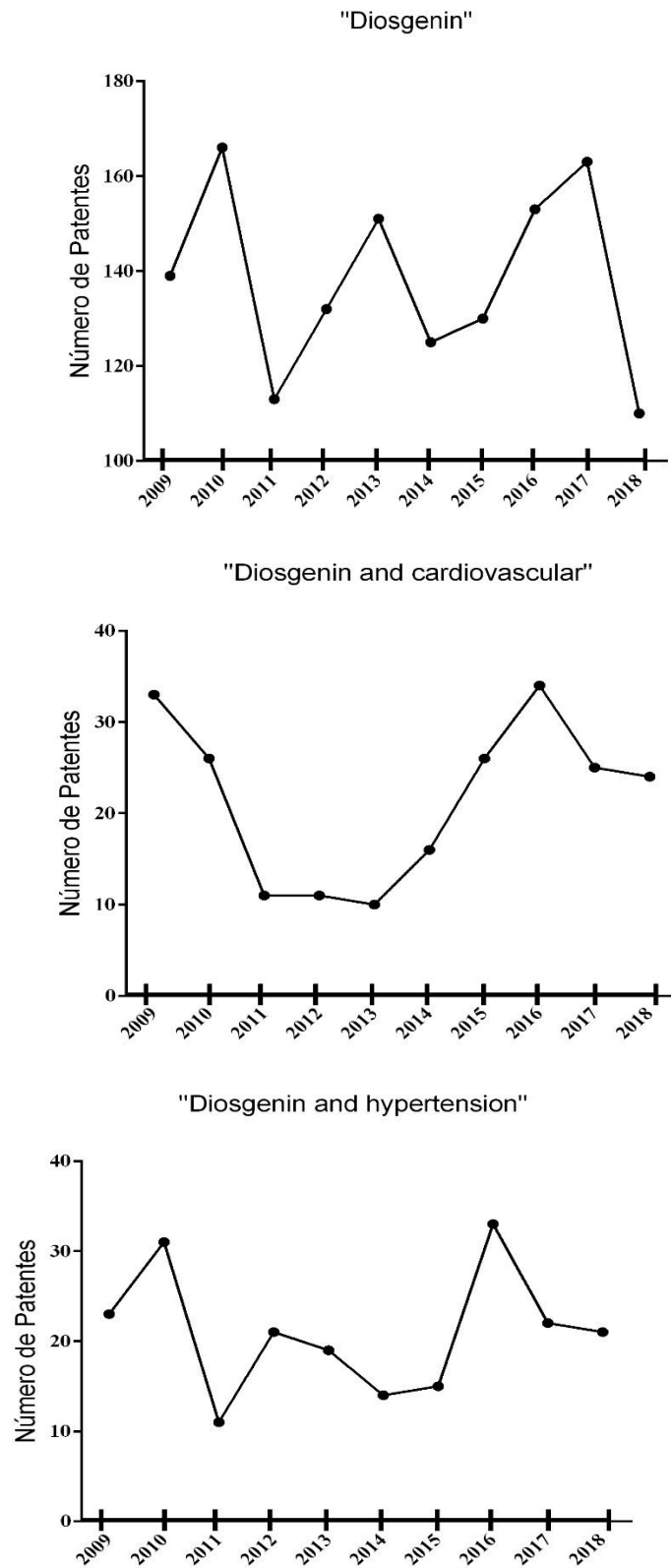
A Figura 7 mostra que os anos de 2009 foi o que apresentou o maior número de patentes envolvendo a atividade cardiovascular da diosgenina, com 33 documentos. Após 2009 o número de patentes caiu consideravelmente, possivelmente por estar firmado em bases científicas a importância do papel desse fitoestrógeno na atividade cardiovascular (WOCLAWEK- POTOCKA *et al.*, 2013). Porém, em 2016 o interesse por estudar mais profundamente o uso de fitoestrógenos no sistema cardiovascular aumentou novamente (pico de 34 documentos), devido a descoberta da importância da diosgenina sobre outros sistemas biológicos, associados direta ou indiretamente com melhorias no sistema cardiovascular (DAS *et al.*, 2012; NAIDU *et al.*, 2014; ISAYEVA, 2014). Porém, nenhuma das patentes publicadas correlaciona diretamente o uso da diosgenina para fins cardiovasculares na menopausa.

**Figura 6:** Número de patentes depositada por país na base WIPO, utilizando as palavras chave “diosgenin”, “diosgenin and cardiovascular” e “diosgenin and hypertension”.



Legenda: Estados Unidos da América (EUA), Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT) e Instituto Europeu de Patentes (IEP)

**Figura 7:** Evolução anual de patentes depositadas na base WIPO, utilizando as palavras chave “diosgenin”, “diosgenin and cardiovascular” e “diosgenin and hypertension”.



A Classificação Internacional de Patentes (CIP) representa todo o conhecimento que possa ser considerado apropriado ao campo das invenções e está dividida em seções, classes, subclasses, grupos e subgrupos (JANNUZZI *et al.*, 2007). Com isso, as patentes foram analisadas de acordo com a CIP (Figura 4), sendo a seção A foi a mais citada, na qual faz referência a necessidades humanas, e a seção C, que também foi citada, trata-se da química e metalúrgica.

Dentre as CIP citadas, a que obteve um maior número foi a A61K, na qual trata de preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas (dispositivos ou métodos especialmente adaptados para dar aos produtos farmacêuticos formas físicas determinadas ou para sua administração; aspectos químicos de, ou uso de materiais para ataduras, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos e composições saponáceas). No total foram 1.796 documentos referentes à diosgenina, sendo destes 308 referentes à diosgenina e o sistema cardiovascular e 278 deles à diosgenina e anti-hipertensivos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Distribuição por CIP das patentes depositadas na base WIPO, utilizando as palavras chave “diosgenin”, “diosgenin and cardiovascular” e “diosgenin and hypertension”.

Palavra-chave	Classificação Internacional de Patentes (CIP)									
	A61K	A61P	A23L	A01N	C12N	C07H	C07J	C07D	C12Q	G01N
“diosgenin”	1.796	586	111	-	416	285	523	103	91	-
“diosgenin and cardiovascular”	308	93	25	22	92	89	57	18	17	12
“diosgenin and hypertension”	278	87	13	14	94	78	23	10	-	11

Fonte: Autoria própria (2019)

Legenda: significado das siglas da Classificação Internacional de Patentes (CIP).

A61K: preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas.

A61P: atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais.

A23L: alimentos, produtos alimentícios ou subsídios abrangidos pelas subclasses a21d ou a23b - a23j; seu preparo ou tratamento.

A01N: conservação de corpos de seres humanos ou animais ou plantas ou partes dos mesmos (preservação de alimentos ou produtos alimentícios).

C12N: micro-organismos ou enzimas; suas composições, propagação, conservação ou manutenção de micro-organismos; engenharia genética ou de mutações; meios de cultura.

C07H: açúcares; seus derivados; nucleosídeos; nucleotídeos;

C07J: esteróides.

C07D: compostos heterocíclicos.

C12Q: processos de medição ou ensaio envolvendo enzimas, ácidos nucleicos ou micro-organismos; suas composições ou seus papéis de teste; processos de preparação dessas composições; controle responsivo a condições do meio nos processos microbiológicos ou enzimáticos.

G01N: investigação ou análise dos materiais pela determinação de suas propriedades químicas ou físicas.

### 3.1.3 Prospecção científica

De acordo com a pesquisa realizada nas bases de dados de artigos científicos, pôde ser observado que a maioria absoluta de artigos publicados com o tema da pesquisa é em inglês. Quando o termo “diosgenina” foi usado, as bases de dados *SciELO*, *Science Direct* e *Web of Science* apresentaram artigos na área, sendo o total 8, 1 e 6, respectivamente. Ao cruzar o termo “Diosgenina e Cardiovascular” apenas *Science Direct* (4) e *Web of Science* (2) apresentaram uma pequena quantidade de trabalhos publicados. Do mesmo modo, ao cruzar o termo “Diosgenina e Hipertensão” apenas *Science Direct* (198) e *Web of Science* (103) apresentaram uma quantidade razoável de trabalhos publicados.

Ao pesquisar o termo “*Diosgenin*” foram encontrados artigos em todas as bases pesquisadas, sendo que a *Science Direct* foi a que mostrou mais resultados, com um total de 2009 artigos. Seguidos pela *PubMed*, 897 artigos, *Web of Science*, 376 artigos e *Scielo*, 4 artigos publicados. Ao ser cruzado os termos “*Diosgenin and Cardiovascular*” foram encontrados artigos no *Science Direct* (348) e *Web of Science* (263). Ao ser cruzado os termos “*Diosgenin and Cardiovascular*” foram encontrados artigos no *Science Direct* (198) e *Web of Science* (103), conforme exposto na Tabela 3.

**Tabela 3:** Número de artigos publicados por base de dados abrangendo diferentes termos.

Palavra-Chave	ScienceDirect	Scielo	PubMed	Web of Science
Diosgenina	12	17	1320	6
<i>Diosgenin</i>	2395	19	1320	376
Diosgenina e Cardiovascular	4	0	0	2
<i>Diosgenin and Cardiovascular</i>	444	0	55	263
Diosgenina e Hipertensão	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Hypertension</i>	259	0	6	103
Diosgenina e Hipertensão e Menopausa	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Hypertension and Menopause</i>	59	0	0	0
Diosgenina e Antihipertensivo e Menopausa	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Antihypertensive and Menopause</i>	26	0	0	0
Diosgenina e Ciclodextrina e Menopausa e Antihipertensivo	0	0	0	0
<i>Diosgenin and Cyclodextrin and Menopause and Antihypertensive</i>	2	0	0	0

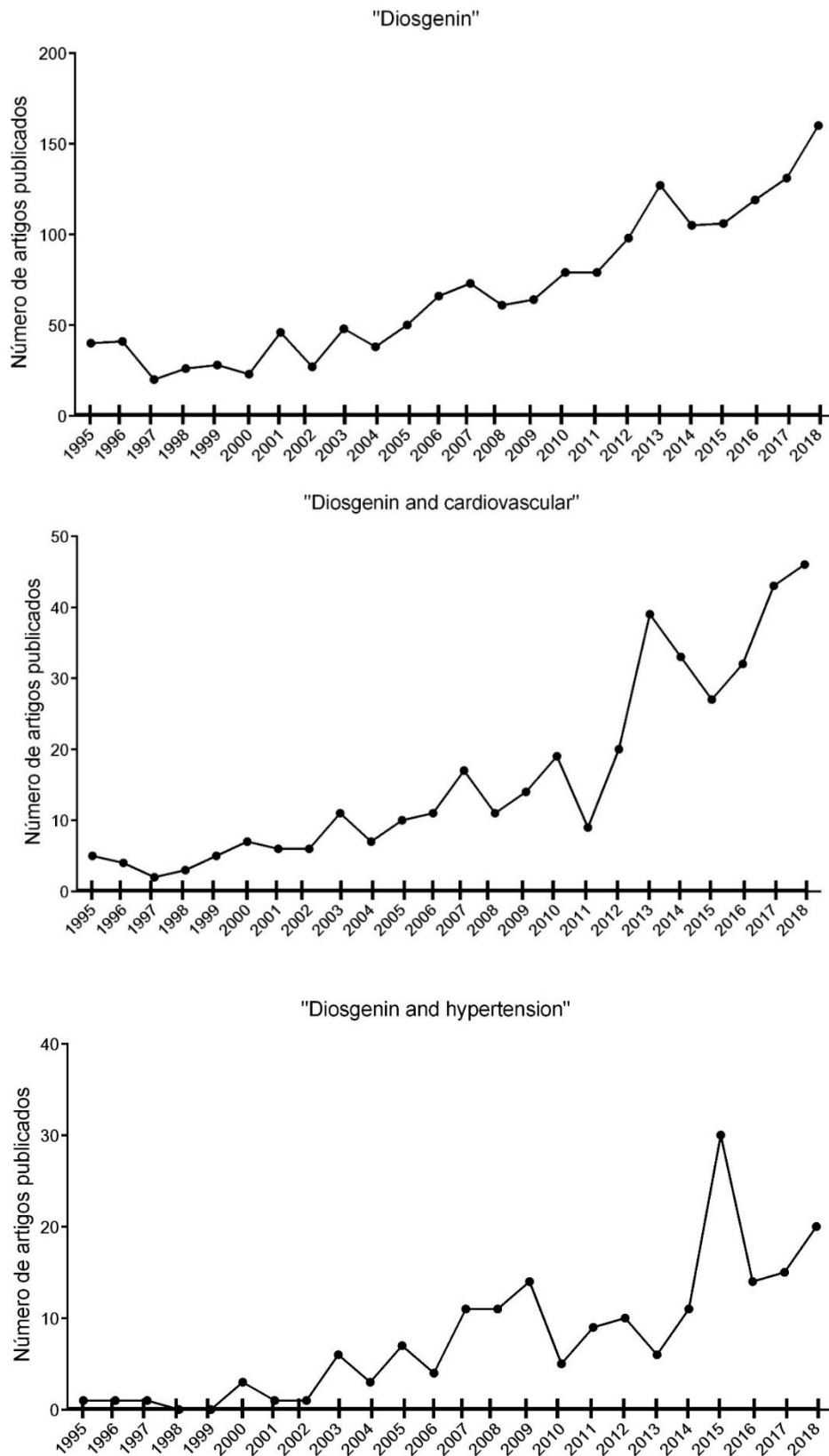
Fonte: Autoria própria (2019)

Conforme dados da Tabela 3, foi analisada a evolução anual de publicação de artigos nas bases de dados pesquisadas com a atividade cardiovascular da diosgenina até o ano de 2019.

Analisando a evolução de artigos publicados na *Science Direct* (Figura 8), foi possível perceber um crescente aumento no número de publicações, sendo que a partir de 2012 esse número aumentou bastante e é crescente até os dias de hoje. O interesse no tema cresceu nos últimos quatro anos, tendo 119 publicações em 2016, 131 em 2017, 160 em 2018 e 19 publicações só em 2019, em meio a as aceitas para publicação entre janeiro e maio, no corrente mês de janeiro de 2019. O avanço nas pesquisas nos últimos anos pode ser justificado pela atividade biológica e potencial terapêutico que a diosgenina tem apresentado (YI *et al.*, 2012; LI, 2013; JOFFRES, 2013; MORAIS 2015; YUE *et al.*, 2019).

O ScienceDirect é uma página web dirigida pela editora anglo-holandesa Elsevier, originalmente inaugurada em março de 1997. Desde então, conta com milhares de conteúdos científicos, técnicos e médicos, dentre os quais estão disponíveis mais de 12 milhões de artigos, cerca de 3 mil títulos de revistas e 20 mil Ebooks, um número crescente de periódicos de acesso aberto disponíveis gratuitamente e arquivos digitais que pesquisam desde 1823 (SCIENCE DIRECT, 2014). Provavelmente por esses fatores, foi o site de busca que obteve o maior volume de material publicado (Tabela 3). Desse modo, foi a base de dados escolhida para maiores análises de prospecção científica. Para tanto, a palavra-chave usada foi “diosgenin” e o cruzamento entre as palavras “cardiovascular” e “hypertension”, as quais também somaram o maior número de periódicos publicados.

**Figura 8:** Evolução anual de artigos publicados no *Science Direct*, usando as palavras-chave “diosgenin” e o cruzamento com “cardiovascular” e “hypertension”.





Os estudos publicados têm mostrado que o aumento do aporte científico corrobora com o interesse médico por alternativas de tratamento da hipertensão, bem como condições clínicas base que predisponham desordens metabólicas e cardiovasculares, a exemplo da menopausa (STACHOWIAK, PERTY SKI, e PERTY SKA-MARCZEWSKA, 2015; VRYONIDOU *et al.*, 2015). A diosgenina se enquadra nesse tipo de alvo de estudo (MORAIS, 2015), justificando o crescente interesse da comunidade científica em estudá-la.

#### 4 CONCLUSÃO

Com a realização da prospecção, foi possível observar que a grande maioria das patentes relacionadas à atividade cardiovascular da diosgenina está no idioma inglês, sendo a grande maioria encontrada na WIPO. Os países que mais depositaram patentes foram os Estados Unidos, Canadá e OMPI (Organização Mundial da Propriedade Intelectual). Porém, entre as patentes publicadas, nenhuma correlaciona diretamente o uso da diosgenina para fins cardiovasculares na menopausa. Os anos nos quais houve um maior número de patentes depositadas foram 2008 e 2009. Apesar do número de patentes cair consideravelmente após 2009, o número de artigos publicados só aumentou, mostrando que a diosgenina merece ser explorada em diversas áreas da saúde. A área mais citada da CIP foi a A61K, corroborando com as patentes e os artigos publicados, em sua maioria, na área de necessidades humanas e da saúde.

#### REFERÊNCIAS

BASTOS J. F.; MOREIRA, I. J.; RIBEIRO, T.P.; MEDEIROS, I.A.; ANTONIOLLI, A.R.; DE SOUSA, D. P.; SANTOS, M. R. **Hypotensive and Vasorelaxant Effects of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rats.** Basic Clinical Pharmacology and Toxicology, 2009.

BEIG, A.; AGBARIA, R.; DAHAN, A. **Oral Delivery of Lipophilic Drugs: The Tradeoff between Solubility Increase and Permeability Decrease When Using Cyclodextrin-Based Formulations.** PLoS One, v. 8, n. 7, 2013.

CASANOVA, G.; SPRITZER, P. M.; **Effects of micronized progesterone added to non-oral estradiol on lipids and cardiovascular risk factors in early postmenopause: a clinical trial.** *Lipids Health Dis.* doi: 10.1186/1476-511X-11-133, 2012.

CHENG, J. *et al.* **[ $\beta$ -estradiol activates BK(Ca) in mesenteric artery smooth muscle cells of post-menopause women].** *Sheng Li Xue Bao.* v. 64, n. 2, p.121-8, 2012.

DAS, S.; DEY, K. K.; DEY, G.; PAL, I.; MAJUMDER, A.; MAITICHOUDHURY, S.; KUNDU, S. C.; MANDAL, M. **Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma.** *PLoS One*, n. 10, 2012.

DIAS, K. L. G. **Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric.** *European Journal of Pharmacology*, v. 574, p. 172–178, 2007.

ESFANDIAREI, M. *et al.* **Diosgenin modula a função das células do músculo liso vascular, regulando a viabilidade celular, migração e homeostase do cálcio.** *J Pharmacology Therapy Experiments*, v. 3, p. 925-39, 2011.

FIALOVÁ, M.; DLUGOŠOVÁ, K.; OKRUHLICOVÁ, L.; KRISTEK, F.; MANOACH, M.; TRIBULOVÁ, N. **Adaptation of the heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodelling.** *Physiology Research*, v. 56, 2007.

GRASSMANN, J. **Terpenoids as Plant Antioxidants.** *Vitamin Hormone*, v. 72, p. 505-535, 2005.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM NETO, P.J. **Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos.** *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 89, n. 3, p. 220-225, 2008.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. **Exploiting new approaches for anatural product drug discovery in the biotechnology industry.** *Drug discovery Today: Techologies*, v. 2, n. 3, p. 281-286, 2005.

INTAPAD, S. *et al.* **Long-Term Effect of Phytoestrogens from *Curcuma comosa* Roxb. On Vascular Relaxation in Ovariectomized Rats.** *Journal Agric.Food Chemistry*, v. 60, p. 758–764, 2012.

ISAYEVA, G. S. **The State of Coronary Arteries in Perimenopausal Women With Chest Pain.** *Journal of Clinical Medicine Research*; v. 6, n. 6, p. 451-455, 2014.

JANNUZZI, A. H. L.; AMORIM, R. C. R.; SOUZA, C. G. **Implicações da categorização e indexação na recuperação da informação tecnológica contida em documentos de patentes.** *Ciência da Informação*, v. 36, n. 2, p. 27-34, 2007.

JOFFRES, M. **Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in national surveys from England, the USA and Canada, and correlation with stroke and ischaemic heart disease mortality: a cross-sectional study.** *BMJ* Abril, 2013.

LI, Hong-Fang. **Effects of estrogen and phytoestrogens on endometrial leakage in ovariectomized rats and the related mechanisms.** *Sheng Li Xue Bao*, v. 65, p.8-18, 2013.

LIU, L.; DONG, Y.; XIU, Z. **Extração em três fases da diosgenina e saponinas esteroidais da fermentação de *Dioscorea zingibernsis* CH Wright.** *Bioquímica de Processos*; v. 45, n. 5, p. 752-756. 2010.

MORAIS, I. C. P. S. **Efeito do fitoestrógeno diosgenina sobre a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia.** 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Cardiovascular), Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

NAIDU, P.B.; PONMURUGAN, P.; BEGUM, M.S.; MOHAN, K.; MERIGA, B.; RAVINDARNAIK, R.; SARAVANAN, G. **Diosgenin reorganises hyperglycaemia and distorted tissue lipid profile in high-fat diet-streptozotocin-induced diabetic rats.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014.

SCIENCE DIRECT. **Anúncio: Science Direct.** *Jornal de Dinâmica Econômica e Controle*, v. 41, 2014.

SHI-HUA, F. *et al.* **Relationship between Female Menopause and Hypertension/Isolated Systolic Hypertension in Rural Districts of Hanzhong in Shaanxi Province.** *Yi Xue Ke Xue Xue Yuan Bao*, 2013.

SILVA- FILHO, J.C. *et al.* **Investigation of Mechanisms Involved in (-)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta** *Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology*, v. 110, p. 171–177, 2011.

STACHOWIAK, G., PERTY, S, T.; PERTY, S.M. M. **Metabolic disorders in menopause.** *Menopausal Review*, v. 1, p. 59–64, 2015.

VRYONIDOU, A.; PASCHOU, S. A.; MUSCOGIURI, G.; ORIO, F.; GOULIS, D. G. **MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Metabolic syndrome through the female life cycle.** *European Journal of Endocrinology*, v. 173, n. 5, p. 153–163, 2015.

WOCLAWEK- POTOCKA. *Et al.* **Efeitos diversos de fitoestrogênios sobre o desempenho reprodutivo: vaca como um modelo.** *Internacional Journal Endocrinology*, v 10, 2013.

YI, H. *et al.* **17 $\beta$ -estradiol antagoniza a sub-regulação de ER $\alpha$  / NOS -3 sinalização na disfunção endotelial vascular de ratos diabéticos fêmea.** *PLoS One*, 2012.

YING – HUI. **Gao et al, Chronic intermittent hypoxia aggravates cardiomyocyte apoptosis in rat ovariectomized model.** Chinese Medical Journal, v. 125, n. 17, p. 3087-92, 2012.

YUE, G. C.L.; WONG, L. S.; LEUNG, H. W.; GAO, S.; TSANG, J. Y. S.; LIN, Z. X.; TSE, G. H. K.; LAU. C. B. S. **Avaliação dos perfis de segurança dos fitoterápicos chineses estrogênicos no câncer de mama.** Fitomedicina, v. 56 , p. 103-117, 2019.



