

Efeito Vascular do Diterpeno Esclareol em Aortas Torácicas de Ratos Normotensos e Hipertensos

The Diterpene Sclareol Vascular Effect in Normotensive and Hypertensive Rats

Debora Ribeiro Campos, Andrea Carla Celotto, Agnes Afrodite S. Albuquerque, Luciana Garros Ferreira, Ariadne Santana e Neves Monteiro, Eduardo Barbosa Coelho, Paulo Roberto Barbosa Evora

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: O diterpeno Esclareol tem ação antimicrobiana, efeitos citotóxicos e citostáticos e atividades antitumorais. No entanto, pesquisas sobre o sistema cardiovascular são escassas.

Objetivo: Este estudo foi desenvolvido para investigar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular de Esclareol em ratos normotensos e hipertensos.

Métodos: A hipertensão arterial foi promovida utilizando modelo de 2 clones de 1-clipe em ratos. O efeito do esclareol sobre a pressão arterial foi realizado utilizando três doses (10, 20 e 40 mg/kg). As curvas dose-resposta cumulativas para Esclareol foram determinadas para anéis aórticos endotélio-intactos e desprovidos de endotélio na presença ou ausência de L-NAME e ODQ. Os níveis de NOx foram medidos na amostra de plasma.

Resultados: A administração de Esclareol *in vivo* causou uma redução significativa na pressão sanguínea em ambos os grupos. *In vitro* o esclareol promoveu relaxamento na aorta, com endotélio, pré-contraído a Phe. Os inibidores da óxido nítrico sintase e da guanilato ciclase solúvel foram tão eficientes quanto a remoção do endotélio, na inibição do relaxamento induzido por Esclareol. Por outra parte, não houve mudança de NOx. Além disso, por razões desconhecidas, o Sclareol não é seletivo para animais hipertensos.

Conclusão: 1) O diterpeno Esclareol apresentou efeitos hipotensores *in vivo* e vasodilatadores *in vitro*; 2). A análise de NO plasmático por quimioluminescência não mostrou diferença significativa entre os grupos e 3) O Esclareol exibe melhor efeito sobre os animais normotensos do que hipertensos para reduzir a pressão arterial. Conclui-se que os metabólitos de diterpenos seriam um protótipo de fonte promissora para o desenvolvimento de novos agentes na terapia cardiovascular. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(2):117-123)

Palavras-chave: Diterpenos / uso terapêutico; Ratos; Hipertensão; Anti-Infeciosos; Citotoxinas.

Abstract

Background: The diterpene Sclareol has antimicrobial action, cytotoxic and cytostatic effects and anti-tumor activities. However, researches on the cardiovascular system are scarce.

Objective: This study was designed to investigate the mechanisms involved in the Sclareol cardiovascular effect in normotensive and hypertensive rats.

Methods: The arterial hypertension was promoted using 2-kidneys 1-clip model in rats. The effect of sclareol on blood pressure was performed by using three dose (10, 20 and 40 mg/kg). Cumulative dose-response curves for Sclareol were determined for endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings in presence or absence of L-NAME and ODQ. The NOx levels were measure in the plasma sample.

Results: The Sclareol administration *in vivo* caused a significant reduction in blood pressure in both groups. *In vitro* the sclareol promoted relaxation in aorta, with endothelium, pre-contracted to Phe. The inhibitors of the nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase were as efficient as the removal of endothelium, in inhibiting the Sclareol-induced relaxation. Otherwise, it was no change of NOx. Also, for unknown reasons, the Sclareol is not selective for hypertensive animals.

Conclusion: 1) The diterpene Sclareol showed *in vivo* hypotensive and *in-vitro* vasodilator effects; 2). The chemiluminescence plasmatic NO analysis showed no significant difference between groups and 3) The Sclareol exhibit better effect on normotensive than hypertensive animals to reduce blood pressure. It is concluded that the diterpenes metabolites would be a promising source prototype for the development of new agents in the cardiovascular therapy. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(2):117-123)

Keywords: Diterpenes / therapeutic use; Rats; Hypertension; Anti-Infective Agents; Cytotoxins.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Paulo Roberto Barbosa Evora •