## CAPÍTULO II

### **Avaliação toxicológica e atividade anticoagulante da Diosg/ $\beta$ -CD em ratas Wistar**

(Artigo será submetido na revista **Biochemical and  
Pharmacology**)

**Qualis: A1 - Biotecnologia**

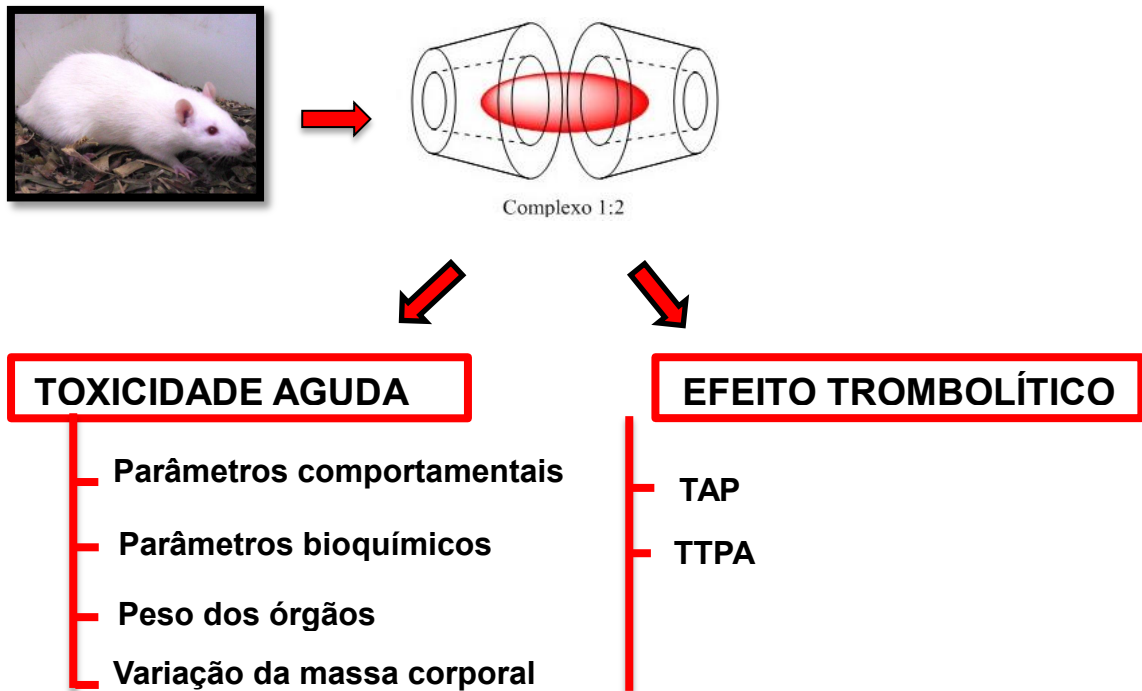
## **Avaliação toxicológica e atividade anticoagulante da Diosg/ $\beta$ -CD em ratas Wistar**

### **RESUMO:**

A literatura mostra que as saponinas são grandes candidatos para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de vários processos patológicos, incluindo distúrbios metabólicos e menopausa. Na menopausa, os problemas de coagulação sanguínea se tornam mais frequentes em mulheres. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a segurança do complexo de Diosgenina com  $\beta$ -ciclodextrina (Diosg/ $\beta$ -CD), por meio de testes hipocráticos, peso dos órgãos e parâmetros bioquímicos. Além de avaliar a atividade anticoagulante do Diosg/ $\beta$ -CD. Para isto, os animais foram tratados com dose única de 2 g/kg, v.o. do Diosg/ $\beta$ -CD e avaliados por 14 dias, nos quais foram avaliados o comportamento dos animais, mensurado água, comida, fezes, urina e peso do animal. Ao final de duas semanas, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para avaliação dos parâmetros bioquímicos (AST, ALT, Bilirrubina direta, Proteínas totais, Albumina, Uréia, Creatinina, Glicose, Colesterol, Triglicérides, HDL e Fosfatase alcalina) e de coagulação (TAP e TTPA). Os animais não apresentaram sinais de toxicidade aguda até 2 g/kg, v.o. do Diosg/ $\beta$ -CD, mostrou efeito anticoagulante no teste de TTPA e não afetou o tempo de coagulação do TAP. Os resultados sugerem que o Diosg/ $\beta$ -CD (v.o) na dose de 2 g/kg, v.o. é segura, pois não afetou os parâmetros comportamentais e bioquímicos dos animais tratados. Além disso, produziu efeito anticoagulante em ratas através de alteração no tempo de atuação da via intrínseca de coagulação, mas não alterou a via extrínseca.

**Palavras-chave:** Toxicidade, Diosgenina,  $\beta$ -CD, atividade anticoagulante.

## Resumo Gráfico





## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a síntese de novas moléculas e a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas têm sido o método de escolha na obtenção de novas drogas. No entanto, a dependência da utilização de plantas para a obtenção de medicamentos ainda tem sido grande, mesmo após a utilização de refinadas técnicas de síntese. Os óleos essenciais extraídos de espécies de *Solaum* e *Dioscorea* são ricos em sapogeninas esteroides, dentre eles a diosgenina (ESFANDIAREI *et al.*, 2011). Dentre as espécies de *Dioscorea* mais utilizadas na medicina popular está a *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright (DZW) (LIU *et al.*, 2010), de onde é extraído um óleo essencial rico em esteroides. Os óleos essenciais extraídos desta planta são de grande importância nas indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica (CHEN *et al.*, 2011; ESFANDIAREI *et al.*, 2011).

Além disso, a diosgenina natural mostrou importante efeito antioxidante e cardioprotetor (GONG *et al.*, 2010). Contudo, novas formulações terapêuticas de uso oral são propostas a fim de superar os inconvenientes farmacocinéticos. Uma das alternativas é o uso da nanobiotecnologia, a fim de proporcionar um sistema de liberação direcionado para o sítio da doença, tornando a diosgenina uma aliada em potencial no tratamento de distúrbios cardiovasculares, a exemplo da hipertensão arterial. Para tal estudo, o uso de modelos de hipertensão induzida em ratos, como o modelo por inibição da síntese de NO, através da administração de NG-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), é bastante utilizado para o estudo da hipertensão arterial sistêmica (RIBEIRO *et al.*, 1992; BAYLIS *et al.*, 1998).

Estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram de maneira evidente a menor prevalência de hipertensão arterial (HA) em mulheres no período fértil, quando comparados aos homens de mesma idade. Após a menopausa, período de queda abrupta dos níveis de hormônios sexuais femininos, ocorre um aumento no número de mulheres hipertensas (DOWLING *et al.*, 2013). Pesquisas experimentais com diferentes modelos de HA (LI, 2013) demonstram que os hormônios femininos podem proteger contra as complicações da hipertensão arterial (JOFFRES, 2013). O início da equivalência nas taxas de eventos cardiovasculares entre os sexos coincide com o advento da menopausa e, conseqüentemente, da privação estrogênica (DIAS, 2007).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial farmacológico e terapêutico do fitoestrógeno diosgenina e do complexo  $\beta$ -ciclodextrina+diosgenina voltado para a atividade anti-hipertensiva, utilizando ratas hipertensas e ovariectomizadas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Complexo de inclusão de diosgenina com $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD)**

Para o preparo e uso em experimentos de toxicidade aguda e atividade anticoagulante, o complexo  $\beta$ -CD foi solubilizado em Tween (0,1% v/v) e dissolvido em água destilada na concentração de 100mL/g.

### **2.2 Animais**

Na avaliação da toxicidade aguda e atividade anticoagulante, foram usadas ratas Wistar fêmeas (180-200 g, n=4 por grupo), criadas no Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram abrigados a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e comida. As ratas foram aclimatizadas pelo menos uma hora antes da realização dos testes e foram utilizados somente uma vez ao longo dos experimentos. Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética institucional (Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA/UFPI, nº 069/2014) e foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório.

Os animais foram eutanasiados com superdosagem de tiopental sódico, de acordo com a RESOLUÇÃO Nº 1000, DE 11 DE MAIO DE 2012, sendo as eutanásias realizadas sob a responsabilidade técnica do médico veterinário da equipe, Prof. Dr. Rozeverter Moreno Fernandes CRMV-PI Nº 0290, em conformidade ao Parágrafo Único do Art. 2º da Resolução Nº 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária-CFMV. Os resíduos biológicos e químicos oriundos desse estudo foram descartados de acordo com as normas estabelecidas pela UFPI.

### **2.3 Drogas e produtos químicos**

Durante o desenvolvimento dos experimentos foram utilizadas diversas substâncias tais como: Cetamina, xilazina, tiopental sódico, Tween, esteroide (25R)-5-espirosten-3 $\beta$ -ol, 3 $\beta$ -Hidroxi-5-espirostene ou diosgenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As substâncias utilizadas foram dissolvidas em água destilada.

### **2.4 Determinação da toxicidade aguda em ratas**

A avaliação toxicológica do Diosg/ $\beta$ -CD foi realizado pelo método de dose fixa, recomendado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), nº 420 (OECD, 2001). Os animais foram divididos em dois grupos com quatro animais cada; um grupo teste foi tratado oralmente com Diosg/ $\beta$ -CD em dose aguda com uma infusão do fitoesteróide em veículo aquoso, pela via oral (sonda orogástrica rígida), com dose de 2000 mg/kg, num volume de 10 mL/kg. Os animais do grupo controle receberam doses isovolumétricas de salina (NaCl 0,9%) por via oral (v.o.). Imediatamente após a administração, os animais foram avaliados clinicamente e comportamentalmente com grande atenção durante as primeiras quatro horas após a administração como recomendado pelo protocolo de reconhecimento e de avaliação de sinais clínicos da OECD (OECD, 2000, modificado). Então, as avaliações foram realizadas diariamente, e os pesos dos animais, quantidade consumida de água, comida e quantidade eliminada de urina e fezes foram obtidos durante 14 dias. Após a investigação toxicológica, os animais foram eutanasiados, o peso relativo dos órgãos internos e os parâmetros bioquímicos foram determinados, bem como os valores de TAP E TTPA.

### **2.5 Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos das ratas**

Após o tratamento, conforme citado no item 2.4, os animais foram anestesiados, e procedeu-se a coleta do sangue para os testes bioquímicos. Em seguida os animais foram pesados, eutanasiados com dose letal de tiopental sódico (100 mg/kg, via intraperitoneal), os órgãos (coração, pulmão, fígado e rins) foram retirados e pesados para análise morfológica e macroscópica.

## 2.6 Testes bioquímicos

Após 14 dias do tratamento agudo com salina e Diosg/ $\beta$ -CD (2000 mg/kg, v.o.), os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) e submetidos à coleta de sangue pela punção da artéria abdominal, utilizando *scalp* nº 21. O sangue de cada animal foi colocado em tubos de vidro e centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm para a obtenção do soro. Em seguida, este foi separado e acondicionado em tubos do tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> para as determinações bioquímicas. Os parâmetros bioquímicos foram determinados no analisador Biopluss 2000<sup>®</sup> para os testes: glicose, AST (Aspartato amino-transferase), ALT (Alanina amino-transferase), colesterol, triglicérides, GSH (L-g-glutamil-L-cistenilglicina). Os testes bioquímicos de sódio e potássio foram determinados no analisador de íon seletivo EasyLite<sup>®</sup>, segundo Cartágenes (2009) modificado.

Os parâmetros foram avaliados por três métodos diferentes utilizando *kits* comerciais. Por métodos enzimáticos foram determinados: glicose, uréia, creatinina, colesterol, triglicérides. Por métodos cinéticos foram apurados uréia, creatinina, AST, ALT, fosfatase alcalina e proteínas totais e albumina.

## 2.7 Efeito trombolítico

### 2.7.1 Coagulograma - Tempo de Atividade da Protrombina (TAP) e Tempo de Tromboplasmina Parcial Ativada (TTPA)

Após 14 dias do tratamento agudo com salina e Diosg/ $\beta$ -CD (2000 mg/kg, v.o.), os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) e submetidos à coleta de sangue pela punção da artéria abdominal, utilizando *scalp* nº 21. O sangue de cada animal foi colocado em tubos de vidro e centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm para a obtenção do plasma. Para isto, foi adicionado anticoagulante citrato aos tubos. Em seguida, este foi separado e acondicionado em tubos do tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> para as determinações hematológicas.

No teste de TAP foi feita a adição de tromboplastina tissular ao plasma da rata tratada e um coágulo sólido, desencadeando o mecanismo de coagulação da via extrínseca. No teste de TTPA, foi feita a determinação do tempo de coagulação do

plasma citratado, após a adição dos reagentes que contém um Ativador Plasmático (Ácido Elágico) e fosfolípidos, que atuaram como substitutos das plaquetas. Inicialmente o plasma foi incubado com o Ativador de Contato, à 37°C por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se o Formador de Coágulo (Cloreto de Cálcio) para a recalcificação, desencadeando o mecanismo de coagulação da via intrínseca. Esta etapa foi cronometrada até a formação do coágulo.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Avaliação da toxicidade aguda em ratas**

O Diosg/ $\beta$ -CD até a dose de 2000 mg/kg (v.o.) não demonstrou nenhum sinal de toxicidade evidente durante 14 dias de observação, como também não foi observado morte. Portanto, a DL<sub>50</sub> do Diosg/ $\beta$ -CD não foi possível de ser determinada. Além disso, não foram observadas alterações comportamentais e clínicas após administração do Diosg/ $\beta$ -CD (Tabela 4). O Diosg/ $\beta$ -CD não alterou o peso relativo dos órgãos internos, os parâmetros bioquímicos e a massa corporal quando comparado ao veículo (Tabelas 5, 6 e Figuras 9 e 10).

**Tabela 4:** Toxicidade aguda do Diosg/β-CD na dose de 2000 mg/kg, v.o.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	TEMPO (min.)				
	30	60	120	180	240
<b>ESTIMULANTE</b>					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
<b>DEPRESSOR</b>					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catonia	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
<b>SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO</b>					
Diarréia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
<b>OUTROS COMPORTAMENTOS</b>					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	0	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
<b>Morte</b>	0	0	0	0	0

Fonte: OECD, 2000.

**Tabela 5:** Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratas Wistar, tratadas com o Diosg/β-CD (2000 mg/kg) administrado por via oral (v.o.) durante 14 dias consecutivos.

Parâmetros bioquímicos	Controle			Diosg/β-CD (2000 mg/kg, v.o.)		
	Média	EPM	N	Média	EPM	N
Albumina (g/dL)	2,55	0,11	4	2,56	0,10	4
Proteínas totais (g/dL)	6,87	0,09	4	6,80	0,17	4
Fosfatase Alcalina (U/L)	236,25	20,10	4	201,00	19,09	4
ALT (U/L)	50,50	3,27	4	41,00	2,00	4
AST (U/L)	119,75	6,22	4	97,75	3,96	4
Bilirrubina total (mg/dL)	0,03	0,01	4	0,06	0,01	4
Colesterol total (mg/dL)	78,75	9,36	4	80,25	8,00	4
Colesterol HDL (mg/dL)	43,75	2,09	4	48,50	7,93	4
Triglicerídeos (mg/dL)	37,25	7,58	4	34,75	12,87	4
Uréia (mg/dL)	39,75	5,57	4	27,25	1,93	4
Creatinina (mg/dL)	0,47	0,04	4	0,48	0,02	4
Glicose (mg/dL)	78,75	6,57	4	78,00	5,30	4

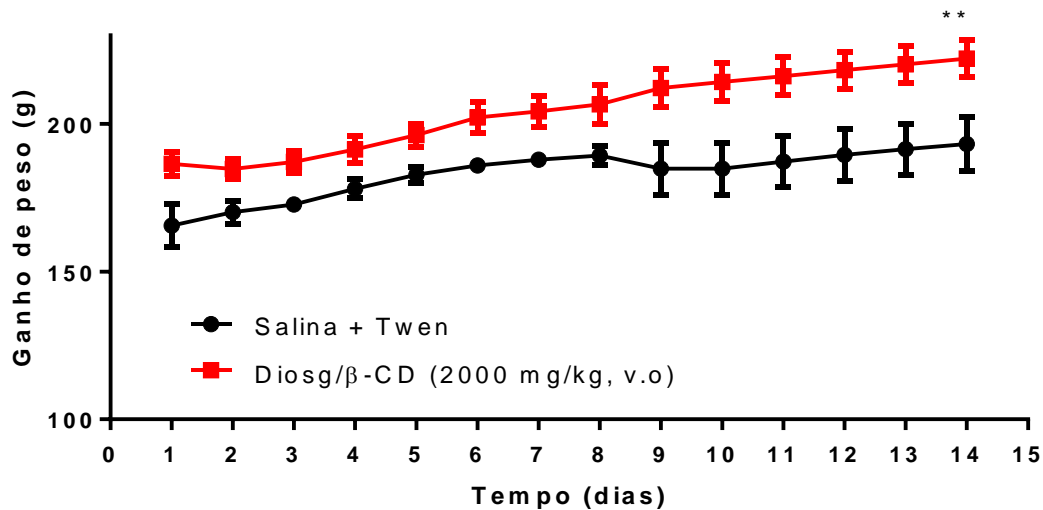
Os dados representam a média ± E.P.M. de 4 ratas. A análise estatística foi determinada pelo teste t de student não-paramétrico,  $p < 0,05$  foi considerado significativo quando comparado com o controle.

**Tabela 6:** Avaliação do peso dos órgãos internos de ratas Wistar tratadas com o Diosg/β-CD (2000 mg/kg) administrado por v.o. durante 14 dias consecutivos.

Órgãos Internos	Controle			Diosg/β-CD		
	Média	EPM	N	Média	EPM	N
Coração	0,74	0,04	4	0,81	0,03	4
Aorta	0,078	0,00	4	0,080	0,00	4
Fígado	7,67	0,52	4	7,45	0,11	4
Rins	0,88	0,03	4	1,04	0,06	4
Pulmão	1,29	0,01	4	1,32	0,04	4
Estômago	1,28	0,02	4	1,34	0,03	4
Fêmur	0,38	0,01	4	0,46	0,03	4

Os valores foram expressos em g/100 gramas de animal. Os dados representam a média ± E.P.M. de 4 ratas. A análise estatística foi determinada pelo teste t de student não-paramétrico,  $p < 0,05$  foi considerado significativo quando comparado com o controle.

**Figura 9:** Efeito da administração aguda de Diosg/ $\beta$ -CD (2000 mg/kg, v.o.), durante 14 dias consecutivos, sobre a variação do peso corporal dos animais.



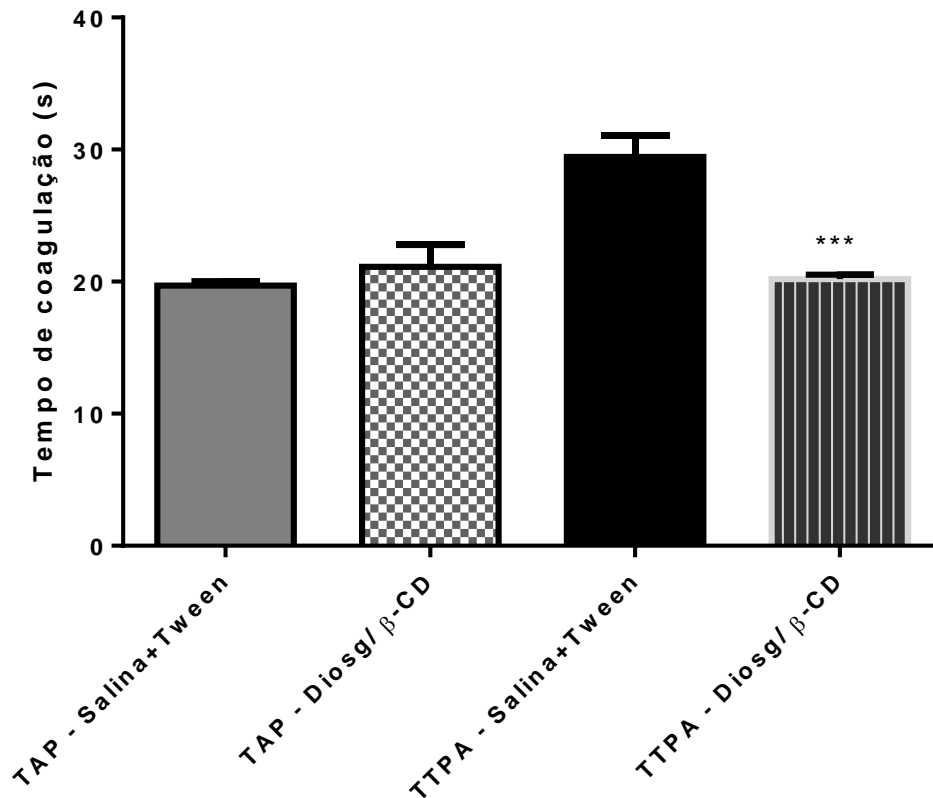
Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 4 ratos. Cada linha representa a média  $\pm$  E.P.M. (4 animais). A análise estatística foi determinada pelo ANOVA duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni,  $**p < 0,05$  comparado com o controle.

### 3.2 Avaliação da atividade anticoagulante em ratas

Os animais não apresentaram sinais de toxicidade aguda até 2 g/kg, v.o. do Diosg/ $\beta$ -CD, apresentaram redução significativa ( $**p < 0,05$ ) no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) ( $20,200 \pm 0,318$ ) quando comparado com o grupo controle ( $29,450 \pm 1,630$ ), mas não afetou o tempo de atividade da protrombina (TAP) em ambos os grupos experimentais ( $19,703 \pm 0,337$  e  $21,122 \pm 1,658$ ), salina e Diosg/ $\beta$ -CD, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10:** Tempo de Atividade de Protrombina (TAP) e Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina (TTPA) em ratas tratadas com Diosg/ $\beta$ -CD (2 g/kg, v.o). Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 2 grupos experimentais  $**p < 0,001$ , ANOVA, teste de Tukey,  $n=4$ ; Diosg/ $\beta$ -CD *versus* controle.



#### 4 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm relatado fitoesteróides com uma ampla variedade de propriedades biológicas, como anti-inflamatória, anticancerígena, apoptótica, além de terem sido usados no tratamento de doenças como osteoporose e tensão pré-menstrual em mulheres, através de alimentos que os continham (YAMADA *et al.*, 1997; NOGUCHI *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014). Interessantemente, esse estudo demonstrou pela primeira vez que o Diosg/ $\beta$ -CD promove atividade antiagregante após administração oral de dose única do complexo em ratas.

O Diosg/ $\beta$ -CD não mostrou nenhum sinal de toxicidade aguda em ratas até a dose de 2000 mg/kg. Assim, a dose letal 50% (DL50) não pode ser determinada. Corroborando com a literatura, a qual apontou a diosgenina como um fitoesteróide

que não causa toxicidade sistêmica, genotoxicidade (RAJU; BIRD, 2007). O monitoramento do peso corporal é um importante indicador para avaliar a toxicidade de uma substância (IATSUNO; BELOVA; LIPKINA, 1978). Por sua vez, não houve nenhuma alteração significativa nos pesos corporais quando observados durante 14 dias após administração oral do Diosg/ $\beta$ -CD. Além disso, não houve mudança no peso relativo dos órgãos internos, bem como nos parâmetros bioquímicos no soro, como uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST); e danos oxidativos hepáticos, foram observados após o tratamento com o Diosg/ $\beta$ -CD quando comparados ao veículo.

O ALT, específico para hepatócitos e o AST, encontrados no fígado, músculo cardíaco e rins, são conhecidos como marcadores de dano celular, especialmente em necrose de hepatócitos (WITTHAWASKUL et al., 2003; RAMAIAH, 2007). Além disso, soro de uréia e creatinina são os mais comumente usados marcadores clínicos de injúria renal em estudos de rotina de toxicidade (SIEBER, 2009). Assim, esses dados permitiram uma escolha segura do uso das doses para protocolos experimentais agudos.

Outrossim, a estrogenerioterapia pode ocasionar exacerbação de asma, diabetes mellitus, epilepsia, enxaqueca, porfiria, lupus eritematoso sistêmico e hemangiomas hepáticos, devendo ser utilizada com ponderação nestas condições. A imobilização, pelo seu risco acrescido de tromboembolismo, é também um fator importante na decisão de iniciar terapia hormonal (SPG, 2016).

Os eventos tromboembólicos são o efeito adverso mais prevalente dos estrogênios orais em mulheres em pós-menopausa recente. O risco aumenta com a idade da mulher (embora seja raro antes dos 60 anos), com a obesidade (IMC  $>30\text{kg/m}^2$ ) e com trombofilias (Baber *et al.*, 2016). Curiosamente, o complexo Diosg/ $\beta$ -CD apresentou efeito antiagregante após 14 dias do uso oral. Mesmo a diosgenina sendo um fitoesteróide, o efeito antiagregante ocorreu possivelmente porque ela não possui atividade estrogênica muito significativa, por não conseguir ser sintetizada ou convertida em esteróides no organismo (RAJU; BIRD, 2007).

Os testes de monitoramento da coagulação envolvem a ativação *in vitro* de partes da cascata de coagulação e medem o tempo até a formação do coágulo (TSENG et al., 2001). O tempo de protrombina (TP) é usado para avaliar as vias extrínseca (fator VII) e comum (fatores X, V, II e I), enquanto o tempo de

tromboplastina parcial ativada (TTPa) é usado para monitorar as vias intrínseca (fatores XII, XI, IX e VIII) e comum (DODDS, 1997; GREEN & THOMAS, 1997; COUTO, 1999)

O fator tecidual, liberado pelo tecido lesionado, causa a ativação do fator VII, que ativa o fator X. A ativação do fator X ocorre depois que o fator VII forma um complexo com o cálcio, e o fator III passa a agir enzimaticamente na presença de fosfolipídios para garantir a ativação (STEFFENELLO-DURIGON et al., 2018).

Na via intrínseca, inicialmente, observa-se a fase de contato, que envolve quatro proteínas distintas. O fator XI adere-se à superfície exposta e é ativado na presença de cininogênio de alto peso molecular (CAPM) pelo fator XII ativado. O fator XI atua sobre o fator IX, ativando-o. O fator IX ativado estimula o fator X ao atuar com o fator VIII ativado, fosfolipídios plaquetários e o fator 3 plaquetário (SANTOS, 2019).

A ativação do fator X na via intrínseca e extrínseca leva à via comum. Nessa via, o fator X ativado combina-se com fosfolipídios e com o fator V para formar o complexo chamado de ativador de protrombina. Esse complexo inicia a ativação da protrombina (fator II) em trombina (fator II ativado). A trombina, por sua vez, converte o fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina. O fator XII catalisa a transformação da fibrina solúvel em insolúvel na presença de cálcio (STEFFENELLO-DURIGON et al., 2018).

O complexo Diosg/ $\beta$ -CD foi capaz de aumentar o TAP, mas não afetou o TTPA, isto sugere que ele atue inibindo os fatores relacionados com a via intrínseca de coagulação, fatores XII, XI, IX e VIII. No entanto, maiores estudos devem ser realizados a fim de investigar o mecanismo pelo qual o complexo de diosgenina faz o referido efeito e aprimorar suas potencialidades para o mercado farmacêutico.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados, pela primeira vez, demonstram evidências convincentes de que a administração oral do Diosg/ $\beta$ -CD produziu efeito anticoagulante em ratas através de alteração no tempo de atuação da via intrínseca de coagulação (TTPA), mas não alterou a via extrínseca (TAP e RNI). Este resultado sugere possível interferência do Diosg/ $\beta$ -CD nos fatores de coagulação XIII, IX, XI ou XII. Assim, este fitoesteróide parece ser uma molécula promissora como uma futura

droga anticoagulante, levando em consideração a combinação de eficácia e segurança. Porém, merecem ser realizados estudos mais aprofundados, a fim de elucidar a via pela qual o mecanismo trombolítico acontece.

## REFERÊNCIAS

BABER, R. J., PANAY, N., e FENTON, A. **2016 IMS Recommendations on women's midlife health and menopause hormone therapy**. 2016.

BAYLIS, C.; ZATZ, R. M. **Chronic nitric oxide inhibition model six years on**. Hypertension, v. 32; p. 958–964. 1998.

CATÁRGENES, M. S. S. **A Investigação dos efeitos tóxicos e anti-hipertensivos de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoneacea)**. Dissertação de Mestrado - UFPB, João Pessoa, 2009.

CHEN, Y.; HUANG, S.; TANG, Z.; CHEN, X.; ZHANG, Z. **Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase**. Carbohydrate Polymeres, v. 85, p. 272-75, 2011.

COUTO, C.G. Clinical approach to the bleeding dog or cat. Vet Med, v.94, p.450-459, 1999.

DAS, S.; DEY, K. K.; DEY, G.; PAL, I.; MAJUMDER, A.; MAITICHOUDHURY, S.; KUNDU, S. C.; MANDAL, M. **Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma**. Plos One, v. 7, n. 10, p. 46641, 2012.

DIAS, K. L. G.. **Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric**. European Journal of Pharmacology, v. 574, p. 172-178, 2007.

DODDS, W.J. Hemostasis. In: KANEKO, J.J. et al. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego : Academic, 1997. Cap.10, p.241-283.

DOWLING, Maritiza et al. **Characterization of vascular disease risk in postmenopausal women and its association with cognitive performance**. PLoS One. V. 17, n. 7, 2013.

ESFANDIAREI, M. *et al.* **Diosgenin modula a função das células do músculo liso vascular, regulando a viabilidade celular, migração e homeostase do cálcio**. J Pharmacology Therapy Experiments, v. 3, p. 925-39, 2011.

GONG, G.; QUIN, Y.; HUANG, W.; ZHOU, S.; WU, X.; YANG, X.; ZHAO, Y.; LI, D. **Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis**. Chemico-Biological Interactions, v. 184, n. 3, p. 366-375, 2010.

GREEN, R.A.; THOMAS, J.S. Distúrbios hemostáticos: coagulopatias e trombose. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária – moléstias do cão e do gato. 4.ed. São Paulo : Manole, 1997. V.2, cap.145, p.2690- 2714.

IATSUNO, A.I.; BELOVA, L.F.; LIPKINA, G.S.; SOKOLOV, S.I.; TRUTNEVA, E.A. Pharmacology of calendulose B, a new triterpene glycoside from the roots of *Calendula officinalis*. *Farmakologija i Toksikologija*, v. 41, p. 197-202, 1978.

JOFFRES, M. **Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in national surveys from England, the USA and Canada, and correlation with stroke and ischaemic heart disease mortality: a cross-sectional study.** *BMJ* Abrir, 2013.

LI, H. **Effects of estrogen and phytoestrogens on endometrial leakage in ovariectomized rats and the related mechanisms.** *Sheng Li Xue Bao*, v. 65, n. 1, p. 8-18, 2013.

LIU, L.; DONG, Y.; XIU, Z. **Extração em três fases da diosgenina e saponinas esteroidais da fermentação de *Dioscorea zingiberensis* CH Wright.** *Bioquímica de Processos*; v. 45, n. 5, p. 752-756. 2010.

NOGUCHI, E.; FUJIWARA, Y.; MATSUSHITA, S.; IKEDA, T., *et al.* Metabolism of tomato steroidal glycosides in humans. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54: 1312, 2006.

OECD. **Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing.** Paris, France, 2000.

OECD. **Organization for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals: acute oral toxicity—acute toxic class method.** Paris, France, no. 420, 2001.

RAJU, J.; BIRD, R. P. **Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells.** *Cancer letters*, v. 255, p. 194-204, 2007.

RAMAIAH, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology*, v.45, p. 1551-1557, 2007.

RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. **Chronic Inhibition Of Nitric Oxide Synthesis. A New Model of Arterial Hypertension.** *Hypertension*, v. 20, p. 298–303. 1992.

SANTOS, Vanessa Sardinha. "Coagulação sanguínea"; *Brasil Escola*. Disponível em <<https://brasilecola.uol.com.br/biologia/coagulacao-sanguinea.htm>>. Acesso em 16 de janeiro de 2019.

SIEBER, M.; HOFFMANN, D.; ADLER, M.; VAIDYA, V.S.; CLEMENT, M.; BONVENTRE, J.V.; ZIDEK, N.; RACHED, E.; AMBERG, A.; CALLANAN, J.J.; MALLY, A. Comparative analysis of novel noninvasive renal biomarkers and metabonomic changes in a rat model of gentamicin nephrotoxicity. **Toxicological Sciences**, v.109, p. 336-349, 2009.

SPG. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. **Conselho Nacional sobre Menopausa 2016**. Portugal, 2017.

STEFFENELLO-DURIGON, G.; CAYCEDO, C. A.; DA LUZ, F. F.; BURIGO, A. C. G. **Guidelines for perioperative management and bleeding in patients using direct oral anticoagulants (NOACs)**. Revista Médica; v. 97, n. 5, p. 476-85, 2018.

TSENG, L.W. et al. Evaluation of a point-of-care coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and activated clotting time in dogs. *Am J Vet Res*, v.62, n.9, p.1455-1460, 2001.

WITTHAWASKUL, P.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTHIKUL, T.; LERTPRASERTUKE, N. Acute and subacute toxicities of the saponin mixture isolated from *Schefflera leucanta* Viguier. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, p. 115-121, 2003.

YAMADA, T.; HOSHINO, M.; HAYAKAWA, T.; OHHARA, H.; YAMADA, H.; NAKAZAWA, T.; INAGAKI, T.; LIDA, M.; OGASAWARA, T.; UCHIDA, A.; HASEGAWA, C.; MURASAKI, G.; MIYAJI, M.; HIRATA, A.; TAKEUCHI, T. **Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats**. *American Journal of Physiology*, v. 273, 355–364, 1997.

ZHANG, D. M.; CHAI, Y.; ERICKSON, J. R.; BROWN, J. H.; BERS, D. M.; LIN, Y. F. **Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes**. *Journal of Physiology*, v. 592, p. 971–990, 2014.



### **CAPÍTULO III**

## **Caracterização e atividade antihipertensiva de complexo Diosg/ $\beta$ -CD em ratas OVX e OVX/L- NAME**

(Artigo será submetido na revista **Biochemical and  
Pharmacology**)

**Qualis: A1 - Biotecnologia**



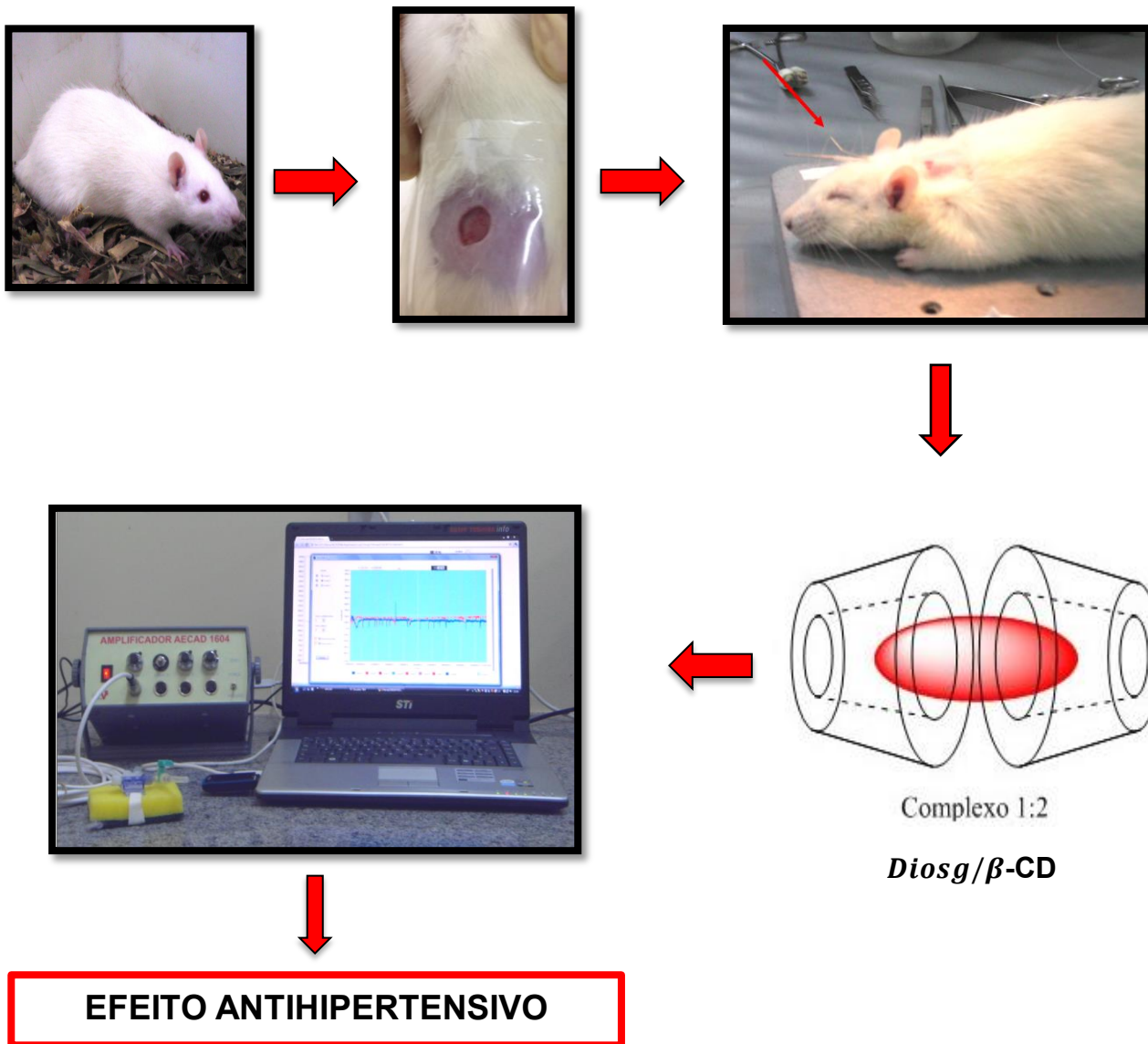
## **Caracterização e atividade antihipertensiva de complexo Diosg/ $\beta$ -CD em ratas OVX e OVX/L-NAME**

### **RESUMO:**

A diosgenina, um componente da *Dioscorea*, é um fitoestrógeno de baixa solubilidade e ampla característica apolar, o que dificulta sua veiculação em meios aquosos. Estudos mostraram que ela apresenta diversos efeitos biológicos, sendo alguns deles: anti-inflamatório, antidiabético, antitumoral e vasodilatador. O presente estudo investigou a viabilidade química de diferentes formulações nanoestruturadas de  $\beta$ -ciclodextrina-diosgenina (Diosg/ $\beta$ -CD) na proporção 2:1, respectivamente. Além de avaliar a atividade antihipertensiva da melhor formulação nanoestruturada em ratas OVX e OVX/L-NAME. Para isto, foram realizadas diferentes formulações do complexo Diosg/ $\beta$ -CD (MF, LIOF e CE) e avaliadas físico-quimicamente quanto ao melhor método de inclusão supramolecular. A formulação que apresentou melhor inclusão da Diosgenina foi a obtida pelo método CE. Consequentemente, os testes biológicos de atividade cardiovascular partiram desta formulação. Para os testes biológicos foram usadas ratas OVX (300 mg / kg, v.o.) e OVX/L-NAME (75, 150 e 300 mg / kg, v.o.). O tratamento com a dose de 300 mg / kg, v.o., do Diosg/ $\beta$ -CD induziu um potente efeito antihipertensivo quando comparado com a mesma dose da Diosgenina isolada. Foi possível comprovar que a atividade antihipertensiva da melhor dose do complexo CE (300 mg / kg, v.o.) não apresentou diferença de resposta, quando comparada com os modelos OVX e OVX/L-NAME. Nossos resultados sugerem que o Diosg/ $\beta$ -CD obtido pelo método CE melhorou a solubilidade da Diosgenina, além da biodisponibilidade desta no animal, de modo a aumentar significativamente a eficácia da formulação nanoestruturada de Diosgenina, e que a atividade antihipertensiva ocorre com efeito similar em animais OVX e OVX/LNAME.

**Palavras-chave:** Diosgenina, OVX, hipertensão,  $\beta$ -ciclodextrina.

## Resumo Gráfico



## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a síntese de novas moléculas e a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas têm sido o método de escolha na obtenção de novas drogas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). No entanto, a dependência da utilização de plantas para a obtenção de medicamentos ainda tem sido grande, mesmo após a utilização de refinadas técnicas de síntese (CHAVES *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais extraídos de espécies de *Solaun* e *Dioscorea* são ricos em sapogeninas esteroides, dentre eles a diosgenina (25R-espirost-5-en-3-β-OH) (ESFANDIAREI *et al.*, 2011). Dentre as espécies de *Dioscorea* mais utilizadas na medicina popular está a *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright (DZW) (HUANG, 2012), de onde é extraído um óleo essencial rico em esteroides. Os óleos essenciais extraídos desta planta são de grande importância nas indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica (ESFANDIAREI *et al.*, 2011; CHE, LIN e LIU, 2015).

Além disso, a diosgenina natural mostrou importante efeito antioxidante e cardioprotetor (MESSINA, 2014). Contudo, novas formulações terapêuticas de uso oral são propostas a fim de superar os inconvenientes farmacocinéticos. Por outro lado, um obstáculo encontrado no uso da diosgenina é a reduzida biodisponibilidade quando administrada por via oral, devido à baixa solubilidade que ela apresenta em meio aquoso, o que dificulta sua formulação farmacêutica (ROGALSKI *et al.*, 2013; BEIG *et al.*, 2013). Uma das alternativas é o uso da nanobiotecnologia, a fim de melhorar a diluição de moléculas apolares em meio aquoso e proporcionar um sistema de liberação direcionado para o sítio da doença, tornando a diosgenina uma aliada em potencial no tratamento de distúrbios cardiovasculares, a exemplo da hipertensão arterial (GUEDES *et al.*, 2008).

Para tal estudo, o uso de modelos de hipertensão induzida em ratos, como o modelo por inibição da síntese de NO, através da administração de NG-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), é bastante reproduzido para o estudo da hipertensão arterial sistêmica (RIBEIRO *et al.*, 1992; BAYLIS *et al.*, 1998). Estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram de maneira evidente a menor prevalência de hipertensão arterial (HA) em mulheres no período fértil, quando comparados aos homens de mesma idade (LLOYD-JONES *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2015; SPG, 2017).

Após a menopausa, período de regressão abrupta dos níveis de hormônios sexuais femininos, ocorre um aumento no número de mulheres hipertensas (DOWLING *et al.*, 2013). Pesquisas experimentais com diferentes modelos de HA (LI, 2013) demonstram que os hormônios femininos podem proteger contra as complicações da hipertensão arterial (ZHOU *et al.*, 2015). O início da equivalência nas taxas de eventos cardiovasculares entre os sexos coincide com o advento da menopausa e, conseqüentemente, da privação estrogênica (DIAS, 2007).

Entretanto, a menopausa também pode ser resultante de ovariectomia bilateral cirúrgica, realizada na mulher em idade fértil (BASSAM, 1999). O modelo experimental que simula a menopausa em ratas é a extração bilateral cirúrgica dos ovários das fêmeas, o qual reproduz conseqüências metabólicas semelhantes às que acontecem em mulheres na menopausa, incluindo privação estrogênica, obesidade e osteoporose (BACELAR-ANTUNES, 2005; SHI-HUA *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é investigar a viabilidade química de diferentes formulações nanoestruturadas com  $\beta$ -ciclodextrina e diosgenina, a fim de avaliar o potencial farmacológico e terapêutico do fitoestrógeno diosgenina e do complexo  $\beta$ -ciclodextrina+diosgenina (Diosg/ $\beta$ -CD) voltado para a atividade antihipertensiva, utilizando ratas hipertensas e ovariectomizadas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

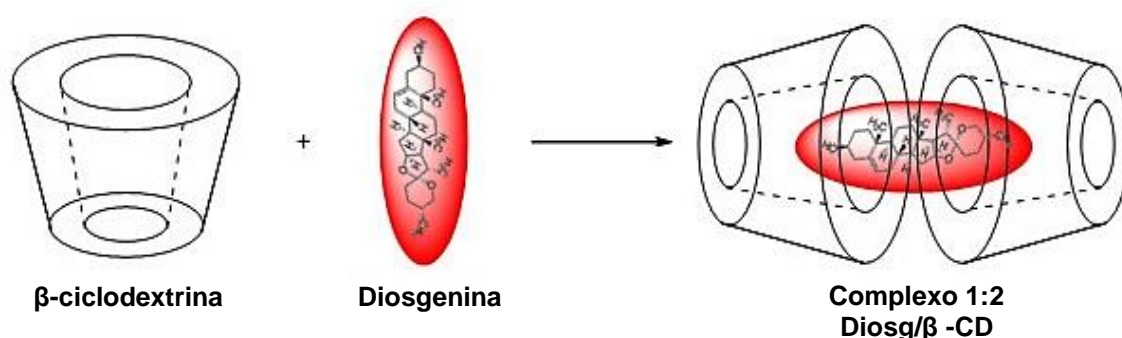
### **2.1 Preparo dos complexos de inclusão**

As amostras foram obtidas pelos métodos da mistura física (MF), liofilização (LIOF) e co-evaporação (CE) e avaliadas físico-quimicamente quanto ao melhor método de inclusão supramolecular. Para tal, foram pesados 0,414 g de diosgenina e 2,270 g da  $\beta$ -ciclodextrina na razão molar de 2:1 (Figura 11), baseado no peso molecular dos constituintes da formulação. Uma mistura mecânica destes componentes foi realizada para preparar a MF. No método CE, foi utilizada a mesma proporção de amostra, com adição de 20 mL de água destilada. A suspensão foi submetida a agitação e temperatura ambiente durante 36 h. Em seguida, a formulação foi submetida a secagem em dessecador de vidro, com sílica gel. A amostra obtida por LIOF seguiu procedimento inicial similar ao da CE. Após 36h de agitação, a

amostra foi congelada por 24 h e em seguida liofilizada a  $-50^{\circ}\text{C}$  (Liofilizador Labconco®, Kansas City, MO, USA).

Na sequência, as amostras foram caracterizadas pelas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), eficiência de encapsulação (EE) e eficiência de carga (EC).

**Figura 11:** Complexo de Diosgenina com beta ciclodextrina na proporção de 1:2, a partir de teste computacional utilizando o programa Gaussian.



Fonte: (Autoria própria, 2019)

## 2.2 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 180-220g (05 animais por grupo), provenientes do Biotério Central e do biotériodo NPPM/UFPI, mantidos sob condições ambientais de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água (Figura 12).

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí - UFPI (Projeto n. 069/2014). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estiveram em conformidade com a Resolução Nº 1000, de 2012 do CFMV. Todos os resíduos biológicos e químicos utilizados nesse estudo foram descartados de acordo com as normas estabelecidas pela UFPI.