Rua Rui Barbosa, 367/15, CEP 14015-120, Centro, Ribeirão Preto, SP – Brasil

E-mail: prbevora@cardiol.br, prbevora@gmail.com

Artigo recebido em 07/07/2016, revisado em 21/11/2016, aceito em 24/01/2017

DOI: 10.5935/abc.20170086

Introdução

O reino vegetal tem contribuído de forma significativa para fornecer substâncias úteis no tratamento de doenças que afetam aos seres humanos. Neste contexto, os diterpenos são uma grande classe de metabólitos secundários produzidos pelas plantas e têm muitas atividades biológicas importantes.¹ Vários estudos observaram essas substâncias como uma fonte promissora de novas pistas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes para uso em terapia cardiovascular e mostraram que muitas classes diterpenoides exercem efeito significativo no sistema cardiovascular.²⁻⁵ Estes estudos sugerem que os metabólitos se classificam como um protótipo de fonte promissora para o desenvolvimento de novos agentes na terapia cardiovascular. Os diterpenos são sintetizados em plantas localizadas em plástidos, mas também podem ser sintetizados por certos insetos e organismos marinhos.

O diterpeno Esclareol (Figura 1) é extraído das inflorescências *Salvia sclarea* L., grama relativamente fácil de crescer e de alto rendimento.⁶ Estudos usando este composto mostraram sua ação antimicrobiana, efeitos citotóxicos e citostáticos sobre linhas celulares leucêmicas e atividades antitumorais.⁷⁻¹⁰ No entanto, estudos sobre este composto no sistema cardiovascular são escassos, ou talvez nunca tenha sido estudado. Por esse motivo, é crucial que essas investigações sejam realizadas, considerando que este composto é altamente disponível e seguro para testes. Portanto, este estudo foi desenvolvido para investigar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular (in vitro e in vivo) do diterpeno Esclareol em ratos normotensos e hipertensos.

Métodos

Declaração ética e animais

Os procedimentos e políticas experimentais de manejo de animais foram revisados e aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e pela Diretiva da Comissão Europeia 2010/63/UE. Vinte ratos Wistar machos (180-220 g) foram alojados em condições laboratoriais normais

(ciclo de luz/escuridão de 12 h a 21°C) com acesso livre a alimentos e água. Os animais foram sorteados e divididos em dois grupos de 7 animais: normotensos e hipertensos para protocolos de pressão arterial e 6 animais de controle para protocolo de reatividade vascular. Os ratos do grupo hipertenso foram submetidos ao procedimento cirúrgico 2K1C para indução de hipertensão, enquanto os animais do grupo normotenso foram submetidos a cirurgia sham.

Drogas

Acetilcolina (ACh), 1H- [1,2,4] oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ), fenilefrina (Phe) e Esclareol foram adquiridos a Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). Foi obtido o éster metílico de N ω -nitro-L-arginina (L-NAME) de Calbiochem (San Diego, CA, EUA). Isoflurano de Abbott. Todos os sais utilizados para a preparação da solução de Krebs foram fornecidos pela Vetec Química Fina Ltda. Quase todos os fármacos foram preparados com água destilada, exceto para a indometacina (que foi dissolvida em etanol) e Esclareol (solubilizado em dimetilsulfóxido e diluído em etanol + água).

Indução da hipertensão

Os animais foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a anestesia completa, os ratos foram submetidos à laparotomia: metade dos animais apresentou constrição parcial da artéria renal esquerda principal com clipe de prata com uma folga de 0,10 mm (Goldblatt et al.,¹¹) e metade deles tiveram a artéria renal esquerda principal isolada, mas não receberam o clipe (sham). Para monitorar o desenvolvimento da hipertensão, a PAS foi medida de forma não invasiva por meio de um manguito de cauda, uma vez por semana. (Kent Scientific Corporation, Connecticut, EUA).¹² Os ratos 2K1C foram considerados hipertensos se tivessem uma PAS \geq 160 mmHg na 3ª semana após os procedimentos cirúrgicos. Os ratos 2K1C com PAS < 160 mmHg à 3ª semana foram eutanizados. Os ratos sham constituíram o grupo normotensivo. Três semanas após a indução da hipertensão, os animais foram anestesiados e a artéria e veia femoral foram canuladas para medição contínua da pressão arterial sistólica (PAS) e administração de fármacos, respectivamente.

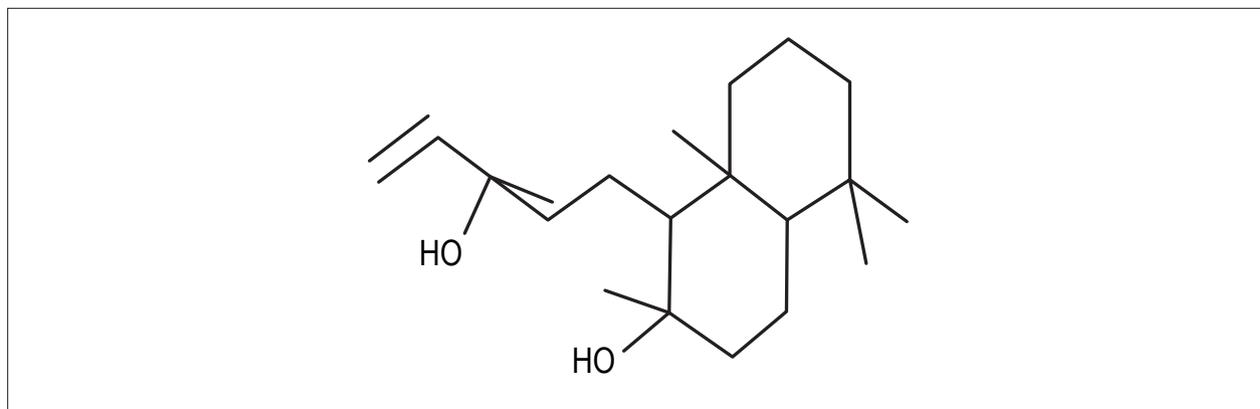


Figura 1 – Estrutura molecular do Esclareol.

Efeito do Esclareol sobre a pressão arterial sistólica

Após a anestesia (uretano, 2 g/kg, intraperitoneal), canulação vascular e período de estabilização (20 minutos) com registro contínuo de PAS em tempo real, três doses de Esclareol (10, 20 e 40 mg/kg) ou veículo (DMSO e água + etanol) foram administradas aos ratos normotensos e hipertensos. A administração do veículo foi realizada antes da curva esclareol nos dois grupos e porque não tínhamos diferença entre normotensos e hipertensos, misturamos então. Cada dose foi administrada num bolus intravenoso de 200 μ L e o intervalo entre duas doses consecutivas foi de 6 minutos (tempo necessário para o retorno da PAS para os valores basais). Para cada animal, a variação na pressão arterial sistólica (Δ PAS) foi calculada subtraindo a média dos valores mais baixos de PAS imediatamente após a administração de Esclareol da média dos valores basais de PAS antes do bolus de Esclareol. A monitorização da pressão arterial média foi medida utilizando MP System 100 A (BioPac System, Inc., Santa Bárbara, CA, EUA).

Reatividade vascular

Cinco ratos Wistar machos (280-300g) foram anestesiados com isoflurano inalatório, seguido de laparotomia para exsanguinação via aorta abdominal e toracotomia para colheita da aorta torácica. A aorta torácica foi cuidadosamente dissecada, confirmada como isenta de tecido conjuntivo, e imediatamente imersa em solução de Krebs. A solução de Krebs foi composta de NaCl (118,0 mM), KCl (4,7 mM), CaCl₂ (2,5 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), MgSO₄ (1,66 mM), glucose (11,1 mM) e NaHCO₃ (25,0 mM); A solução tinha um pH de 7,4. A aorta torácica imersa em solução de Krebs foi cortada em anéis que tinham 4-5 mm de comprimento. O endotélio foi removido de alguns dos anéis esfregando suavemente a superfície íntima do vaso sanguíneo com um par de pinças de relojoeiro. Este procedimento remove eficazmente o endotélio, mas não afeta a capacidade do músculo liso vascular de contrair ou relaxar. Os anéis aórticos foram colocados em banhos de órgãos isolados (10 mL) cheios com solução de Krebs, mantidos a 37°C e borbulhados com 95% O₂/5% CO₂ (pH 7,4). Cada anel arterial foi suspenso por dois cliques de aço inoxidável que foram inseridos através do lúmen. Um grampo foi ancorado ao fundo do banho de órgãos enquanto o outro foi ligado a um medidor de tensão para medir a força isométrica com o auxílio do equipamento Grass FT03 (Grass Instrument Company, Quincy, MA, EUA). Cada anel foi esticado para a tensão de comprimento ótima de 2,0 g, que tinha sido determinada num estudo piloto, e foi deixado a equilibrar durante 60 min. Durante este período, os tecidos foram lavados a cada 15 min. Considerou-se que o endotélio estava presente (E +) quando o relaxamento induzido pelo Ach era pelo menos 80% após a pré-contracção com Phe (10-6 M). O endotélio foi considerado ausente (E-) quando a resposta de relaxamento não ocorreu. Em seguida, cada anel foi lavado e reequilibrado durante 30 min. Os anéis aórticos foram pré-contráídos com Phe (10-6 M) após atingir um patamar estável e foram obtidas curvas dose-resposta de Esclareol. Os ensaios de concentração-resposta nos banhos