**Figura 12:** *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar provenientes do biotério da UFPI.



Fonte: SILVA-FILHO (2011)

### **2.3 Indução de regressão hormonal – Ovariectomia (OVX)**

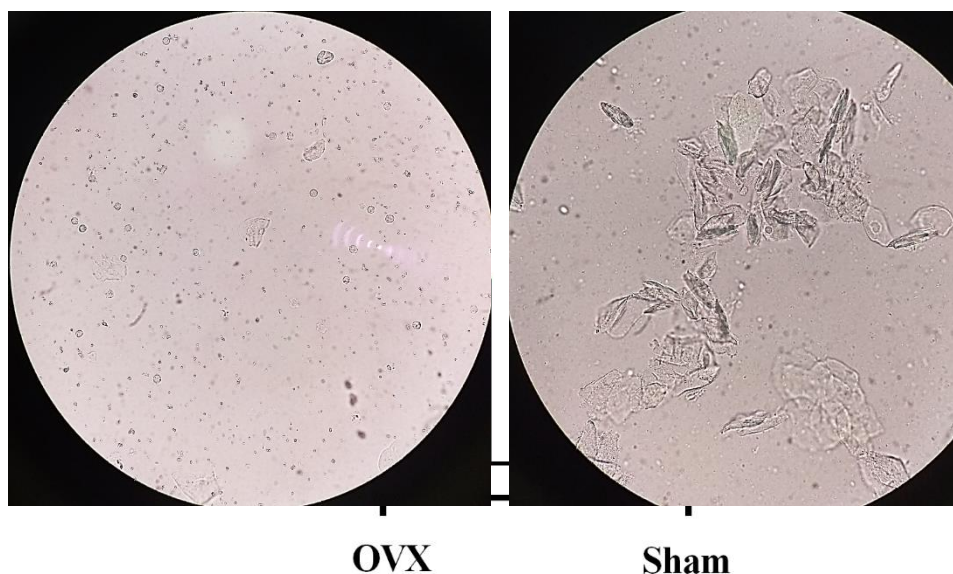
A regressão hormonal característica da pós-menopausa foi induzida pelo procedimento cirúrgico de ovariectomia (OVX). Ressalte-se que foram utilizados todos os métodos para prevenção de infecção e mínimo de submissão do animal ao estresse. Os anestésicos cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p) e cloridrato de xilazina (14 mg/ kg, i.p) foram administrados e, posteriormente, os flancos direito e esquerdo foram tricotomizados e assepsiados. Com o animal em decúbito lateral, fez-se uma pequena incisão através da pele e da musculatura abdominal entre o bordo superior da coxa e a última costela. Através desse orifício, o ovário foi identificado e exteriorizado. Realizou-se um ponto de ligadura nas tubas uterinas e artérias ováricas, a fim de evitar sangramentos excessivos, e então os ovários foram removidos. As tubas uterinas foram reposicionadas dentro do abdômen, e realizadas a sutura local (RIBEIRO *et al*, 2011; AYDIN, 2013).

## 2.4 Citologia vaginal

A citologia vaginal é um método indireto para avaliação das funções endócrinas referentes ao sistema reprodutivo feminino (RIBEIRO *et al*, 2011). Após 15 dias de cirurgia, realizou-se o esfregaço vaginal nas ratas OVX. O material para a citologia vaginal foi colhido com uma micropipeta de 50 $\mu$ L, introduzida no fundo vaginal, com a realização da injeção de água destilada no orifício e retirando a quantidade do líquido para captura da descamação das células epiteliais e em seguida, despejou-se na lâmina de vidro para análise microscópica *in loco* (DINIZ *et al.*, 2011).

Após 60 dias de ovariectomia, foi realizado novamente o esfregaço vaginal para constatação de hipoestrogenismo (diestro I e II) ou fase anestra (Figura 13). As ratas que se apresentavam nessas condições foram utilizadas no estudo.

**Figura 13:** Fotomicrografia das lâminas de lavado vaginal de rata fixado com álcool 95%, não - corado (aumento de 10x com seu correspondente em 40x), após 60 dias da retirada dos ovários. Período diestro II, representada pela presença majoritária de leucócitos e ausência de células cornificadas. Lavado vaginal em rata OVX, à esquerda, e em rata Sham, à direita.



Fonte: Autoria própria (2018)

## 2.5 Tratamento

Estudos de administração oral foram realizados para comparar os parâmetros farmacocinéticos e de bioequivalência de diosgenina e complexo Diosg/ $\beta$ -CD. Desse modo, segundo quantidade de diosgenina utilizado no estudo (OKAWARA *et al.*, 2013), os animais foram divididos em 7 grupos (5 animais por grupo):

- *Grupo 1* – Ovariectomizado (OVX) + Veículo;
- *Grupo 2* – OVX/L-NAME + Veículo;
- *Grupo 3* – OVX/L-NAME + Diosg/ $\beta$ -CD – (75 mg/kg, v.o);
- *Grupo 4* – OVX/L-NAME + Diosg/ $\beta$ -CD – (150 mg/kg, v.o);
- *Grupo 5* – OVX/L-NAME + Diosg/ $\beta$ -CD (300 mg/kg, v.o);
- *Grupo 6* – OVX + Diosg/ $\beta$ -CD (300 mg/kg, v.o);
- *Grupo 7* – OVX/L-NAME + Diosgenina - (300 mg/kg, v.o).

## 2.6 Indução da hipertensão pela inibição da enzima sintase de óxido nítrico (NO) com L-NAME

Foram utilizadas ratas normotensas, pesando aproximadamente 250 gramas, as quais receberam L-NAME (N<sub>G</sub>-Nitro-L-arginina metil éster) na dose de 100 mg/kg (v.o), por meio de gavage durante 7 dias consecutivos e sempre no mesmo período matinal, tempo suficiente para instalação da hipertensão arterial (DANANBERG *et al.*, 1993).

Os animais foram divididos em grupos e tratados conforme supracitado no tópico de tratamento.

## 2.7 Avaliação da atividade hipotensora e anti-hipertensiva em ratas não anestesiadas

Os animais foram anestesiados, com cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p) e cloridrato de xilazina (14 mg/ kg, i.p), para procedimento cirúrgico que consistiu na implantação de cateter de polietileno (PE), um segmento de cateter PE-10 (comprimento de 4 cm e diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) foi soldado a um segmento de cateter PE-50 (comprimento em torno

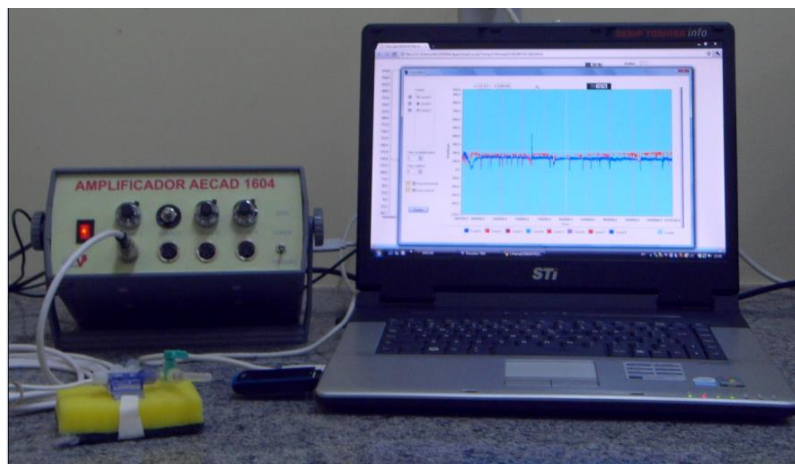


de 15 cm e diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente). Em seguida, fez-se a implantação do cateter na aorta abdominal, via artéria femoral esquerda. Após a inserção e fixação, o catéter arterial foi preenchido com solução salina heparinizada, tunelizado subcutaneamente e exteriorizado através de incisão na região cervical posterior (*scapulae*) do animal (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

A PA e FC foram medidas 24 horas após o ato cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Fabricante: Edwards Life Sciences; Modelo PX 600; Chicago-IL, EUA) acoplado a um amplificador (AECAD 1604, AVS Projetos, São Paulo, SP, Brasil) conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (Fabricante: AECAD instruments; Modelo: DI 148U, Akron, OH, EUA) e com o programa AQCAD 2.1.8, (AVS Projetos, São Paulo, SP, Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca) (Figura 14).

Todo procedimento de monitoramento cardíaco foi feito 7 dias após o início da administração de L-NAME por gavagem (ZATZ; BAYLIS, 1998). As medições de PAM e FC foram realizadas conforme descrito por Lahlou, (2002). Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação em uma sala isolada e livre de estresse por um período de no mínimo 30 minutos para estabilização dos parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram divididos em sete grupos, com cinco animais cada (conforme item de 2.5). Após 30 minutos, os animais receberam solução salina, Diosgenina ou Diosg/ $\beta$ -CD, por via oral. Os valores da PA e FC foram registrados nos tempos 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 minutos após a administração. Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base) e após a administração da Diosgenina ou Diosg/ $\beta$ -CD e suas variações foram expressas em porcentagem para cada dose.

**Figura 14:** Aparato utilizado para aquisição dos valores de PAM e FC em ratos.



Fonte: SILVA-FILHO (2011)

## 2.8 Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). As análises estatísticas foram realizadas através da aplicação do Teste  $t$  de “Student” para amostras não-pareadas, para avaliar a significância das diferenças entre as medias foi utilizada analise de variância ANOVA de uma-via ou duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando o valor obtido para “ $p$ ” foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). As curvas foram obtidas através de regressão não-linear com variação da inclinação da curva (*slope* variável). Toda a análise estatística e plotagem das curvas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prim<sup>®</sup> 7.0 (GraphPad Software, San Diego,CA, E.U.A.).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de respaldar cientificamente o melhor modelo de vetorização da Diosgenina em composto nanoestruturado ( $\beta$ -ciclodextrina) e o efeito do fitoestrógeno diosgenina e do complexo  $\beta$ -ciclodextrina-Diosgenina (Diosg/ $\beta$ -CD) sobre a função cardiovascular em modelo de menopausa

induzida por ovariectomia (OVX) e hipertensão (L-NAME) em ratas, por meio de um tratamento agudo, por via oral (v.o.), bem como verificar o(s) possível(eis) efeitos somáticos de ganho de peso envolvido(s) na pós menopausa induzida por ovariectomia.

O modelo de indução da menopausa através da ovariectomia escolhido perfaz o quadro clínico clássico de privação hormonal, com aumento de substâncias deletérias no organismo e redução da capacidade de eliminá-las, assemelhando-se a síndrome metabólica (ZHOU *et al*, 2015).

Neste estudo, verificou-se diferentes técnicas de inclusão de Diosgenina em  $\beta$ -ciclodextrina e o complexo que apresentou melhor desempenho supramolecular e de solubilidade foi escolhido para os testes de atividade biológica cardiovascular. Para isto, o efeito do Diosg/ $\beta$ -CD foi estudado utilizando a abordagem metodológica *in vivo*, para avaliação da pressão arterial em ratas OVX hipertensas L-NAME não anestesiadas (FLUCKIGER *et al.*, 1985).

Uma das principais descobertas deste trabalho foi que diferentes técnicas de vetorização afetaram positivamente a solubilidade da Diosgenina e, portanto, a veiculação desta no animal. Entre as formulações de Diosg/ $\beta$ -CD a que apresentou melhor solubilidade foi a feita pelo método CE. E demonstrou-se pela primeira vez que o Diosg/ $\beta$ -CD, em administração aguda por via oral, reduz a PA em ratas OVX hipertensas L-NAME, conferindo notória atividade biológica. Por outro lado, a Diosgenina isolada não apresentou atividade antihipertensiva.

A solubilidade é um fator importante na comercialização de fármacos, uma vez que é determinante para a biodisponibilidade e perfil terapêutico, devendo ser um parâmetro essencial no processo de seleção de candidatos a novos medicamentos (LIMA *et al.*, 2008).

A taxa de solubilidade e dissolução dos ingredientes ativos são de fundamental importância em estudos de preformulação das formas farmacêuticas. (SOARES-SOBRINHO *et al.*, 2010b). Para que um medicamento seja absorvido, deve estar presente na forma de uma solução aquosa no local da absorção. Se determinado fármaco é insolúvel ou muito pouco solúvel, tal propriedade coloca-se como um problema na dissolução e absorção. Assim, a solubilidade aquosa de fármacos é de importância central na descoberta e desenvolvimento de medicamentos, desde a concepção molecular até a formulação farmacêutica (FENICAL *et al.*, 2009).

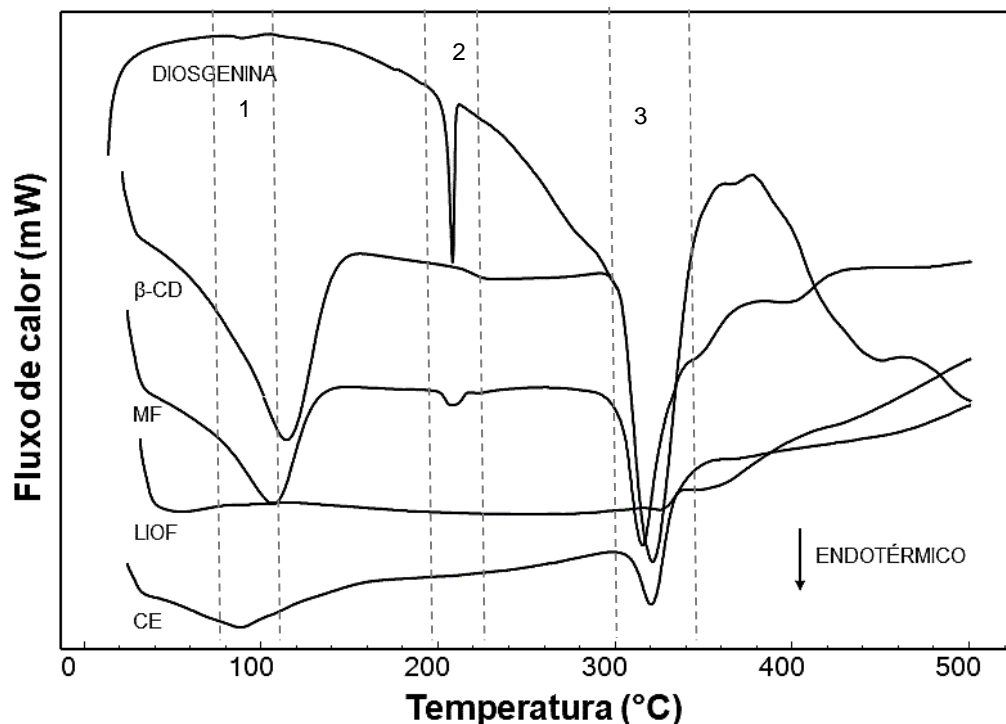
Na indústria farmacêutica, as ciclodextrinas têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes, por aumentar a solubilidade, dissolução dos fármacos pouco solúveis, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, além de prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; GUEDES *et al.*, 2009).

Existem várias estratégias para delinear uma forma farmacêutica de liberação modificada e os estudos de caracterização auxiliam no screen de novos fármacos promissores (SABINO, 2011). No processo de validação da nanoformulação de Diosg/ $\beta$ -CD como ferramenta medicamentosa para administração por via oral em animais, foi realizada a caracterização do complexo, por meio da determinação dos parâmetros de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), percentual de perda de massas e análise em microscopia eletrônica de varredura.

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização de moléculas, principalmente pela rapidez das análises. Dentre os mais utilizados, tem-se a DSC, que permite a detecção quantitativa de todos os processos que envolvem variação de entalpia, além de TG (FIGUEIRAS *et al.*, 2007; SOARES-SOBRINHO *et al.*, 2011).

A curva DSC da diosgenina livre apresentou um evento endotérmico em 205 °C, característico da sua fusão, corroborando assim com o dado relatado previamente na literatura (WANG *et al.*, 2016). A curva da Diosg/ $\beta$ -CD apresentou dois eventos endotérmicos, atribuídos a desidratação (115 °C) e fusão (321 °C), respectivamente, conforme já descrito por Giordano e colaboradores (2001) (GIORDANO *et al.*, 2001). A MF apresentou os mesmos eventos descritos para a Diosg/ $\beta$ -CD, indicando que não houve complexação do fármaco. No que concerne aos métodos LIOF e CE, respectivamente, foram observadas reduções na intensidade dos eventos de desidratação e fusão descritas para a molécula hospedeira (Diosg/ $\beta$ -CD), conforme ilustrado nos picos 1, 2 e 3 da Figura 15. Este resultado sugere a formação de novas interações moleculares que conduziram a uma alteração nos perfis térmicos dos complexos de inclusão.

**Figura 15:** Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da diosgenina complexada em  $\beta$ -ciclodextrina (Diosg/ $\beta$ -CD), mistura física (MF), e respectivos complexos de inclusão obtidos por liofilização (LIOF) e co-evaporação (CE) sob atmosfera inerte de hidrogênio.



Fonte: Autoria própria (2018)

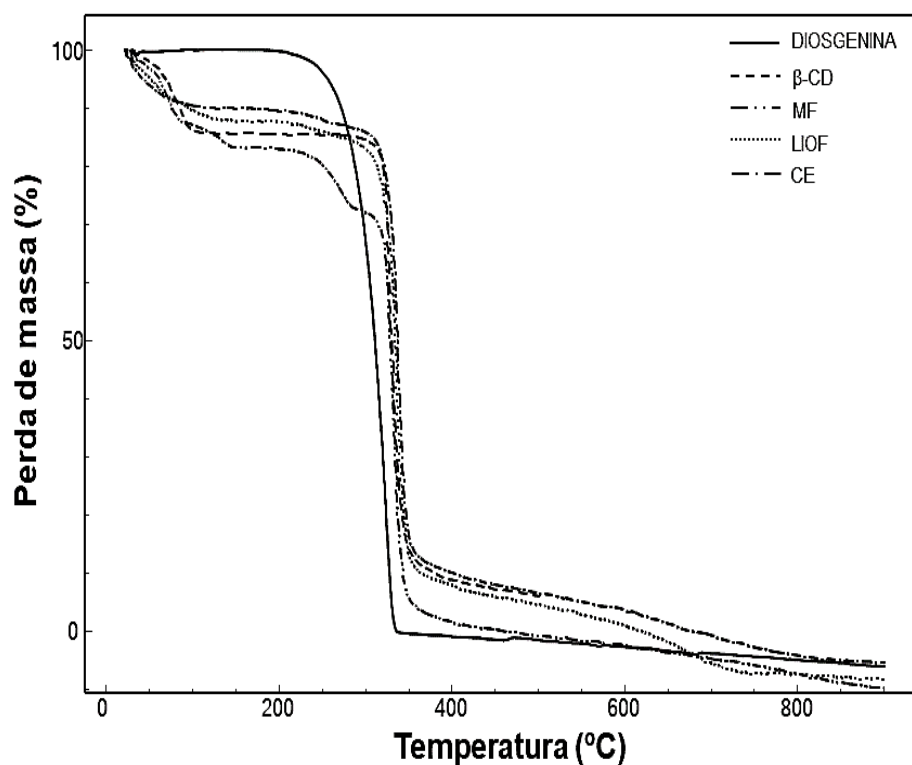
A Tabela 7 apresenta o percentual de perdas de massa das amostras obtidos por TG. A evidência da complexação se deu na última etapa (401-900°C), na qual não houve perda de massa para a diosgenina, conforme esperado. Contudo, nos métodos de inclusão, foi observada uma perda de 11,55 % para o método CE. Além disso, foi observado que a complexação aumentou a temperatura de degradação do fármaco (de 336 °C para a diosgenina livre e 370 °C após complexada), especialmente no método CE. Esse dado evidencia que a formação do complexo de inclusão, sobretudo por esse método, aumenta a estabilidade térmica do fármaco. Dados semelhantes foram encontrados por Carvalho e colaboradores em estudo de complexação do acetato de hecogenina com Diosg/ $\beta$ -CD (2:1), no qual a estabilidade térmica aumentou em 21,45% (CARVALHO *et al.*, 2017).

**Tabela 7:** Percentuais de perdas de massa das amostras em diferentes faixas de temperatura obtidos por Termogravimetria (TG).

Amostra	Perda de massa (%)				Temperatura de degradação (°C)
	30 - 100°C	101 - 284°C	285 - 400°C	401-900°C	
Diosgenina	0,00	16,86	83,14	-	336
Diosg/ $\beta$ -CD	13,54	0,83	76,59	9,04	352
MF	13,02	13,96	71,37	1,65	352
LIOF	8,41	5,13	76,48	9,98	355
CE	8,26	3,63	76,56	<b>11,55</b>	<b>370</b>

Fonte: Autoria própria, 2018.

**Figura 16:** Curvas de Termogravimetria (TG) da diosgenina,  $\beta$ -ciclodextrina (Diosg/ $\beta$ -CD), mistura física (MF), e respectivos complexos de inclusão obtidos por liofilização (LIOF) e co-evaporação (CE) sob atmosfera inerte.

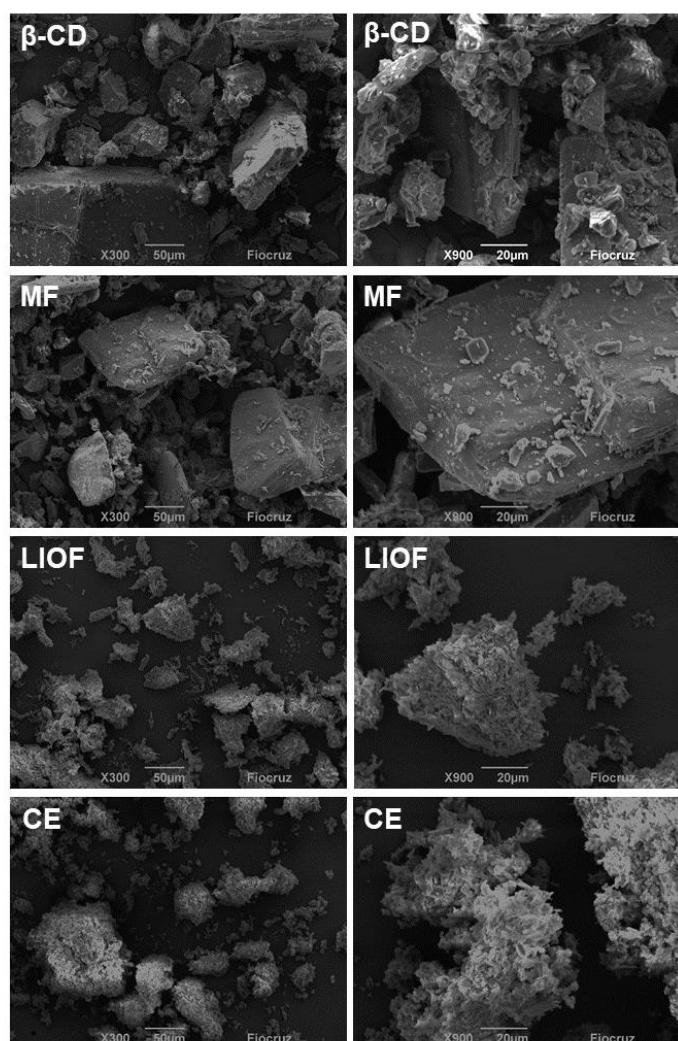


A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é utilizada em diversas áreas científicas e permite o conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais, facilitando a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos. O uso desta técnica fornece informações detalhadas, com aumento de até 300.000 vezes, do estado de cristalização de produtos obtidos por diferentes técnicas de complexação em nanopartículas (RIBEIRO *et al.*, 2008; SOARES-SOBRINHO *et al.*, 2010b). Através de MEV, pode-se observar e caracterizar o perfil de cristalização de partículas, quando complexadas com várias ciclodextrinas, através de mudanças morfológicas nas partículas, caracterizando um impacto importante no perfil de dissolução (SOARES-SOBRINHO *et al.*, 2010b).

No que se refere à MEV (Figura 17), foram observados cristais retangulares de larga extensão para as amostras de  $\beta$ -ciclodextrina e MF. Todavia, nas amostras obtidas por LIOF e CE, foram observados aglomerados de partículas de formas não definidas e tamanhos inferiores quando comparados com a  $\beta$ -ciclodextrina e a MF, método incapaz de formar complexo de inclusão com a diosgenina, tendo em vista que não houve alteração morfológica em relação a macromolécula livre (CARVALHO *et al.*, 2017; FILHO *et al.*, 2018). Diante disto, pode-se inferir que LIOF e CE (Figura 16 - CE) exibiram melhor perfil de complexação, pois apresentaram cristais menores e disformes em relação à mistura física.

De forma geral, os métodos LIOF e CE foram eficientes para complexar a diosgenina na razão molar de 2:1, todavia a CE exibiu melhor performance no aumento da estabilidade térmica do fármaco. Somado a isso, CE apresentou também melhor solubilidade em água. Por estas razões, os estudos farmacológicos para atividade antihipertensiva foram conduzidos com as amostras obtidas por CE.