de órgãos foram realizados na presença ou ausência: L-NAME (10-4 M), um inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase e ODQ (10-4 M), um inibidor da guanilil ciclase. As preparações foram incubadas com os inibidores durante 30 min.

Medições indiretas de plasma de NO

As amostras de sangue foram colhidas através da veia femoral após administração de esclareol e colocadas em tubos contendo heparina. Após centrifugação com sangue (3000 \times g, 10 minutos, 4°C), alíquotas de plasma foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até as medições de nitrito e nitrato (NOx). As amostras foram analisadas em duplicado para NOx utilizando um ensaio de quimioluminescência a base de ozônio. Resumidamente, as amostras de plasma foram tratadas com etanol frio (1 volume de plasma: 2 volumes de etanol durante 30 minutos a -20°C) e centrifugadas (4000 \times g, 10 minutos). Os níveis de NOx foram medidos por injeção de 25 μ L do sobrenadante num recipiente de purga de vidro contendo 0,8% de vanádio (III) em HCl (1 N) a 90°C, o que reduz o NOx em gás NO. Fez-se borbulhar uma corrente de nitrogênio através do recipiente de purga contendo vanádio (III), depois através de NaOH (1 N) e depois num analisador de NO (Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280, GE Analytical Instruments, Boulder, CO, EUA).

Análise estatística

Os dados são expressos como médias \pm o desvio padrão da média (SEM). Realizou-se análise estatística com análise de variância bidirecional de medidas repetidas (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, ou teste t de Student para detectar possíveis diferenças entre os valores no estudo. $P < 0,05$ foi considerado significativo. (Prism 5.0, Software GraphPad, San Diego, CA, EUA). Um tamanho de amostra de (N = 5) animais por grupo proporcionou potência de 95% com um nível de significância de 0,05 para detectar uma redução relativa de 10% na contração máxima em vasos pré-contráídos e um tamanho de amostra de (N = 7) animais por grupo proporcionou potência de 95% com um nível de significância de 0,05 nos protocolos de medição da pressão sanguínea in vivo. O número de animais foi escolhido com base na literatura.

Resultados

Antes dos procedimentos cirúrgicos, não havia diferenças na PAS entre os grupos normotensos e hipertensos (sham: 120,7 \pm 3,5 mmHg versus 2K1C: 133,8 \pm 3,6 mmHg, $p > 0,05$). No entanto, da 1ª à 3ª semana após a indução da hipertensão, a PAS aumentou significativamente nos ratos hipertensos (sham na 3ª semana após os procedimentos cirúrgicos: 130,6 \pm 3,8 mmHg versus grupo 2K1C na 3ª semana após os procedimentos cirúrgicos: 192,9 \pm 10,2 mmHg, $p < 0,001$) (Figura 2).

Todas as três doses de Esclareol (10, 20 e 40 mg/kg) diminuíram significativamente a PAS em ratos normotensos (veículo: -10,7 \pm 6,7 mmHg versus esclareol normotensos: -43,1 \pm 7,1 mmHg a 10 mg/kg, $p < 0,01$, Veículo: -4,8 \pm 2,8 mmHg versus esclareol normotenso: -45,5 \pm 6,0 mmHg a 20 mg/kg, $p < 0,01$, veículo: -2,8 \pm 2,3 mmHg versus Esclareol

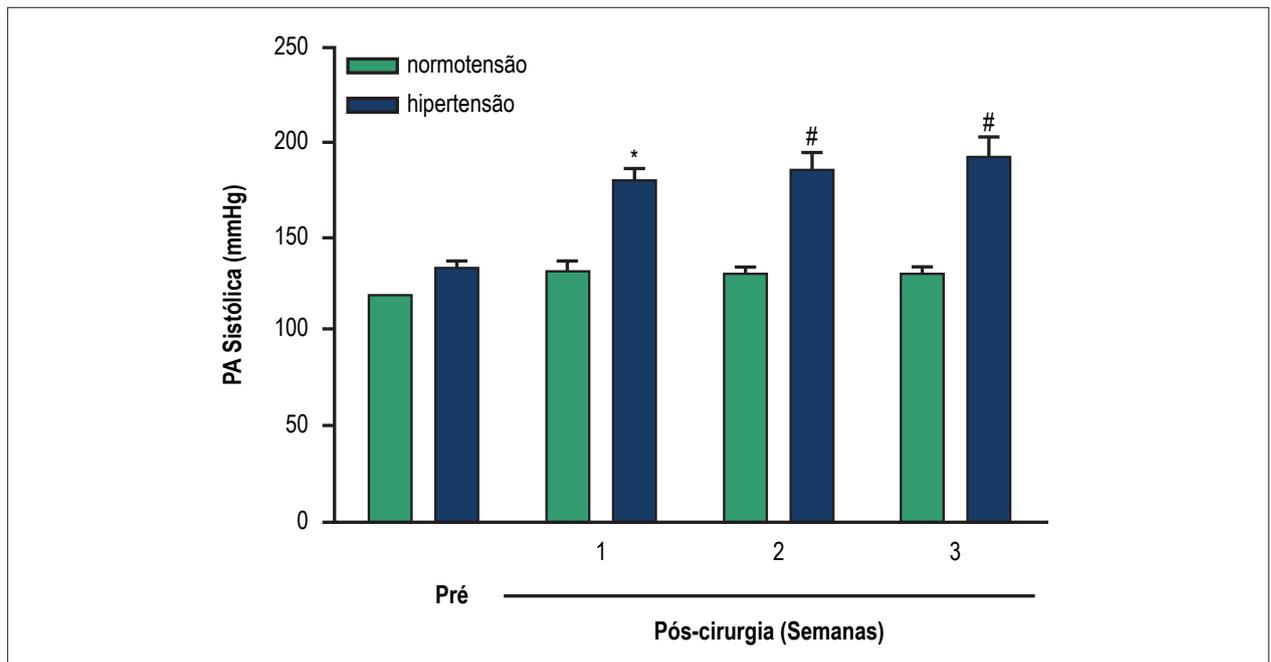


Figura 2 – Evolução temporal da pressão arterial sistólica não invasiva em animais normotensos e hipertensos. Os valores representam a média \pm desvio padrão da média ($n = 7$). PAS 2K1C antes da cirurgia (pré-operatório) e nas 3 semanas após a cirurgia. * ($p < 0,01$) e # ($p < 0,001$) indicaram diferença significativa no grupo hipertenso em relação ao grupo normotenso.