**Figura 17:** Microscopia eletrônica de varredura da  $\beta$ -ciclodextrina, mistura física, liofilizado e co-evaporado, obtida nos aumentos de 300 e 900x.

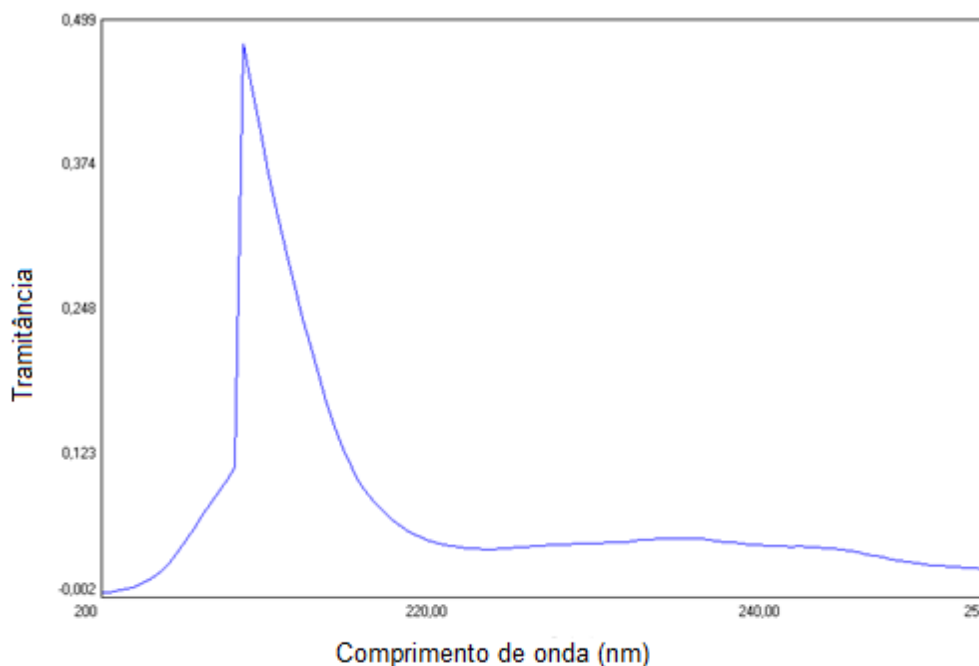


Fonte: Autoria própria, 2018.

Com a finalidade de conhecer as características de absorvidade molecular do composto para propor a técnica de doseamento espectrofotométrico, o fitoesteróide Diosgenina foi avaliado por varredura espectrofotométrica na região UV-VIS em espectrofotômetro T80 e T80+ - PG Instruments Limited, utilizando solvente metanol (Grau HPLC) na concentração de 100  $\mu$ g/mL, e avaliado na faixa de 200 a 300 nm com intervalos de 0,5 nm. Através disso, foi verificado que o pico característico na faixa de 210,0 nm aponta o melhor comprimento de onda a ser utilizado para a validação e quantificação do esteroide Diosgenina (Figura 18).



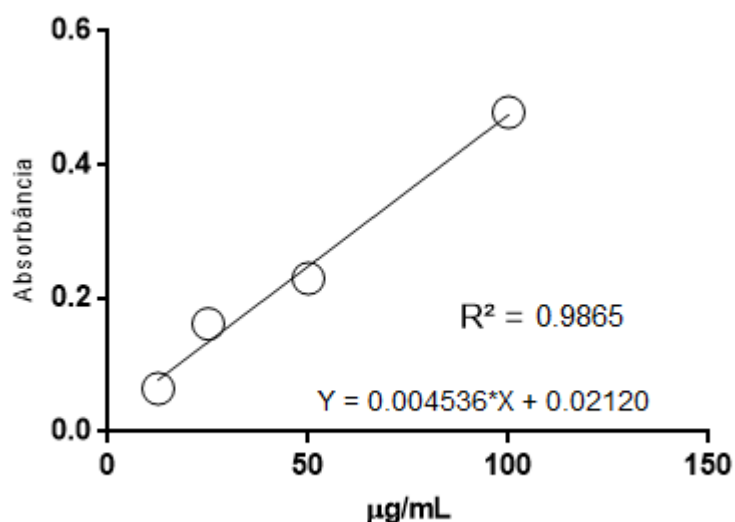
**Figura 18:** Dados da varredura espectrofotométrica do ultravioleta visível da Diosgenina.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Com o intuito de conhecer a faixa de trabalho para a quantificação espectrofotométrica, uma curva de calibração foi feita para delimitar os limites de quantificação e caracterizar uma faixa de concentrações de trabalho que possuam linearidade nas análises através desta técnica. A curva de calibração foi realizada em diluições da Diosgenina (Pó branco, levemente amarelado com característica amorfa e apresentando higroscopicidade perceptível) em metanol (dissolução viabilizada por banho ultrassônico) nas concentrações de 100; 25; 12,5; 6,25;  $\mu\text{g/mL}$  através de espectrofotômetro UV-VIS (T80 e T80+ - PG Instruments Limited) no comprimento de 210,0 nm. Conforme expresso na Figura 19, a técnica é linear obtendo um coeficiente de linearidade  $>0,98$  (com aproximação relativa a 0,99).

**Figura 19:** Curva de Calibração para estabelecer a relação “ Concentração versus Absorbância” em 209,0 nm.



Fonte: Autoria própria, 2018.

**Tabela 8:** Dados da curva de calibração.

$\mu\text{g/mL}$	Absorbancia1	Absorbancia2	Absorbancia3
100,000	0,478	0,482	0,476
25,000	0,229	0,232	0,229
12,500	0,161	0,160	0,164
6,250	0,061	0,070	0,064

Fonte: Autoria própria, 2018.

Para o doseamento propriamente dito, foram feitas três análises independentes de alíquotas de extratos da diosgenina de dentro da matriz da  $\beta$ -Cilodextrina (Tabela 8). Finalizados os testes foram realizados os cálculos de eficiência de encapsulamento (E.E.) e eficiência de carga (E.C.). Constatou-se que a E.E foi de aproximadamente 47,54%, o que significa dizer que esse percentual representa a quantidade de Diosgenina que sofreu encapsulamento no processo de complexação com a  $\beta$ -ciclodextrina. Do mesmo modo, o teor de Diosgenina dentro do complexo,

representado pela E.C, foi avaliado e verificou-se que a quantidade de Diosgenina foi de apenas 7,13% (Tabela 9). A partir dos dados obtidos, partiu-se para os testes biológicos com o derivado nanoestruturado de Diosgenina.

**Tabela 9:** Eficiência de encapsulação e eficiência de carga (teor) da Diosgenina no complexo desenvolvido.

	E.E. (%)	E.C (%)
$\beta$ -Ciclodextrina (Diosgenina)	47,54 $\pm$ 1,7 %	7,13 $\pm$ 0,25 %

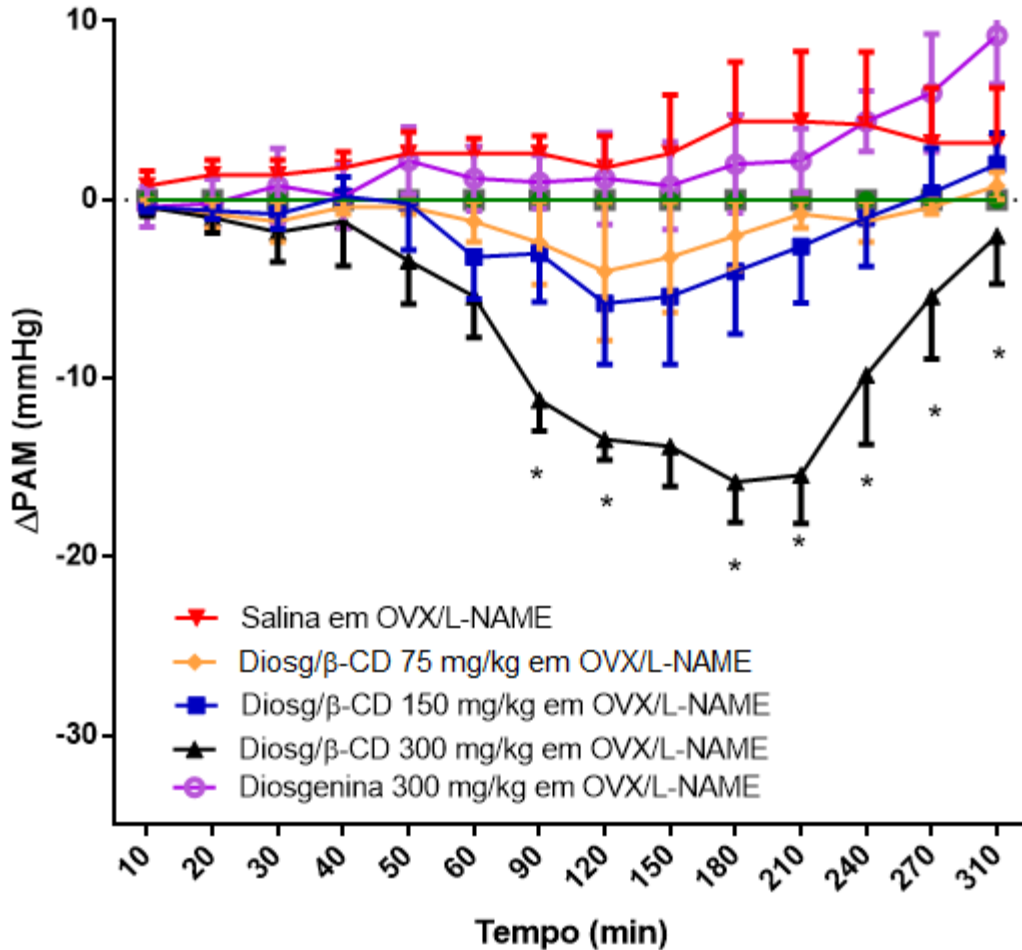
Fonte: Autoria própria, 2018.

Legenda: E.E.: Eficiência de encapsulação; E.C; Eficiência de carga; sinônimo de teor de fármaco presente na formulação.

A Diosgenina é um fitoestrógeno e tem sido estudada devido às várias aplicações práticas e potenciais no mundo oriental. Há relatos na literatura que a diosgenina possui efeito anti-inflamatório (YAMADA *et al.*, 1997), além de alterar as atividades mecânicas do miocárdio, provavelmente, através da modulação do fluxo de cálcio extracelular através da membrana plasmática (AU *et al.*, 2004) e promover efeito vasorelaxante em artéria aorta de ratas OVX (MOURA, 2016). No entanto, são ausentes os estudos que investigam o efeito antihipertensivo da diosgenina e Diosg/ $\beta$ -CD em modelo de menopausa induzida por ovariectomia.

Nesse contexto, testes laboratoriais *in vivo* foram capazes de demonstrar que o Diosg/ $\beta$ -CD reduziu de forma significativa a pressão arterial (PA) de ratas OVX hipertensas (L-NAME) na dose de 300 mg/kg, v.o. (Figura 19), enquanto a mesma dose da Diosgenina isolada não apresentou efeito cardiovascular algum. É importante ressaltar que a dose de 300 mg do Diosg/ $\beta$ -CD possui apenas 7,13% de Diosgenina (Tabela 9), ou seja, 21,39 mg/kg do fitoestrógeno. Além de aumentar a solubilidade, o complexo da diosgenina com ciclodextrina aumentou a biodisponibilidade desta no animal, conferindo expressivo efeito biológico, contrapondo a ausência de efeito em animais tratados com a Diosgenina livre (Figura 20).

**Figura 20:** Efeito do Diosg/ $\beta$ -CD e Diosgenina sobre a PAM em ratas OVX/L-NAME (hipertensas) não-anestesiadas. Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m de 4 experimentos \* $p < 0,05$ ; ANOVA, teste de Tukey,  $n=5$ ; OVX e OVX/L-NAME tratadas (Diosg/ $\beta$ -CD) versus controle (salina).



Fonte: Autoria própria, 2018.

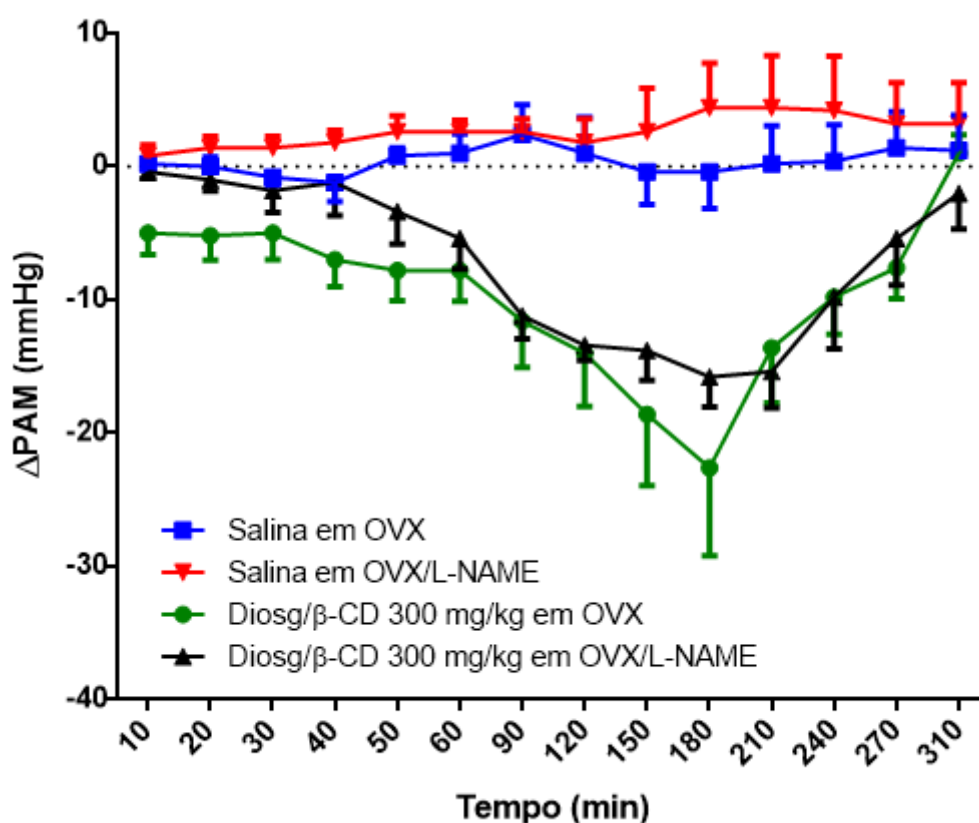
Estudos epidemiológicos mostram que mulheres na pré-menopausa têm menos propensão à hipertensão e a doenças cardiovasculares do que os homens da mesma idade (LLOYD-JONES *et al.*, 2010). Entretanto, após a menopausa, a incidência de doenças coronarianas e hipertensão aumentam mais nas mulheres que nos homens na mesma faixa etária (RECKELHOFF, 2001; ZHOU *et al.*, 2015).

Isso pode ocorrer porque os efeitos do estrogênio sobre o sistema cardiovascular podem estar relacionados à sua ação central no sistema nervoso autônomo (SALEH, CONNELL, SALEH, 2000), à inibição da formação e/ou ação de substâncias vasoconstritoras, como as prostaglandinas (PG)  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>) e  $F_{2\alpha}$  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) (Dantas *et al.*, 1999) e angiotensina II (TAKEDA-MATSUBARA *et al.*, 2002), e à ação

direta sobre os vasos sanguíneos, reduzindo a pressão arterial (MURPHY; KHALIL, 2000) por meio da liberação de potentes substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO) (TOSTES *et al.*, 2003).

Nesse contexto, buscou-se entender se o modelo de indução da hipertensão usado poderia afetar o efeito farmacológico da nanoformulação, uma vez que a hipertensão L-NAME atua inibindo parte da liberação endógena de NO e simula a hipertensão essencial (SARAVANAKUMAR e RAJA, 2011). Para isto, a melhor dose do Diosg/ $\beta$ -CD foi testada em ratas OVX normotensas e hipertensas (L-NAME). O complexo apresentou resposta anti-hipertensiva semelhante em ambos os modelos, demonstrando que ele é eficiente em ratas na menopausa normotensa ou hipertensa (Figura 21).

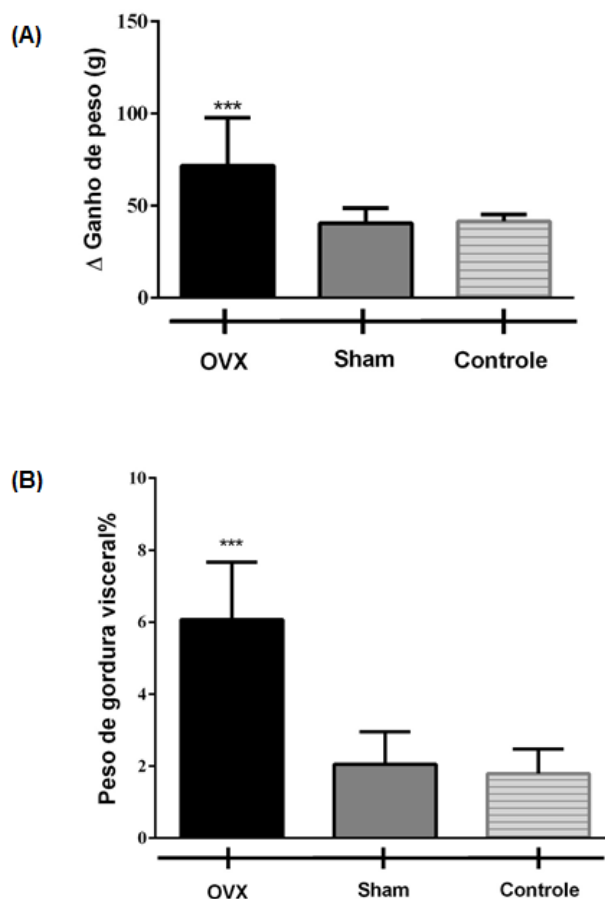
**Figura 21:** Efeito do Diosg/ $\beta$ -CD sobre a PAM em ratas OVX e OVX/L-NAME (hipertensas) não-anestesiadas. Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m de 4 experimentos \* $p < 0,05$ ; ANOVA, teste de Tukey,  $n=5$ ; OVX e OVX/L-NAME tratadas (Diosg/ $\beta$ -CD) *versus* controle (salina).



Fonte: Autoria própria, 2018.

Dentre os efeitos negativos da deficiência de estrogênio, destacam-se os relacionados ao peso corporal, com alterações no perfil lipídico. Inicialmente, avaliou-se o parâmetro de peso corporal e observou-se uma elevação deste, característica comum na privação hormonal. Isso ocorre, porque a ovariectomia é um procedimento que induz aumento de massa corporal devido à remoção abrupta e permanente dos hormônios femininos (SHEN, 2014; BABER, PANAY e FENTON, 2016), os quais utilizam colesterol como fonte de síntese. Com a ovariectomia, ocorre a redução do metabolismo, da quantidade de massa magra, e do gasto energético no exercício, além de estimular o acúmulo de gordura no tecido adiposo, contribuindo para o maior risco de obesidade (POEHLMAN e TCHERNOF, 1998; STUENKEL, 2015; SPG, 2017), justificando o aumento de peso nas ratas OVX (Figura 22A).

**Figura 22:** Avaliação de peso corporal (A) e gordura visceral (B) das ratas normais, Sham e OVX, após 60 dias da ovariectomia. ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de Tukey,  $n=6$ ).



O estrógeno tem influência sobre o metabolismo, especialmente o de lipídios e carboidratos, favorecendo o acúmulo de gordura (CAMARA *et al.*, 2014). Além do aumento no peso corporal total (obesidade global), a privação estrogênica na menopausa tem sido associada a um maior acúmulo de gordura no abdômen (obesidade abdominal). Inúmeros estudos relatam a influência da transição menopausal nas mudanças desfavoráveis na distribuição de gordura corporal, contribuindo para explicar o maior risco cardiovascular em mulheres nessa fase da vida (POEHLMAN e TCHERNOF, 1998; TOTH *et al.*, 2000; GAMBACCIANI *et al.*, 2001). A Sociedade Brasileira de Cardiologia enfatiza a nítida correlação entre a obesidade e o risco de doença cardiovascular (DCV), (SANTOS *et al.*, 2002) principal causa de morte hospitalar entre as brasileiras (BRASIL, 2017).

Neste estudo observou-se que, em relação ao desenvolvimento ponderal, houve o aumento da massa corporal encontrado no grupo OVX salina devido à idade (60 dias) e à condição de regressão hormonal (Figura 22). Os grupos sham e ovariectomizados mantiveram o aumento de massa corporal esperado para a fase de vida (60 dias), provavelmente em decorrência da normal função metabólica e hormonal (MORAIS, 2015). A avaliação do estro ocorreu pela citologia vaginal e verificação do ganho de peso ponderal, na qual não foi evidenciado nos grupos sham e salina. Para entender se o ganho ponderal estava relacionado ao ganho de gordura corporal ou visceral, foi feita a remoção e pesagem da gordura visceral das ratas normais e OVX. Com isso, observou-se que o ganho de peso ponderal estava diretamente ligado ao aumento de gordura visceral (Figura 22B). De acordo com a literatura, o aumento de gordura visceral está diretamente relacionado com a regressão hormonal ocorrida na pós menopausa (FRANÇA *et al.*, 2008), bem como ao risco de desenvolvimento de síndrome metabólica e DCV (Brasil, 2017).

Este resultado, traz luz aos problemas metabólicos sofridos pelas mulheres na pós menopausa, porém merecem ser realizados estudos mais aprofundados nesse, a fim de elucidar outras patologias que também podem estar relacionadas à síndrome metabólica na regressão estrogênica.

## 4 Conclusão

Os resultados do presente trabalho sugerem que o complexo Diosg/ $\beta$ -CD, feito pelo método CE, melhorou a solubilidade da Diosgenina em água, ampliando a biodisponibilidade desta no animal, e aumentou significativamente a eficácia biológica do complexo. Além de demonstrar que a atividade antihipertensiva do complexo Diosg/ $\beta$ -CD ocorreu com efeito semelhante em animais OVX e OVX/LNAME.

## REFERÊNCIAS

- AU, A. L. S.; KWORK, C. C.; LEE, A. T. C.; KWAN, Y. W.; LEE, M. M. S.; ZHANG, R. Z.; NGAI, S. M.; LEE, S. M. Y.; HE, G. W.; FUNG, K. P.; **Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by Diosgenin.** *European Journal of Pharmacology*, v. 502, p. 123-133, 2004.
- AYDIN, A. *et al.* **The Short – and Long- term Effects of Estrogen Deficiency on Apoptosis in Musculoskeletal Tissues: An Experimental Animal Model Study.** *Archives of Iranian Medicine*, v. 16, n. 5, 2013.
- BACELAR-ANTUNES, A. **Como viver a sua menopausa.** Gondomar: Xerezade, 2005.
- BABER, R. J.; PANAY, N.; FENTON, A. **2016 IMS Recommendations on women’s midlife health and menopause hormone therapy**, 2016.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** *Química Nova*, v. 32, p. 679 - 688, 2009.
- BASSAM, R. **Alterações Cardiovasculares e Cardiomorbidade da Menopausa. Efeitos da Reposição Hormonal.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 72, p. 85-91, 1999.
- BAYLIS, C.; ZATZ, R. M. **Chronic nitric oxide inhibition model six years on.** *Hypertension*, v. 32, p. 958–964, 1998.
- BEIG, A.; AGBARIA, R.; DAHAN, A. **Oral Delivery of Lipophilic Drugs: The Tradeoff between Solubility Increase and Permeability Decrease When Using Cyclodextrin-Based Formulations.** *Plos One*, v. 8, n. 7, 2013.



BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações hospitalares do SUS. Mortalidade hospitalar do SUS-por local de residência-Brasil.** Disponível em: <<http://www.tabnet.datasus.gov.br>> Acesso em: 17 jul. 2017.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. **Cyclodextrins as pharmaceuticals solubilizers.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 59, p. 645-666, 2007.

CAMARA, C.; ZHOU, L.Y.; MA, Y.; ZHU, L.; YU, D.; ZHAO, Y.W.; YANG, N.H. **Effect of ovariectomy on serum adiponectin levels and visceral fat in rats.** *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, v. 34, n. 6, p. 825-9, 2014.

CARVALHO, Y. *et al.* **Inclusion complex between beta-cyclodextrin and hecogenin acetate produces superior analgesic effect in animal models for orofacial pain.** *Biomed Pharmacother*, v. 93, p. 754-762, 2017.

CHAVES, T. P.; DANTAS, I. C.; FELISSIMO, D. C.; DANTAS, V. D.; DANTAS, G. D. S. **Lambedor: Um Conhecimento Popular em Abordagem Científica.** *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 2, n. 1, 2008.

CHEN, M. N.; LIN, C. C.; LIU, C. F. **Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review.** *Climacteric*, v. 18, n. 2, p. 260-69, 2015.

DANANBERG, J.; SIDER, R.S.; GREKIN, R. J. **Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine.** *Hypertension*, v. 21. p. 359-363, 1993.

DIAS, K. L. G.. **Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric.** *European Journal of Pharmacology*, v. 574, p. 172-178, 2007.

DINIZ, G. V. *et al.* **Avaliação funcional do transplante autólogo heterotópico de ovários: estudo experimental em ratas.** *Revista Médica de Minas Gerais*. v. 21, n. 4, p. 377-383, 2011.

DOWLING, M. *et al.* **Characterization of vascular disease risk in postmenopausal women and its association with cognitive performance.** *PLoS One*, v. 8, n. 7, 17. Jul. 2013.

ESFANDIAREI, M. *et al.* **Diosgenin modula a função das células do músculo liso vascular, regulando a viabilidade celular, migração e homeostase do cálcio.** *J Pharmacology Thermic Experience*, v. 3, p. 925-39, 2011.

FENICAL, W.; JENSEN, P.R.; PALLADINO, M.A.; LAM, K.S.; LLOYD, G.K.; POTTS, B.C.; **Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052).** *Bioorg Medical and Chemistry*, v. 17, p. 2175–80, 2009.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.A.; RIBEIRO, L.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; VEIGA, F.J.B. **Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrin.** European Journal Pharmacology and Biopharmacology, v. 67, p. 531-39, 2007.

FILHO, L. F. S. *et al.* **Effect of Pulsed Therapeutic Ultrasound and Diosmin on Skeletal Muscle Oxidative Parameters.** Ultrasound Med Biol, v. 44, n. 2, p. 359-367, 2018.

FLUCKIGER, J.P.; SONNAY, M.; BOILLAT, N.; ATKINSON, J. **Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat.** European Journal of Pharmacology, v. 109, p. 105-109, 1985.

FRANÇA, A. P.; ALDRIGHI, J. M.; MARUCCI, M. F. N. **Fatores associados à obesidade global e à obesidade abdominal em mulheres na pós-menopausa.** Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, Recife, v. 8, n. 1, p.65-73, 2008.

Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, De Simone L, Orlandi R, Genazzani AR. **Prospective evaluation of body weight and body fat distribution in early post-menopausal women with and without hormonal replacement therapy.** Maturitas; v. 39, p. 125-32, 2001.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. **Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds.** Thermochim. Acta, v. 380, p. 123-151, 2001.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM NETO, P.J. **Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos.** Rev Bras Farm, v.89, n.3, p.220-225, 2008.

HUANG, B *et al.* **Synthesis, characterization and biological studies of diosgenyl analogues.** Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters, v. 22, n. 24, p. 7330–7334, 2012.

LI, H. **Effects of estrogen and phytoestrogens on endometrial leakage in ovariectomized rats and the related mechanisms.** Sheng Li Xue Bao, v. 65, n. 1, p. 8-18, 2013.

LIMA, A.A.N.; SOARES-SOBRINHO J.L.; CORREA JUNIOR, R.A.C.; ROLIM NETO, P.J. **Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs.** Acta Farm Bonaerense, v. 27, p. 789-97, 2008.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R. J.; BROWN, T.M. *et al.* **Heart disease and stroke statistics - 2010 update: a report from the American Heart Association.** Circulation, v. 121, p. 46-215, 2010.

MESSINA, M. **Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women.** The American Journal of Clinical Nutrition, 100 Suppl, v. 1, p. 423-430, 2014.

MORAIS, I. C. P. S. **Efeito do fitoestrógeno diosgenina sobre a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia.** 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Cardiovascular), Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

MOURA, I. J. L. **Efeito vasorrelaxante do fitoestrógeno Diosgenina em artéria aorta de ratas ovariectomizadas - OVX.** 2016. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

MURPHY, J.G.; KHALIL, R. A. **Gender-specific reduction in contractility and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in vascular smooth muscle cells of female rat.** American Journal of Physiology, Cell Physiology, v. 278, n.4, p. 834-844, 2000.

OKAWARA, M. *et al.* **Enhancement of Diosgenin Distribution in the Skin by Cyclodextrin Complexation Following Oral Administration.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 36, n. 1, p. 36–40, 2013.

POEHLMAN, E. T.; TCHERNOF, A. **Transversing the menopause: changes in energy expenditure and body composition.** Coron Artery Disease, v. 9, p. 799-803, 1998.

RECKELHOFF, J. F. **Gender differences in the regulation of blood pressure.** Hypertension, v. 37, p. 1199-1208, 2001.

RIBEIRO, A.; FIGUEIRAS, A.; SANTOS, D.; VEIGA, F. **Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- $\beta$ -cyclodextrin.** AAPS Pharmacology Science Technology, v. 47, n. 2, p. 326-32, 2008.

RIBEIRO, G. A. *et al.* **Avaliação dos efeitos das isoflavonas de soja em ratas com Hipoestrogenismo induzido.** Pesquisa Cardiovascular, v. 18, n. 1, 2011.

RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. **Chronic Inhibition Of Nitric Oxide Synthesis. A New Model of Arterial Hypertension.** Hypertension, v. 20, p. 298–303. 1992.

ROGALSKI, M. *et al.* **Physico-Chemical Properties and Phase Behavior of the Ionic Liquid- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes.** International Journal Molecular Science v.8, p. 13-14, 2013.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização à base de novo derivado Tiofênico.** 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica), Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SALEH, M.; CONNELL, B.J., SALEH, T.M. **Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats.** Brain Research, v.879, n.1, p.105-114, oct. 2000.

SANTOS, R.D.; TIMERMAN, S.; SPOSITO, A.C coordenadores. **Diretrizes para cardiologistas sobre excesso de peso e doença cardiovascular dos Departamentos de Aterosclerose, Cardiologia Clínica e FUNCOR da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 78, p. 1-13, 2002.

SARAVANAKUMAR, M.; RAJA, B. **Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats.** European Journal of Pharmacology, v. 671, p. 87–94, 2011.

SHEN, M.; KUMAR, S.P.; SHI, H. **Estradiol regulates insulin signaling and inflammation in adipose tissue.** International Journal of Preventive Medicine. V. 17, n. 2. p. 99-107, 2014.

SHI-HUA, F. *et al.* **Relationship between Female Menopause and Hypertension/Isolated Systolic Hypertension in Rural Districts of Hanzhong in Shaanxi Province.** Yi Xue Ke Xue Xue Yuan Bao, v. 35, n. 4, p. 422-6, 2013.

SILVA-FILHO, J.C.; OLIVEIRA, N.N.P.M.; ARCANJO, D.D.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; SANTOS, M.R.V.; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, A.P. **Investigation of Mechanisms Involved in (-)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta.** Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology, v. 784, p. 1742-7843, 2011.

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.L.R.; ALVES, L.D.S.; LABANDEIRA, J.J.T.; ROLIM NETO P,J. **Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complex.** Quím Nova (Online). 2011.

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.L.R.; ROLIM NETO P,J.; LABANDEIRA, J.J.T. **Physicochemical Study of Solid State Benznidazole-Cyclodextrin Complexes.** Journal Therm Analogy and Calorimetric (Online); v.10, p. 10973-010, 2010.

SOBRAC. Sociedade Brasileira de Climatério. **Conselho Brasileiro de Terapêutica Hormonal de Menopausa.** Brasil, 2018.

SPG. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. **Conselho Nacional sobre Menopausa 2016.** Portugal, 2017.

STUENKEL, C. A. **Menopausal Hormone Therapy: Current Considerations.** Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. V. 44, n. 3, p. 565–85, 2015.

TAKEDA-MATSUBARA, Y. *et al.* **Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II.** Hypertension. v.39, n.1, p.41-45, 2002.

TOSTES, R. C. *et al.* **Effects of estrogen on the vascular system. Estrogen and the vascular system.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.36, n.9, p.1143-1158, 2003.

Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. **Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution.** *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 24, p. 226-31, 2000

YAMADA, T.; HOSHINO, M.; HAYAKAWA, T.; OHHARA, H.; YAMADA, H.; NAKAZAWA, T.; INAGAKI, T.; LIDA, M.; OGASAWARA, T.; UCHIDA, A.; HASEGAWA, C.; MURASAKI, G.; MIYAJI, M.; HIRATA,,A.; TAKEUCHI, T. **Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats.** *American Journal of Physiology*, v. 273, 355–364, 1997.

WANG, Y. *et al.* **Structural Diversity of Diosgenin Hydrates: Effect of Initial Concentration, Water Volume Fraction, and Solvent on Crystallization.** *Crystal Growth e Design*, v. 16, n. 3, p. 1492-1501, 2016.

ZATZ, R.; BAYLIS, C. **Chronic Nitric Oxide Inhibition Model Six Years On.** *Hypertension*; v.32, p.958-964,1998.

ZHOU, E. S.; FALK, S. J.; BOBER, S. L. **Managing premature menopause and sexual dysfunction.** *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 2015.



## CAPÍTULO IV

**Estudo *in vitro* da atividade vasorelaxante da diosgenina  
em aorta de ratas ovariectomizadas**

**(Mechanisms involved in the vasorelaxing effect of  
diosgenin on the aorta of OVX rats)**

**(Artigo aceito na revista *Journal of Medicinal Food*)**

**Qualis: B1 - Biotecnologia**

## **Estudo *in vitro* da atividade vasorelaxante da diosgenina em aorta de ratas ovariectomizadas**

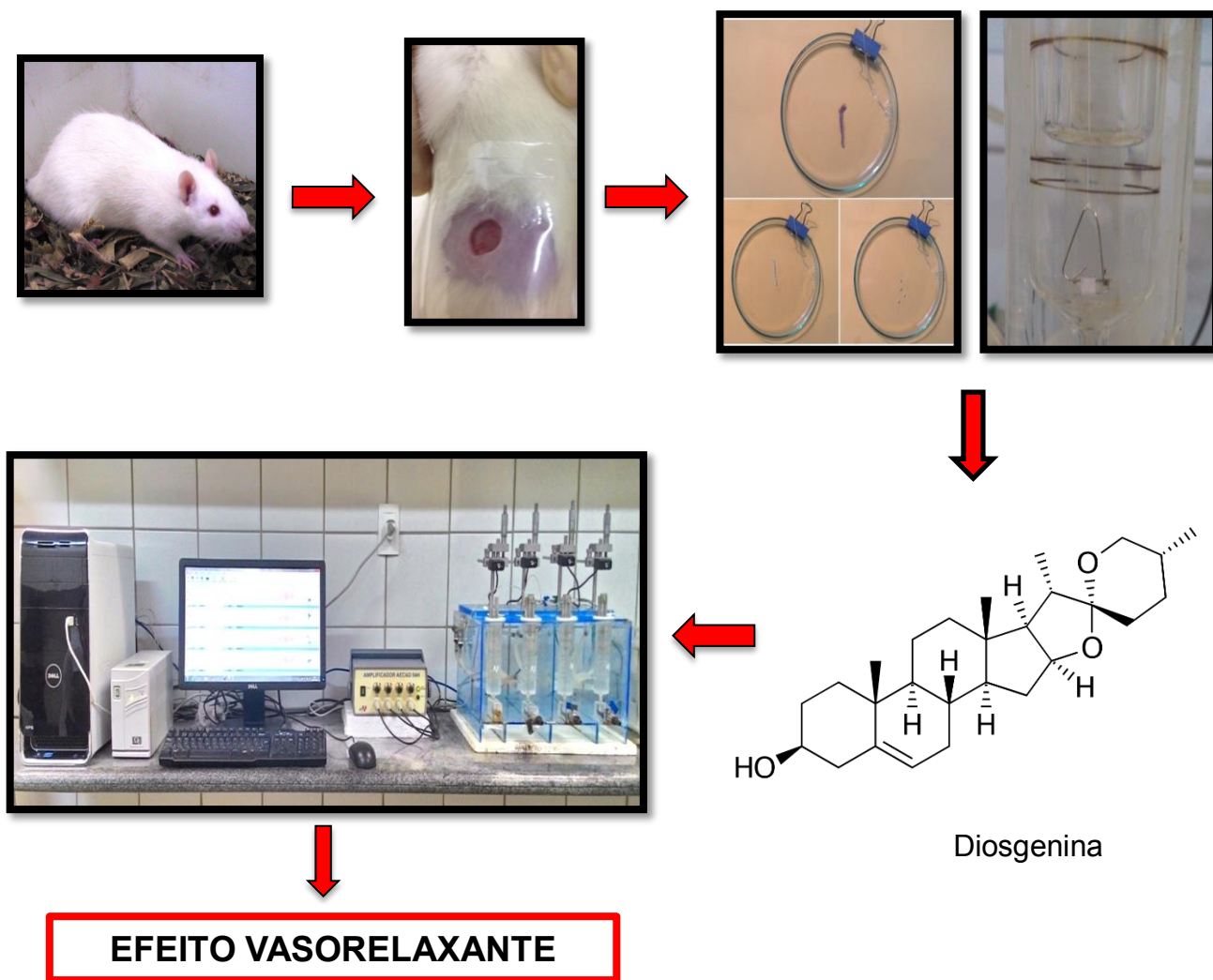
### **RESUMO:**

A menopausa corresponde à cessação permanente da menstruação, conseqüente à perda da função folicular ovariana ou à remoção cirúrgica dos ovários. Estudos demonstram que a pós-menopausa é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Diante disso, a terapia de reposição hormonal tem sido bastante utilizada como um agente cardioprotetor, destacando-se o fitoestrógeno Diosgenina. Além de atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral, a Diosgenina demonstrou efeito vasorrelaxante dependente e independente do endotélio vascular em artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito vasorrelaxante induzido por Diosgenina em artéria aorta de ratas ovariectomizadas, bem como os mecanismos envolvidos no vasorrelaxamento. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEE/UFPI nº 069/2014). Foram utilizadas ratas Wistar ovariectomizadas, provenientes do Biotério Setorial do NPPM/UFPI, mantidas sob condições controle de temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro e escuro de 12h, com livre acesso à alimentação e água. Foram considerados significativos quando o valor obtido para “p” foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Após isolamento, dissecação e limpeza da artéria aorta, constatou-se que a pré-incubação com Diosgenina em anéis com endotélio funcional ( $10^{-5}$  M) foi capaz de inibir de maneira concentração-dependente as contrações induzidas por fenilefrina ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M), havendo ainda um deslocamento da curva para direita, porém sem alteração do efeito máximo (ratas OVX,  $pD_2 = 7,90 \pm 0,04$ ; Diosgenina  $10^{-5}$  M,  $pD_2 = 6,56 \pm 0,07^*$ ). O fitoestrógeno Diosgenina promoveu vasorrelaxamento em anéis aórticos de ratas OVX pré-contraídos com fenilefrina de maneira dependente de concentração e dependente do endotélio vascular em preparações com endotélio vascular ( $pD_2 = 6,39 \pm 0,16^*$ ) e este efeito foi atenuado após a remoção do endotélio vascular ( $pD_2 = 2,49 \pm 0,63$ ). A participação de mediadores endoteliais foi verificada na presença de L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), Indometacina (10  $\mu\text{M}$ ), Atropina (1  $\mu\text{M}$ ) ou Tiron (100 M) por 30 minutos, e nestas condições observou-se que ocorreu uma atenuação do vasorrelaxamento promovido por Diosgenina ( $2,22 \pm 0,41^*$ ;  $2,17 \pm 0,57^*$ ;  $5,52 \pm 0,14^*$ ;  $4,29 \pm 0,05^*$ ;  $3,79 \pm 0,20^*$ , respectivamente). Em anéis sem endotélio pré-contraídos com KCl 80 mM, a adição cumulativa de Diosgenina não promoveu efeito vasorrelaxante concentração-dependente ( $pD_2 = 4,01 \pm 15,06^*$ ). Em conclusão, estes resultados sugerem que o efeito vasorrelaxante promovido por Diosgenina em preparações com endotélio vascular provavelmente envolve a participação da via eNOS/CG/COX, bem como a participação dos receptores muscarínicos e dos ânions superóxidos. E não ocorre a inibição do influxo de cálcio através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem.

**Palavras-chaves:** Menopausa, OVX, Diosgenina, Vasorrelaxamento, NO, COX.



## Resumo Gráfico



## 1 INTRODUÇÃO

Para a Organização Mundial da Saúde, a menopausa corresponde à cessação permanente da menstruação, decorrente da perda da função folicular ovariana ou da remoção cirúrgica dos ovários. Desse modo, uma das principais características da menopausa é a diminuição da produção e secreção dos hormônios ovarianos, especialmente o estrógeno, o qual está relacionado à produção de óxido nítrico (NO), apontado como potente vasodilatador e cardioprotetor endógeno (PALLOS *et al.*, 2006; CAVADAS *et al.*, 2010).

Essa redução estrogênica também tem sido associada às mudanças na distribuição corporal e dislipidemia, provocando aumento da incidência de doenças cardiovasculares (DCV) (LIMA *et al.*, 2001; RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002; OLIVEIRA; MANCINI FILHO, 2005; SALVE, 2006; MORAES; COLLA, 2006). Uma das formas utilizadas para reduzir os riscos das DCV na menopausa é o uso da Terapia de Reposição Hormonal (TRH). Estudos epidemiológicos, que avaliaram a relação entre a TRH e DCV, mostraram evidências de que o tratamento hormonal era benéfico em mulheres na pós-menopausa, reduzindo a incidência de DCV em até 30% (MANSON; MARTIN, 2001). Contudo, os efeitos adversos atribuídos aos estrógenos naturais e sintéticos têm limitado a aderência à TRH e, com isso, vêm contribuindo para o desenvolvimento de substâncias alternativas, a exemplo dos fitoestrógenos, que possuem propriedades benéficas semelhantes aos estrógenos e com menos efeitos colaterais (SILVA, 2014).

A Diosgenina (3 $\beta$ -hidroxi-5-espirostena) é um fitoestrógeno estruturalmente semelhante ao estrogênio e progesterona; é usado como um precursor para a produção industrial de progesterona e noretisterona. Ele pode ser encontrado em uma variedade de plantas, mas é principalmente extraído do raiz de inhame selvagem (*Dioscorea villosa*), feno-grego (*Trigonella foenum graecum*) e soja (*Glycine max*) (HUANG, 2012). A administração de diosgenina induzida pela estreptozotocina em ratos diabéticos promoveu redução do risco cardiovascular e controle glicêmico (NAIDU *et al.*, 2014).

Por outro lado, um obstáculo encontrado no uso da diosgenina é a reduzida a baixa solubilidade que ela apresenta em meio aquoso, o que dificulta sua biodistribuição e formulação farmacêutica (ROGALSKI *et al.*, 2013; BEIG *et al.*, 2013).

Uma alternativa é o uso da nanobiotecnologia, a fim de melhorar a diluição de moléculas apolares em meio aquoso e proporcionar um sistema de liberação direcionado para o sítio da doença (GUEDES *et al.*, 2008).

Um estudo anterior mostrou que a diosgenina induz o efeito vasorelaxante dependente do endotélio na artéria mesentérica de ratos machos (DIAS, 2007). Os múltiplos efeitos benéficos da diosgenina despertaram o interesse da comunidade científica em várias áreas e até na avaliação dos efeitos cardiovasculares. No entanto, nenhuma das pesquisas lida com esses efeitos em ratas ovariectomizadas, com regressão máxima de estrogênio. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do fitoestrógeno diosgenina e seu derivado nanoestruturado no efeito vasorelaxante, bem como os possíveis mecanismos envolvidos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Preparação da Diosgenina e derivado nanoestruturado de Diosgenina**

Para o preparo e uso em experimentos *in vitro*, a Diosgenina foi solubilizada em Tween (0,1% v/v) e dissolvida em água destilada na concentração de  $10^{-1}$  M (solução estoque). O derivado nanoestruturado de Diosgenina foi solubilizado em água destilada na concentração de  $10^{-1}$  M (solução estoque). A solução estoque foi mantida a 0°C, e de acordo com a necessidade de cada experimento eram realizadas as diluições.

### **2.2 Animais**

Foram utilizadas neste estudo, ratas fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* (Wistar), com 12 semanas de idade, pesando 180-240 g cada, obtidos do Biotério de Plantas Mediciniais da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram alojados em gaiolas a uma temperatura de  $21 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 horas e livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (Protocolo/CEEA nº 069/14). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estavam de acordo com a Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

### 2.3 Soluções Nutritivas

A preparação da solução nutritiva de Krebs foi baseada na metodologia desenvolvida por Tanaka *et al.* (1999). Foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e fosfato de potássio mono-hidratado ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Tabela 10). No preparo da solução despolarizante de Krebs com cloreto de potássio a 80 mM, a concentração de  $\text{Na}^+$  foi isosmoticamente alterada (Tabela 11).

As tabelas a seguir mostram as composições das soluções nutritivas:

**Tabela 10:** Composição da solução de Krebs.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,7
$\text{NaHCO}_3$	25,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,2
Glicose	5,5

FONTE: HIPÓLITO *et al.*, 2011.

**Tabela 11:** Composição da solução de Krebs despolarizante - KCl (80 mM).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	78,3
KCl	80,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,7
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,2
Glicose	5,5

FONTE: HIPÓLITO *et al.*, 2011.

## 2.4 Protocolos experimentais utilizados na abordagem *in vitro*

### 2.4.1 Preparação dos anéis de artéria aorta isolada de ratas

Os animais foram submetidos ao processo de eutanásia por superdose anestésica (75 mg/kg, tiopental sódico, *i.p.*) de acordo com o Parágrafo Único da Resolução N° 1000, de 11 de Maio de 2012, sob a responsabilidade da Médica Veterinária Jamylla Mirk Guerra de Oliveira, CRMV-PI nº 1048.

O sistema de cubas para órgãos isolados (AVS Projetos, SP) foi utilizado para os ensaios farmacológicos, nas dependências do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular no Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM) na Universidade Federal do Piauí.