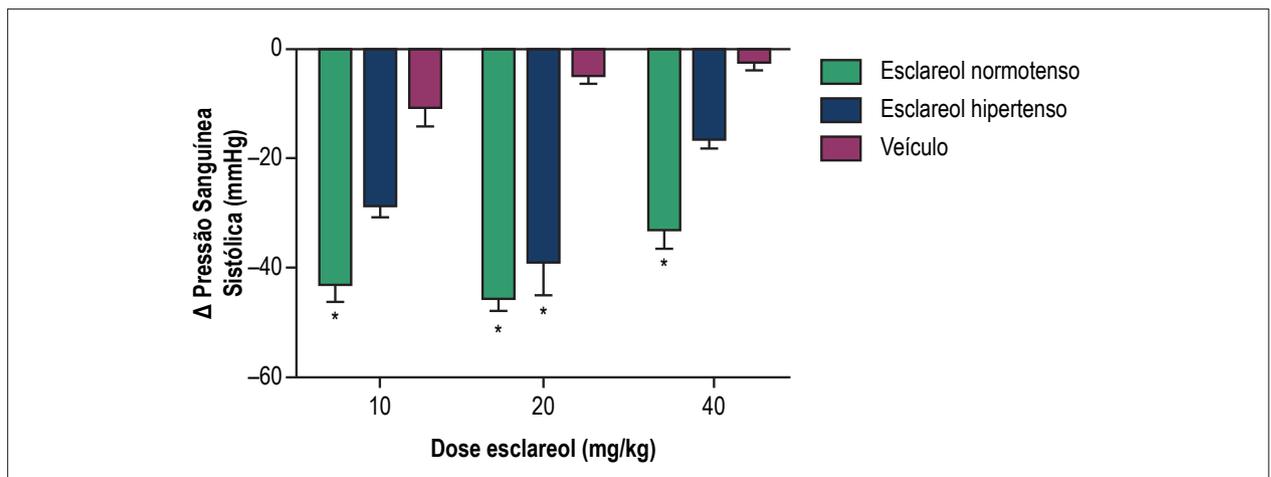


Figura 3 – Imagem representativa da variação da PAS, após três doses de Esclareol ou veículo. ($N = 7$). * ($p < 0,01$) entre o veículo e grupos normotensos ou hipertensos.

normotenso: $-33,3 \pm 7,0$ mmHg a 40 mg/kg, $p < 0,01$). No entanto, apenas a dose de 20 mg/Kg de esclareol altera a PAS nos animais hipertensos (veículo: $-4,8 \pm 2,8$ mmHg versus esclareol hipertensivo: $-39,1 \pm 15,8$ mmHg a, $p > 0,05$) (Figura 3).

No caso das artérias pré-contraídas, o Esclareol promoveu um relaxamento dose-dependente apenas nos anéis intactos (E + $52,9 \pm 5,0\%$ versus E - $6,9 \pm 4,0\%$). A incubação com L-NAME ou ODQ bloqueou totalmente o relaxamento induzido por Esclareol em ambos os anéis intactos do endotélio (Figuras 4 e 5).

A concentração plasmática de NOx não se alterou entre todos os grupos (veículo: $55,4 \pm 7,4 \mu\text{M}$, esclareol normotenso: $52,5 \pm 3,9 \mu\text{M}$ e veículo hipertensivo: $68,7 \pm 8,3 \mu\text{M}$). (Figura 6).

Discussão

Os resultados in vivo obtidos após a administração de três doses crescentes de Esclareol demonstram que promoveu uma redução na PA, tanto nos animais normotensos como nos hipertensos. Os mecanismos envolvidos neste