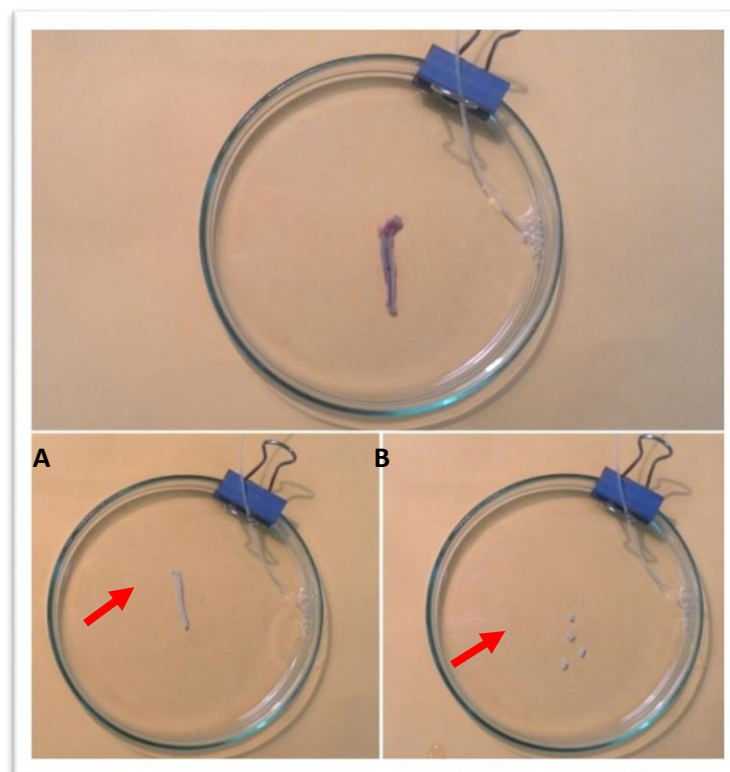
Após laparotomia, a aorta torácica foi cuidadosamente retirada e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs (Figura 24). Posteriormente, a aorta foi manipulada para retirada do tecido conectivo e adiposo (Figura 23A), e seccionada em anéis do primeiro segmento da artéria (3 a 4 mm) (Figura 23B). Após a manipulação, os segmentos foram adaptados ao aparato experimental. Cada anel da artéria foi mantido em cubas contendo 6 mL de solução de Krebs, a 37 °C e aerada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (carbogênio) (Figura 25).

Para obtenção das respostas isométricas, os anéis foram inseridos individualmente em hastes de aço inoxidável, suspensos por linhas de algodão, fixadas a um transdutor de tensão e acoplado a um amplificador de sinal (AECAD

1604, software AQCAD 2.3.6, AVS Projetos, SP) (Figura 25). Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1,50 g/f, reajustada, quando necessário, durante aproximadamente 60 minutos de estabilização. Durante este tempo, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

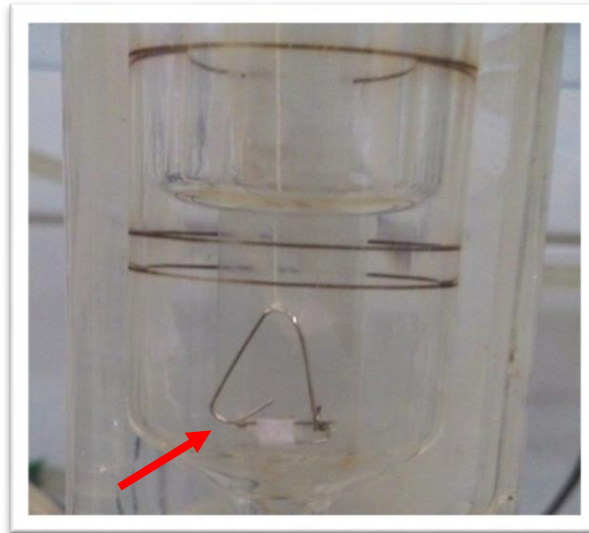
Os anéis sem endotélio vascular foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso com a haste de metal. A presença de endotélio foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 1  $\mu$ M de ACh. Diante disso, os anéis com relaxamento superior a 70% sob a pré-contracção com fenilefrina (1  $\mu$ M) foram considerados com endotélio. Já os anéis com relaxamento inferior a 10% foram considerados sem endotélio. Anéis com relaxamento entre 10 e 70% foram desconsiderados (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

**Figura 23:** Artéria aorta isolada de rata. Com ausência de tecido conectivo (A) e seccionada em anéis do primeiro segmento da artéria (B).



FONTE: MOURA, I. J. L., 2016.

**Figura 24:** Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria aorta de rata em solução de Krebs.



FONTE: MOURA, I. J. L., 2016.

**Figura 25:** Sistemas de cubas para órgãos isolados e de aquisição de dados do NPPM/UFPI (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP).

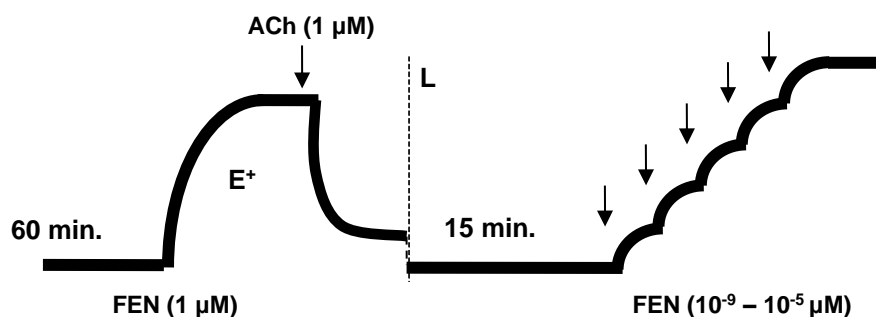


FONTE: MOURA, I. J. L., 2016.

### 2.4.2 Reatividade vascular à adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria aorta de ratas controle e ovariectomizadas (OVX) na presença de endotélio funcional

Após a verificação da integridade do endotélio, os anéis de artéria aorta do grupo controle e do grupo OVX foram pré-contraídos a adição cumulativa de fenilefrina ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) individualmente para obtenção de curvas concentração-resposta (Figura 26).

**Figura 26:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da reatividade vascular à adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria aorta com endotélio funcional de ratas não-cirurgiadas e OVX.



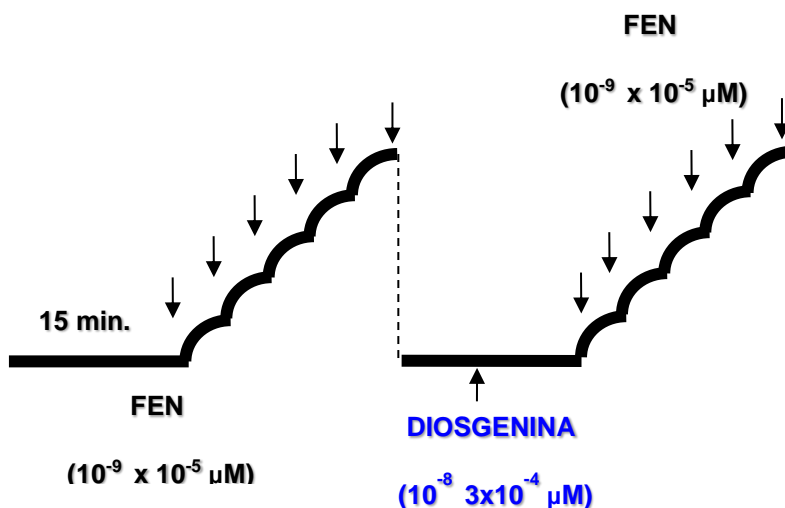
FONTE: SILVA-FILHO *et al.*, 2011.

### 2.4.3 Reatividade vascular da Diosgenina e derivado nanoestruturado em anéis de artéria aorta de ratas OVX na presença de endotélio funcional

Os anéis de artéria aorta de ratas OVX foram pré-contraídos a adição cumulativa de fenilefrina ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) para obtenção de uma curva controle. Logo em seguida, as preparações foram lavadas e ao retorno dos valores do tônus basal, os anéis foram pré-incubados separadamente com Diosgenina na concentração de ( $10^{-5}$  M) 30 minutos antes da realização de uma segunda curva cumulativa com a adição de fenilefrina (Figura 27).



**Figura 27:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da reatividade vascular da Diosgenina e seu derivado nanoestrururado em anéis de artéria aorta de ratas OVX.

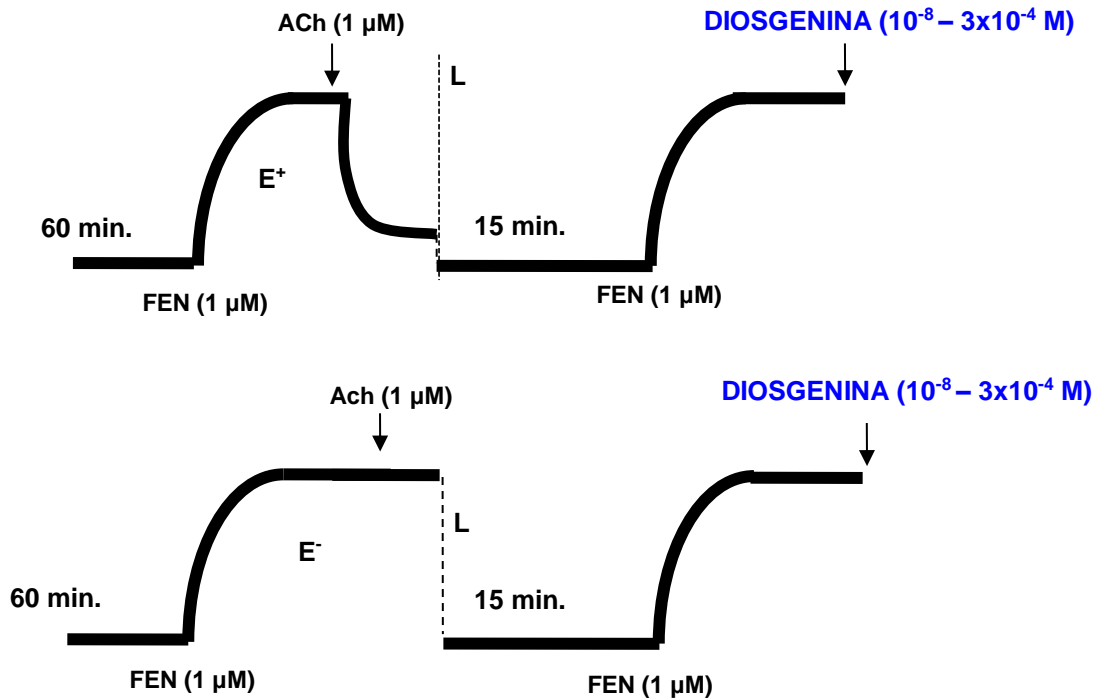


FONTE: SILVA-FILHO *et al.*, 2011.

#### 2.4.4 Verificação do efeito da Diosgenina e seu derivado nanoestrururado sobre anéis de artéria aorta isolada de ratas OVX pré-contraídos com fenilefrina

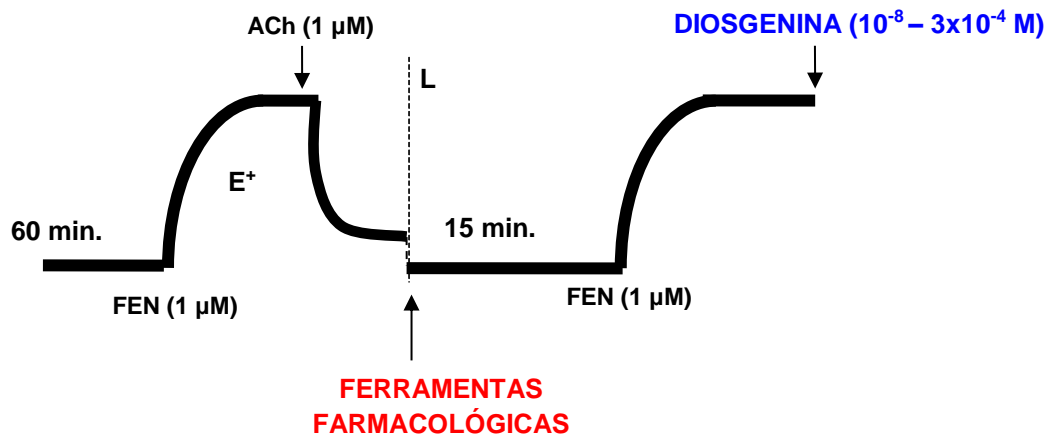
Após estabilização (60 minutos), os anéis com e sem endotélio vascular foram pré-contraídos com Fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ), um agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, e na fase tônica da contração da musculatura lisa foram adicionadas cumulativamente às cubas concentrações crescentes de Diosgenina e seu derivado nanoestrururado ( $10^{-8} - 3 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ ) para obtenção de uma curva concentração-resposta. O relaxamento foi medido através da comparação da tensão desenvolvida antes e após a adição de Diosgenina e seu derivado nanoestrururado (Figura 27). Após a obtenção dos registros controles, foram realizadas curvas para a verificação do efeito da Diosgenina na presença de algumas ferramentas farmacológicas, descritas a seguir (Figura 29). Para cada tratamento farmacológico, diferentes preparações foram utilizadas.

**Figura 29:** Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo do efeito da Diosgenina e seu derivado nanoestruturado sobre anéis de artéria aorta pré-contraídos por Fen, com endotélio intacto ( $E^+$ ) e endotélio removido ( $E^-$ ).



FONTE: SILVA-FILHO *et al.*, 2011.

**Figura 30:** Representação esquemática dos protocolos experimentais para avaliação do efeito da Diosgenina livre na presença de algumas ferramentas farmacológicas em anéis de artéria aorta de ratas OVX com endotélio vascular intacto.



FONTE: SILVA-FILHO *et al.*, 2011.

#### **2.4.5 Verificação da participação da enzima NO-sintase no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX**

Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram previamente incubadas com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), um análogo sintético da arginina, que compete com ela ocasionando a inibição da síntese do óxido nítrico (SILVA *et al.*, 2009). Após 30 minutos as preparações foram submetidas a uma segunda contração com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e no componente tônico desta contração adicionou-se cumulativamente Diosgenina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) às cubas (Figura 29). A potência vasorrelaxante da Diosgenina foi avaliada através da comparação dos valores de  $\text{pD}_2$  e  $E_{\text{máx}}$  na presença e na ausência de L-NAME.

#### **2.4.6 Verificação da participação da ciclase de guanilil solúvel no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX**

Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram pré-incubadas com 1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a] Quinoxalin-1-one (ODQ) (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor seletivo da GCs, enzima responsável pela conversão de trifosfato guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (YEH *et al.*, 2005; HIPÓLITO *et al.*, 2009). Após 30 minutos as preparações foram submetidas a uma segunda contração com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e no componente tônico desta contração adicionou-se cumulativamente Diosgenina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) às cubas (Figura 29). A potência vasorrelaxante da Diosgenina foi avaliada através da comparação dos valores de  $\text{pD}_2$  e  $E_{\text{máx}}$  na presença e na ausência de ODQ.

#### **2.4.7 Verificação da participação da ciclooxigenase no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX**

Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram previamente incubadas com Indometacina (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase (COX) (CLARK; FUCHS, 1997). Após 30 minutos as preparações

foram submetidas a uma segunda contração com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e no componente tônico desta contração adicionou-se cumulativamente Diosgenina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) às cubas (Figura 29). A potência vasorrelaxante da Diosgenina foi avaliada através da comparação dos valores de  $\text{pD}_2$  e  $E_{\text{máx}}$  na presença e na ausência de Indometacina.

#### **2.4.8 Verificação da participação dos receptores muscarínicos no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX**

Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram pré-incubadas com Atropina (1  $\mu\text{M}$ ), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (SAWYER, 1999). Após 30 minutos as preparações foram submetidas a uma segunda contração com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e no componente tônico desta contração adicionou-se cumulativamente Diosgenina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) às cubas (Figura 29). A potência vasorrelaxante da Diosgenina foi avaliada através da comparação dos valores de  $\text{pD}_2$  e  $E_{\text{máx}}$  na presença e na ausência de Atropina.

#### **2.4.9 Verificação da participação dos ânions superóxidos no efeito induzido por Diosgenina livre em anéis de artéria aorta de ratas OVX**

Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram pré-incubadas com Tiron (100  $\mu\text{M}$ ), um sequestrador de ânion superóxido, permeável à membrana (SHI *et al.*, 2007). Após 30 minutos as preparações foram submetidas a uma segunda contração com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e no componente tônico desta contração adicionou-se cumulativamente Diosgenina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) às cubas (Figura 29). A potência vasorrelaxante da Diosgenina foi avaliada através da comparação dos valores de  $\text{pD}_2$  e  $E_{\text{máx}}$  na presença e na ausência de Tiron.

#### 2.4.10 Efeito da Diosgenina livre sobre contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria aorta de ratas OVX

Após a verificação da ausência de endotélio vascular, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de potássio (KCl 80 mM), que promove uma despolarização da membrana plasmática gerando a ativação dos canais para cálcio sensível à voltagem tipo L ( $Ca_vL$ ), promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  gerando uma contração tônica (REMBOLD, 1996). No componente tônico e sustentado da contração com um tempo médio de 30 minutos para a estabilização, foram adicionados às cubas concentrações crescentes de Diosgenina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$   $\mu$ M) (Figura 27). A potência vasorrelaxante da Diosgenina foi avaliada através da comparação dos valores de  $pD_2$  e  $E_{m\acute{a}x}$  na presença e na ausência de KCl 80 mM.

#### 2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), seguido do teste t de Student não-pareado, para comparação dos valores de  $pD_2$  e  $E_{m\acute{a}x}$ , que foram considerados significativos quando o valor obtido para “p” foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

As curvas foram obtidas através de regressão não-linear com variação da inclinação da curva (slope variável). Os valores de  $pD_2$  correspondem ao logaritmo negativo do valor de CE50 (concentração capaz de induzir 50% da resposta máxima). E os valores de  $E_{m\acute{a}x}$  correspondem à média percentual de relaxamento dos anéis de aorta induzido por Diosgenina e seu derivado nanoestruturado.

Toda a análise estatística e plotagem das curvas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism 7.0.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da diosgenina na reatividade vascular de ratos OVX

Os anéis aórticos de ratos OVX exibiram um aumento maior na contração induzida por Phe ( $pD_2 = 7,9 \pm 0,04$ ) quando comparados ao grupo Sham-operado ( $pD_2 = 7,1 \pm 0,06$ , \*  $p < 0,05$ ). A pré-incubação com diosgenina ( $10^{-5}$  M) foi capaz de reduzir significativamente as contrações induzidas pela PE ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M) na aorta de ratos OVX ( $pD_2 = 6,6 \pm 0,07$ , \*  $p < 0,05$ ) sem alterar a resposta máxima (Tabela 12).

**Tabela 12:** Reatividade vascular com fenilefrina em anéis de artéria aorta isolada de ratos controle, ovariectomizadas (OVX) e na presença de Diosgenina. \* $p < 0,05$  versus OVX, Teste-t-Student (n=4).

Grupo Teste	pD2
Controle	7,12±0,06 %
OVX	7,90±0,04 % *
OVX e Diosgenina	6,60±0,07 % *

Fonte: Autoria própria.

#### 3.2 Efeito vasorelaxante da diosgenina nos anéis de aorta de ratos OVX

Em anéis de aorta de ratos, a administração cumulativa de diosgenina ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-4}$  M) induziu efeito vasorelaxante em anéis pré-contraídos com aorta de fenilefrina na presença ( $E_{max} = 55,34 \pm 7,7\%$ ) e na ausência de endotélio vascular ( $E_{max} = 15,8 \pm 2,4\%$ ). O efeito contrátil máximo ( $E_{max}$ ) da fenilefrina foi restaurado 60 minutos após a retirada do fitoestrógeno, com lavagens prévias a cada 15 min. Estes resultados demonstram que o efeito vasorelaxante da diosgenina é dependente do endotélio. Em anéis sem diosgenina, o endotélio vascular promoveu um discreto vasorelaxamento

nas contrações induzidas pela despolarização com 80 mM de KCl ( $E_{max} = 5,7 \pm 0,8\%$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13:** Atividade da Diosgenina em anéis de aorta com e sem endotélio vascular despolarizado com KCl 80 mM comparadas com o efeito obtido após pré-contração por Fenilefrina (1  $\mu$ M). \* $p < 0,05$  versus endotélio.

Grupo Teste	pD2
Com endotélio	59,70 $\pm$ 0,75 %
Sem endotélio	15,80 $\pm$ 2,40 % *
Despolarizado com KCl 80 mM	7,70 $\pm$ 0,80 % *

Fonte: Autoria própria.

### 3.3 Papel do endotélio no relaxamento induzido por diosgenina das artérias aorta

A fim de avaliar o envolvimento de fatores relaxantes derivados do endotélio no vasorelaxamento induzido pela diosgenina, os efeitos do L-NAME (10  $\mu$ M), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), 1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a] Quinoxalin-1-one (ODQ) (10  $\mu$ M), um inibidor seletivo da guanilil ciclase (sGC), KT5823 (1  $\mu$ M), inibidor de PKG (proteína quinase G), foram examinados. A Tabela 14 mostra que o pré-tratamento de anéis mesentéricos intactos de endotélio com L-NAME e ODQ atenuou significativamente o vasorelaxamento induzido por diosgenina ( $E_{max} = 10,4 \pm 2,9\%$ ;  $E_{max} = 14,4 \pm 5,0\%$ , respectivamente). A incubação com Indometacina (10  $\mu$ M) não alterou o efeito vasorelaxante máximo ( $E_{max} = 46,7 \pm 8,0\%$ ) da diosgenina. No entanto, houve um menor deslocamento da curva de concentração de resposta. Para avaliar se o vasorelaxamento induzido pela diosgenina estava associado à ativação do receptor muscarínico, foi adotado o pré-tratamento dos anéis mesentéricos com atropina (1  $\mu$ M) - um inibidor dos receptores muscarínicos. Nestas condições, o efeito vasorelaxante da diosgenina foi atenuado ( $E_{max} = 24,1 \pm 1,7\%$ , Tabela 14). Na presença de Tiron, uma substância antioxidante,

observou-se atenuação expressiva do vasorelaxamento da diosgenina ( $E_{max} = 17,6 \pm 3,1\%$ ), sugerindo ação antioxidante da diosgenina na aorta de ratos OVX (Tabela 15).

**Tabela 14:** Atividade da Diosgenina em anéis de artéria aorta com endotélio e pré-contraídas com fenilefrina, na presença de L-NAME ou de ODQ, Atropina e Indometacina. \* $p < 0,05$  versus endotélio intacto, Teste-t-Student ( $n = 5$ ).

Grupo Teste	pD2
Com endotélio	59,70±0,75 %
L-NAME	10,40±2,90 % *
ODQ	14,40±5,00 % *
Atropina	24,10±1,70 % *
Indometacina	46,70±8,00 %

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 15:** Atividade da Diosgenina em anéis de artéria aorta com endotélio e pré-contraídas com fenilefrina na presença de Tiron. \* $p < 0,05$  versus endotélio intacto, Teste-t-Student ( $n = 5$ ).

Grupo Teste	pD2
Com endotélio	59,70±0,75 %
Sem endotélio	15,80±2,40 % *
Tiron	17,60±3,10 % *

Fonte: Autoria própria.

### 3.4 Papel dos canais de K<sup>+</sup> no relaxamento induzido por Diosgenina das artérias aorta

Para avaliar se o vasorelaxamento induzido por diosgenina foi mediado pela ativação dos canais de K<sup>+</sup>, os efeitos de diferentes inibidores de canal de K<sup>+</sup> foram



avaliados. Como mostrado na Tabela 16, o pré-tratamento de anéis mesentéricos com Tetraetilamônio (3 mM), 4-aminopiridina (1 mM), glibenclamida (10  $\mu$ M), apamina (1  $\mu$ M) inibiu marcadamente o vasorelaxamento induzido por diosgenina. Os resultados mostraram que Tetraetilamônio, 4-aminopiridina e Glibenclamida reduziram significativamente o relaxamento induzido por Diosgenin nos anéis arteriais com endotélio ( $E_{max} = 8,2 \pm 2,4\% *$ ;  $E_{max} = 18,6 \pm 4,8\% *$ ;  $E_{max} 15,3 \pm 4,9\% *$ ; \*  $p < 0,05$  vs com endotélio,  $n = 6$ ). Esses achados indicam que a ativação dos canais de  $K^+$  está envolvida no vasorelaxamento induzido pela diosgenina.