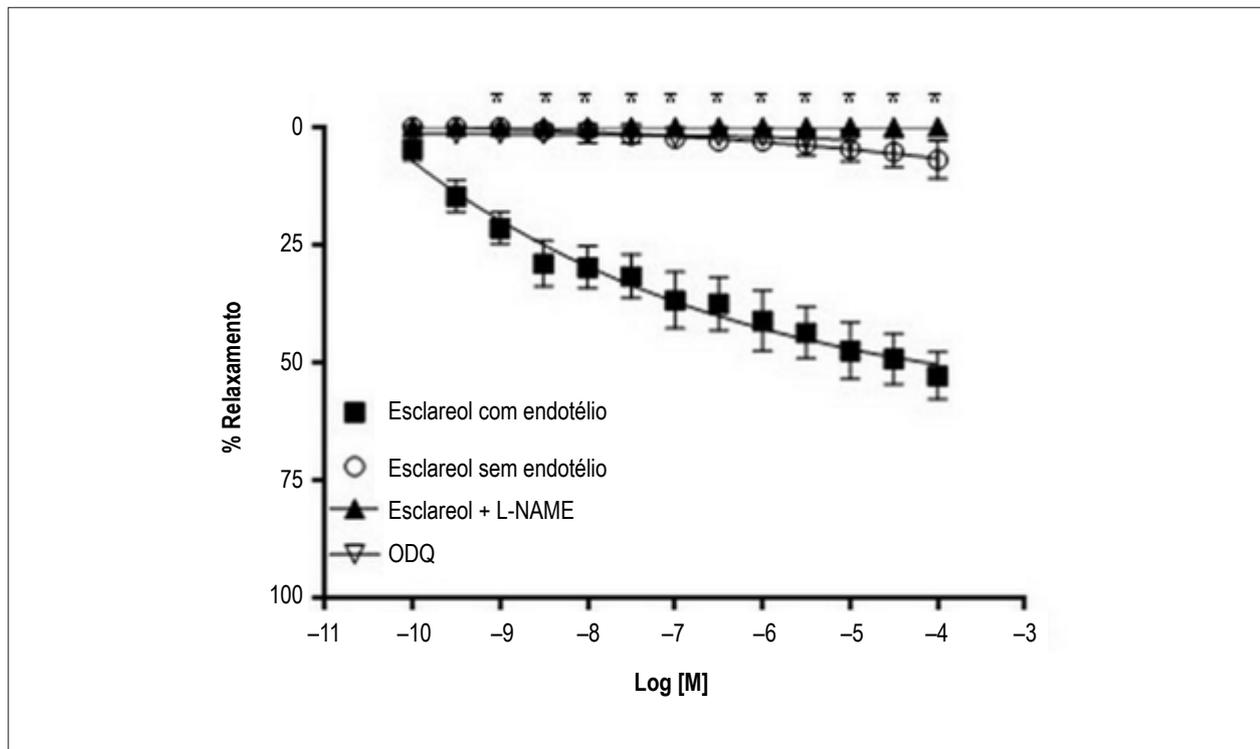


Figura 4 – Curva de resposta à dose Esclareol na presença de inibidores. Após a pré-contracção com Phe 10-7 M, os anéis foram submetidos a uma curva de resposta à dose de 10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ na presença de L-NAME e inibidor ODQ. * (p < 0,001) indicam uma diferença significativa entre os grupos com inibidores e controle. (N = 6).

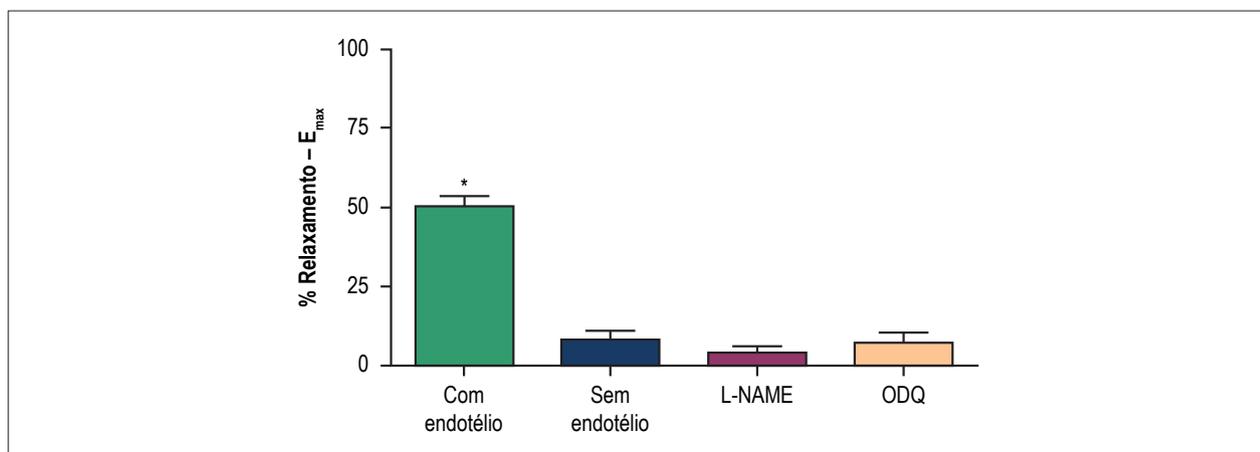


Figura 5 – Efeito relaxante máximo na presença de inibidores. O E_{max} foi obtido a partir de curvas dose-resposta, utilizando regressão não-linear. * (p < 0,001)

efeito relaxante permanecem desconhecidos. No entanto, este efeito pode estar relacionado com o fato de estes compostos serem possivelmente responsáveis pela ativação das vias de NO. Analisando mais profundamente os dados coletados no modelo 2K1C, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) é o fator primário no desenvolvimento da hipertensão.¹³ Na hipertensão, há uma ativação do RAAS e, por sua vez, uma maior inibição da Kalikrein-kinin (CMS) pelo ACE,^{14,15} isso pode resultar em uma redução menor na PAS induzida pelo Esclareol no grupo hipertenso. A maior redução

da PAS no grupo normotensos, em resposta à administração de Esclareol, pode ser indicativa de uma interação entre o RAAS e o SCC.^{14,15} No entanto, são necessárias mais experiências para determinar a causa real.