**Tabela 16:** Atividade da Diosgenina em anéis de artéria aorta com endotélio e pré-contraídas com fenilefrina na presença de Tetraetilamônio, Glibenclamida e 4-aminopiridina. \* $p < 0,05$  versus endotélio intacto, Teste-t-Student ( $n = 6$ ).

Grupo Teste	pD2
Com endotélio	59,70 $\pm$ 0,75 %
Sem endotélio	15,80 $\pm$ 2,40 % *
Tetraetilamônio	8,20 $\pm$ 1,30 % *
Glibenclamida	15,30 $\pm$ 4,90 % *
4-aminopiridina	18,60 $\pm$ 4,80 % *

Fonte: Autoria própria.

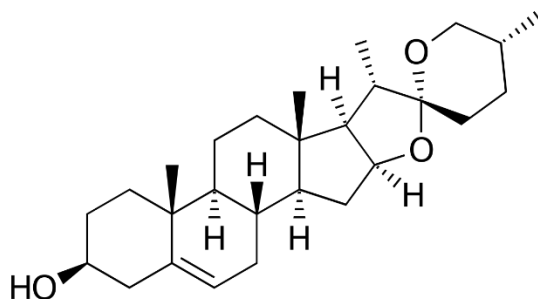
## 4 DISCUSSÃO

A regressão ovariana severa, menopausa, torna a mulher alvo de doenças cardiovasculares, a exemplo da hipertensão (SPG, 2017). O aumento de morte subta por conta de complicações da hipertensão geram grande interesse da comunidade científica por este assunto (MARON *et ao.*, 2007; MATOS, 2014). Nesse contexto, o fitoestrógeno diosgenina mostrou-se bastante promissor por ser capaz de causar vasorelaxamento na artéria de ratas ovariectomizadas.

Um estudo anterior mostrou que o fitoestrógeno diosgenina (Figura 35) promove vasorelaxamento nos anéis das artérias mesentéricas de ratos (DIAS, 2007). Embora os dados apontem para o efeito da diosgenina sobre a resistência arterial, um

estudo sobre a ação deste fitoestrógeno sobre a resposta cardiovascular em ratas ovariectomizadas (OVX) não foi encontrado.

**Figura 35:** Estrutura química da Diosgenina (3 $\beta$ -hidroxi-5-spirostene).



FONTE: autoria própria (2016)

As artérias das ratas OVX têm uma redução da reatividade devido ao endurecimento da parede vascular (HASSAN e ABDEL-WAHHAB, 2012). Tal condição foi identificada neste estudo, onde avaliamos a reatividade vascular à fenilefrina na aorta de ratas ovariectomizadas. Observou-se aumento da resposta contrátil, bem como o fato de a diosgenina (10<sup>-5</sup> M) diminuir a contração induzida pela adição cumulativa de fenilefrina (Tabela 12). A fenilefrina é um agonista dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos que induz a liberação de canais de cálcio operados por receptores (ROCCs), criando um processo contrátil, enquanto o KCl promove a despolarização da membrana plasmática, favorecendo o influxo de cálcio para o citosol (KARAKI, 1988).

Neste estudo, a diosgenina induziu um efeito vasorelaxante, dependente da concentração e dependente do endotélio vascular, nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. O mesmo perfil de resposta não foi observado nas preparações pré-contraídas com KCl 80 mM (Tabela 13). Tais resultados permitem inferir que a diosgenina induz o vasorelaxamento de maneira específica relacionada ao receptor, uma vez que atua sobre as contrações induzidas pela fenilefrina. No entanto, não causa o mesmo efeito quando o agente despolarizante é empregado (KCl 80 mM).

O efeito protetor do estradiol (que pode atingir os fitoestrogênios) envolveu a participação da via eNOS/NO nas células endoteliais, levando a um aumento de GMPc ou a uma diminuição da endotelina-1 no músculo liso vascular (KITADA *et al.*, 2014). Para avaliar a virulência da eNOS no efeito relaxante induzido pela diosgenina, foi utilizado 100  $\mu$ M de L-NAME, que é um inibidor competitivo da eNOS (MONCADA e HIGGS, 1993). Neste caso, o relaxamento induzido pela diosgenina do músculo liso vascular em ratos OVX foi descartado, mostrando a participação da enzima eNOS no efeito vasorelaxante induzido pela diosgenina. Resposta semelhante foi obtida na presença de ODQ, KT5823, atropina ou indometacina, sugerindo que o vasorelaxamento vascular da diosgenina envolveu a participação da via NO / GMPc / PKG, além da ativação do receptor muscarínico e da enzima ciclooxigenase (COX ) (Tabela 14). Estudos mostraram que o Tiron é um antioxidante eficiente que pode agir sequestrando espécies reativas intracelulares de oxigênio (ROS) (YAMADA *et al.*, 2003; MONTICONE *et al.*, 2014). No presente trabalho, observou-se que, na presença de Tiron (100 $\mu$ M), houve bloqueio do vasorelaxamento induzido pela diosgenina, sugerindo ação antioxidante (Tabela 15). Um dos importantes mecanismos de ação das substâncias via fatores hiperpolarizantes dependentes do endotélio envolve a ativação de canais de potássio, uma vez que os canais de potássio são importantes para o controle e regulação do tônus vascular pela hiperpolarização da membrana plasmática, levando ao relaxamento do músculo liso vascular (COSTA e ASSREUY, 2005; ZHANG *et al.*, 2014).

Algo foi observado na presença de bloqueadores dos canais de potássio, tais como: Tetraetilamônio 3 mM, um bloqueador do canal de potássio não seletivo; 1 mM 4-aminopiridina, um bloqueador do canal de potássio sensível a voltagem; 10 de Glibenclamida, um canal bloqueador de potássio sensível a ATP; Apamina 10  $\mu$ M, um canal de potássio sensível ao cálcio de grande condutância. Observou-se que a resposta vasorelaxante da diosgenina foi significativamente atenuada, sugerindo o envolvimento dos canais de potássio no efeito dependente do endotélio da diosgenina (Tabela 16).

## 5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos através de uma abordagem *in vitro* demonstram que o modelo OVX altera a reatividade vascular de artéria aorta torácica. O fitoestrógeno Diosgenina possui capacidade de inibir as contrações induzidas por fenilefrina de maneira concentração dependente em preparações com a presença de endotélio. Assim como, exerce efeito vasorrelaxante dependente de concentração e dependente do endotélio vascular sobre anéis de artéria aorta de ratas OVX.

O efeito dependente do endotélio da Diosgenina parece envolver as vias NO-sintase/GMPc/COX, a participação dos receptores muscarínicos e dos ânions superóxidos; e não ocorre a inibição do influxo de cálcio através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem. Por outro lado, na presença de inibidores de canais para potássio, o efeito vasorrelaxante foi atenuado, sugerindo o envolvimento dos canais de potássio na atividade da diosgenina.

## REFERÊNCIAS

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.

BEIG, A.; AGBARIA, R.; DAHAN, A. **Oral Delivery of Lipophilic Drugs: The Tradeoff between Solubility Increase and Permeability Decrease When Using Cyclodextrin-Based Formulations.** *PLoS One*, v. 8, n. 7, 2013.

CAVADAS, L. F.; NUNES, A.; PINHEIRO, M.; SILVA, P.T. **Abordagem da Menopausa Nos Cuidados de Saúde Primários.** Revista Acta Médica Portuguesa, v. 7, n. 23, p. 227-36, 2010.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. **Role of nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

COSTA, R. S.; ASSREUY, J. **Multiple potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation.** Nitric Oxide, v. 13, p. 145–151, 2005.

DIAS, K. L. G. **Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric.** European Journal of Pharmacology, v. 574, p. 172–178, 2007.

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.

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.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM neto, P. J. **Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos.** Revista Brasileira de Farmacologia, v. 89, n. 3, p. 220-5, 2008.

HASSAN, H. A.; ABDEL-WAHHAB, M. A. **Effect of soybean oil on atherogenic metabolic risks associated with estrogen deficiency in ovariectomized rats: dietary soybean oil modulate atherogenic risks in overiectomized rats.** Journal of Physiology and Biochemistry, v. 68, n. 2, p. 247-253, 2012.

HIPÓLITO, U. V.; ROCHA, J. T.; PALAZZIN, N. B.; RODRIGUES, G. J.; CRESTANI, C. C.; CORRÊA, F. M.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S. R.; BENDHACK, L. M.; RESSTEL, L. B.; TIRAPELLI, C. R. **The semi-synthetic kaurane ent-16 $\alpha$ -methoxykauran-19-oic acid induces vascular relaxation and hypotension in rats.** European Journal Pharmacology, v. 660, p. 402-410, 2011.

HIPÓLITO, U. V.; RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C. N.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, A. M.; BENDHACK, L. M.; COSTA, F. B.; TIRAPELLI, C. R. **Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent-8(14), 15-pimaradien-3 $\beta$ -ol in the isolated rat aorta.** Cardiovascular Pharmacology, v. 616, p.183-191, 2009.

HUANG, B. *et al.* **Synthesis, characterization and biological studies of diosgenyl analogues.** Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters, p. 7330–7334, 2012.

KARAKI, H.; W, G. B. **Calcium release in smooth muscle.** Life Sciences, v. 42, p.111-122, 1988.

KITADA, K.; YUI, N.; Mori, T.; OHKITA, M.; MATSUMURA, Y. **Vasoprotective effects of an endothelin receptor antagonist in ovariectomized female rats.** Life Sciences, v. 118, n. 2, p. 379-85, 2004.

LIMA, S. M. R. R.; ALDRIGHI, J. M.; COLOMBO, F. C.; GEORGI, D. M. A. **Hipertensão arterial e climatério.** Hipertensão, v. 4, n. 2, p. 51-4, 2001.

MANSON, J. E.; MARTIN, K. A. **Clinical practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy.** The New England Journal of Medicine, v. 345, n. 1, p. 34-40, 2001.

MARON, B. J.; THOMPSON, P. D.; ACKERMAN, M. J.; BALADY, G.; BERGER, S.; COHEN, D.; DIMEFF, R.; DOUGLAS, P. S.; GLOVER, D. W.; HUTTER, A. M. Jr; KRAUSS, M. D.; MARON, M. S.; MITTEN, M. J.; ROBERTS, W. O.; PUFFER, J. C. **Recommendations and considerations related to preparticipation screening for cardiovascular abnormalities in competitive athletes.** *Circulation*, v. 27, n. 12, p. 1643-455, 2007.

MATOS, L. D. N. J. **Canalopatias para o Clínico.** *Rev DERC.*;20(1):6-8, 2014.

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

MONTICONE, M.; TAHERIAN, R.; STIGLIANI, S.; CARRA, E.; MONTEGHIRFO, S.; LONGO, L. *et al.* **NAC, tiron and trolox impair survival of cell cultures containing glioblastoma tumorigenic initiating cells by inhibition of cell cycle progression.** *PLoS One*, v. 9, n. 2, 2014.

MOURA, I. J. L. **Efeito vasorrelaxante do fitoestrógeno Diosgenina em artéria aorta de ratas ovariectomizadas.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

NAIDU, P. B.; PONMURUGAN, P.; BEGUM, M. S.; MOHAN, K.; MERIGA, B.; RAVINDARNAIK, R.; SARAVANAN, G. **Diosgenin reorganises hyperglycaemia and distorted tissue lipid profile in high-fat diet-streptozotocin-induced diabetic rats.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014.

OLIVEIRA, A.; MANCINI FILHO, J. **Perfil nutricional e lipídico de mulheres na pós-menopausa com doença arterial coronariana.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.84, n.4, p.325-29, 2005.

PALLOS, D.; CESCHIN, A; ABREU, V. G.; BULHÕES, R. C.; QUIRINO, M. R. S.V.; SOUZA, M.R. **Menopausa: fator de risco para doença periodontal?** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.28, n.5, p. 292-297, 2006.

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

RIQUE, A. B. R.; SOARES, E. A.; MEIRELLES, C. M. **Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares.** *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.8, n.6, p.244-254, 2002.

ROGALSKI, M. *et al.* **Physico-Chemical Properties and Phase Behavior of the Ionic Liquid- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes.** *Int J Mol Sci*. v.8, p. 13-14, 2013.

SALVE, M. G. C. **Obesidade e Peso Corporal: riscos e consequências.** *Movimento e Percepção*, v.6, n.8, p.29-48, 2006.

SAWYER, 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.

SHI, Y.; SO, K. F.; MAN, R. Y. K.; VANHOUTTE, P. M. **Oxygen-derived free radicals mediate endothelium dependent contractions in femoral arteries of rats with streptozotocin-induced diabetes.** *British Journal of Pharmacology*, v. 152, p. 1033-1041, 2007.

SILVA, D. F.; PORTO, K.; ARAÚJO, D. L.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; TAVARES, J. F.; CORREIA, N. A.; GUEDES, D. N.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, I. A. **Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by discretamine in rats.** *Pharmazie*, v. 64, p. 327-331, 2009.

SILVA, J. S. F. **Efeito do relaxamento induzido por Diosgenina em artéria mesentérica de rato após administração de 17-β Estradiol.** 2014. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado em Farmácia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

SILVA-FILHO, J.C.; OLIVEIRA, N.N.P.M.; ARCANJO, D.D.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; SANTOS, M.R.V.; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, A.P. **Investigation of Mechanisms Involved in ()-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta.** *Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology*, v. 784, p. 1742-7843, 2011.

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

YAMADA, J.; YOSHIMURA, S.; YAMAKAWA, H.; SAWADA, M.; NAKAGAWA, M.; HARA, S.; KAKU, Y.; IWAMA, T.; NAGANAWA, T.; BANNO, Y.; NAKASHIMA, S.; SAKAI, N. **Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation.** *Neuroscience Research*, v. 45, p. 1-8, 2003.

YEH, J.; LIOU, S.; LIANG, J.; LEE, C.; CHIU, C.; LIN, Y.; CHEN, I. **Labeledipinedilol-C: a third generation dihydropyridine-type calcium channel antagonist displaying K<sup>+</sup> channel opening, NO-dependent and adrenergic antagonist activities.** *Journal Cardiovascular Pharmacology*, v. 46, p. 130-140, 2005.

ZHANG, D. M.; CHAI, Y.; ERICKSON, J. R.; BROWN, J. H.; BERS, D. M.; LIN, Y. F. **Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes.** *Journal of Physiology*, v. 592, p. 971–990, 2014.

## *Conclusões*



## 7 CONCLUSÕES

Este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito cardiovascular do complexo de Diosgenina com  $\beta$ -ciclodextrina em ratas ovariectomizadas e hipertensas modelo L-NAME, bem como investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos farmacológicos observados, os resultados obtidos possibilitaram as seguintes inferências:

- **Na prospecção científica e tecnológica**, os resultados mostram que existe interesse, tanto científico quanto tecnológico, com o Diosg/ $\beta$ -CD, porém o campo ainda continua aberto, tanto na área tecnológica quanto na área científica, visto que o número de patentes e de publicações é muito pequeno. Nas bases científicas, o foco está direcionado para estudos químicos, enquanto que nas bases tecnológicas, o código de classificação internacional com maior incidência foi preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas;
- **Na atividade coagulante do Diosg/ $\beta$ -CD em ratas**, os resultados demonstram evidências de que a administração oral do complexo produziu efeito coagulante em ratas através de alteração no tempo de atuação da via intrínseca de coagulação (TTPA), mas não alterou a via extrínseca (TAP e RNI), sugerindo possível interferência do Diosg/ $\beta$ -CB nos fatores de coagulação XIII, IX, XI ou XII.
- **Na avaliação do Diosg/ $\beta$ -CD na atividade antihipertensiva em ratas OVX-L-NAME**, o tratamento agudo com Diosg/ $\beta$ -CD, feito pelo método CE, melhorou a solubilidade da Diosgenina em água e apresentou significativamente a eficácia biológica da nanoformulação de Diosgenina. Além de demonstrar que a atividade antihipertensiva do complexo Diosg/ $\beta$ -CD ocorreu com efeito semelhante em animais OVX e OVX/LNAME.
- **No efeito da Diosgenina no efeito vasorrelaxante em ratas OVX**, os resultados obtidos através de uma abordagem *in vitro* demonstram que o modelo OVX altera a reatividade vascular de artéria aorta torácica. O fitoestrógeno Diosgenina

possui capacidade de inibir as contrações induzidas por fenilefrina de maneira concentração dependente em preparações com a presença de endotélio. Assim como, exerce efeito vasorrelaxante dependente de concentração e dependente do endotélio vascular sobre anéis de artéria aorta de ratas OVX. O efeito dependente do endotélio da Diosgenina parece envolver as vias NO-sintase/GMPc/COX, a participação dos receptores muscarínicos e dos ânions superóxidos; e não ocorre a inibição do influxo de cálcio através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem.

# *Perspectivas*

## 8 PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados com o complexo são bastante promissores, haja vista sua segurança biofarmacológica e as múltiplas atividades apresentadas por ele. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados, a fim de elucidar os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos encontrados, tais como:

- **Na avaliação do Diosg/ $\beta$ -CD na atividade antihipertensiva em ratas OVXL-NAME**, comparar a diosgenina com fármacos usados no mercado e que apresentem efeito hipotensor semelhante, tais como prazosina, terazosina ou doxazosina.
- **No uso para o tratamento da menopausa**, estudar o efeito do Diosg/ $\beta$ -CD com foco especial no tratamento oral crônico de ratas em regressão hormonal severa e acompanhá-las com testes de densitometria óssea.
- **Na formulação farmacêutica**, desenvolver uma formulação farmacêutica apropriada para o uso oral do Diosg/ $\beta$ -CD e testar em modelos animais maiores.

*Anexos*

## ANEXO A

Artigo intitulado “Mechanisms involved in the vasorelaxing effect of diosgenin on the aorta of OVX rats” aceito na revista Journal of Medicinal Food, qualis B1 em Biotecnologia.

← 📧 ⚠️ 🗑️ 📧 🕒 📧 🗑️ ⋮ 4 de 11 < > ⚙️

---

----- Forwarded message -----  
From: Journal of Medicinal Food <[onbehalfof@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof@manuscriptcentral.com)>  
Date: dom, 2 de dez de 2018 às 15:36  
Subject: Please Submit Copyright Form for JMF-2018-0019.R4  
To: <[aldeidia@gmail.com](mailto:aldeidia@gmail.com)>

02-Dec-2018

Dear Dr. Aldeidia Oliveira,

Please submit the copyright form for your recently accepted manuscript, JMF-2018-0019.R4, to Journal of Medicinal Food as soon as possible. You can use the link below to go directly to your Journal of Medicinal Food Author Center to complete the form.

[https://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood?URL\\_MASK=f65d550b5e8343cf8d9ce59068c0a7ca](https://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood?URL_MASK=f65d550b5e8343cf8d9ce59068c0a7ca)

Sincerely,  
Yael Ben-Porat  
Journal of Medicinal Food Editorial Office  
[yaelbenporat@me.com](mailto:yaelbenporat@me.com)

...

← Responder   ← Responder a todos   ➡ Encaminhar

## Mechanisms involved in the vasorelaxing effect of diosgenin on the aorta of OVX rats

Ilmara, C.P.S Morais<sup>1</sup>, Íris, J. Moura<sup>1</sup>, Carla Kelly B. Sabino<sup>1</sup>, Lucas, A. Nicolau<sup>1</sup>, Jand V.R.Medeiros<sup>3</sup>, Aldeídia, P. Oliveira<sup>1,2</sup>

1 Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais, 2Universidade Federal do Piauí – Teresina-PI, 3 Campus Ministro Reis Veloso Parnaíba-PI - aldeidia@gmail.com

---

### Abstract:

Diosgenin is a phytoestrogen and a constituent of *Dioscorea*. It has several biological effects, and some of them are: anti-inflammatory, antidiabetic, antitumor and vasodilatory. The present study investigated both the vasorelaxing and antioxidant mechanisms of diosgenin in isolated rat aortic rings. Diosgenin (0.1  $\mu$ M - 3mM) produced a concentration-dependent relaxation in aortic rings pre-contracted with phenylephrine (1  $\mu$ M), exhibiting  $E_{max}$  value of  $55.34 \pm 7.7\%$  (in endothelium-intact rings) and  $E_{max}$  value of  $30.30 \pm 5.7\%$  (in endothelium-denuded rings). In the endothelium-intact rings, the vasorelaxing effect of diosgenin was reduced by L-NAME (100 $\mu$ M), atropine (1  $\mu$ M), indomethacin (10 $\mu$ M), ODQ (10 $\mu$ M), 4-aminopyridine (1mM), tetraethylammonium (3mM), glibenclamide (10  $\mu$ M), apamin (10  $\mu$ M) and Tiron (10 $\mu$ M). Diosgenin ( $10^{-5}$  M) inhibited the contractions induced by cumulative addition of phenylephrine ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M). The 28-day treatment with diosgenin (50 mg/kg, v.o.) induced potent antioxidant effect and increased nitrite levels in the plasma. Our results suggest that diosgenin induced relaxation in aortic rings via an endothelium-dependent pathway, which involves the EDRF, the opening of potassium channels and antioxidant action.

**Keywords:** Diosgenin, phytoestrogen, vasorelaxing effect

## ANEXO B

Artigo intitulado “Activity of Diosgenin on the cardiovascular system: a technological and scientific exploration” submetido na revista Expert Opinion on Therapeutic Patents, qualis A1 em Biotecnologia.

Expert Opinion On Therapeutic Patents



Please download and read the [Referee Guidelines](#)

### Activity of Diosgenin on the cardiovascular system: a technological and scientific exploration

Journal:	<i>Expert Opinion On Therapeutic Patents</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Patent Evaluation
Keywords:	Diosgenin, Hypertension, Cardiovascular, Menopause

SCHOLARONE™  
Manuscripts



## Activity of Diosgenin on the cardiovascular system: a technological and scientific exploration

Carla Kelly Barroso Sabino<sup>a</sup>, Rita de Cássia Meneses Oliveira<sup>a,b</sup>, Aldeídia Pereira de Oliveira<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Biotechnology – RENORBIO, PiauÍ Focal Point – Federal Unuversity of PiauÍ, Teresina, PiauÍ, Brazil

<sup>b</sup>Medicinal Plants Research Center, Health Sciences Center, Federal Unuversity of PiauÍ, Teresina, PiauÍ, Brazil

\*Corresponding to: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aldeídia Pereira de Oliveira, PhD (aldeidia@gmail.com), Medicinal Plants Research Center, Health Sciences Center, Federal Unuversity of PiauÍ, Av. Nossa Senhora de Fátima s/n, Teresina, PiauÍ 64049-550, Brazi

---

### Abstract

In recent years, the synthesis of new molecules and the molecular modification of natural and synthetic substances with defined pharmacological properties have been the method of choice to obtain new drugs. The essential oils extracted from *Dioscorea* species *Solaum* and are rich in steroid sapogenins, including diosgenin. Essential oils extracted from this plant are of great importance in the cosmetic, food and pharmaceutical industries. Additionally, natural diosgenin showed a significant cardioprotective and antioxidant effect. The aim of this research was to carry out a mapping of the activity of diosgenin on the cardiovascular system from patents electronic databases and scientific papers. It was analyzed that most patents and articles on this topic are written in English and that the countries with the highest search volume related to this subject is the United States, Canada and the WIPO (World Intellectual Property Organization). Brazil has few research related to cardiovascular activity of diosgenin.

**Key-words:** diosgenin, cardiovascular, hypertension, menopause, cyclodextrin.