O segundo mecanismo possível envolvido no efeito hipotensivo do esclareol, é a propriedade vasodilatadora. Testou-se o efeito vasorrelaxante do Esclareol, in vitro, utilizando anéis aórticos isolados de rato pré-contráidos com fenilefrina. O efeito relaxante observado a partir da curva dose-resposta de esclareol, nos anéis desnudados de aorta

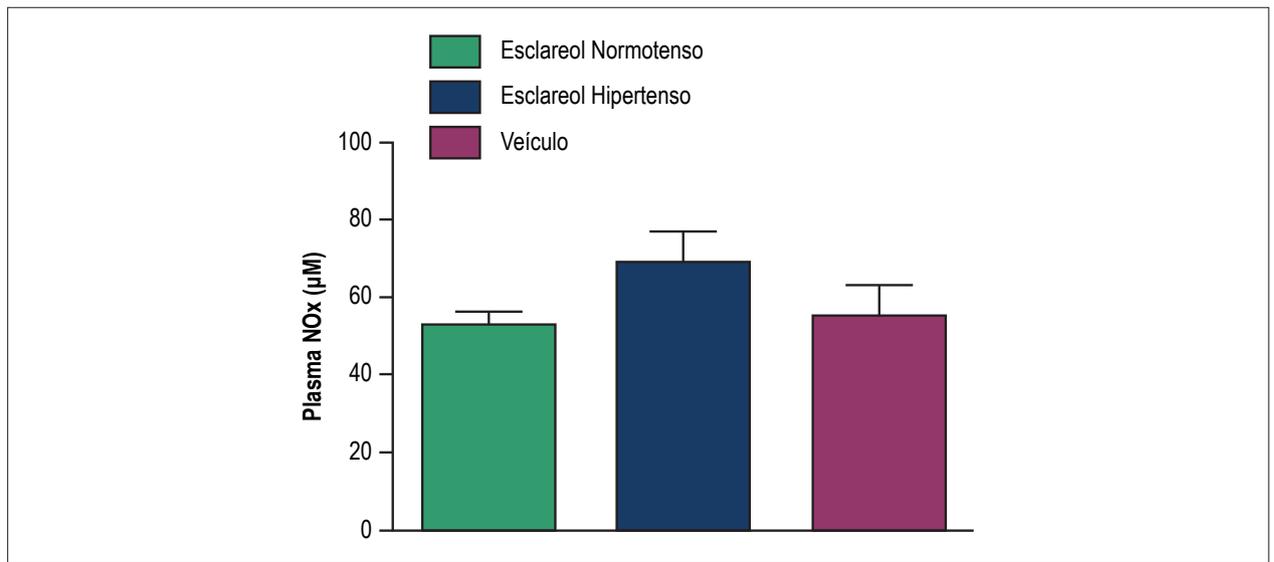


Figura 6 – Níveis plasmáticos de nitrito e nitrato (NOx) em animais normotensos e hipertensos. Os animais foram pré-tratados com veículo ou Esclareol. (N = 7).

de rato, foi completamente bloqueado por incubação com L-NAME (inibidor não seletivo de NOS) e ODQ (inibidor da guanilato ciclase), o que indica que o Esclareol promove a vasorrelaxação via caminho NO/cGMP.

No presente estudo, as medições indiretas do NO foram realizadas por determinação dos níveis séricos de nitrito e nitrato utilizando o SieversNOAnalyzer 280i. Não houve diferenças significativas entre o grupo tratado com Esclareol e o grupo veículo. No entanto, a análise do NO no plasma pode ser influenciada em diferentes estágios do processo, pois é uma análise muito fina. A partir deste resultado, o ideal seria medir em tempo real de NO em células endoteliais isoladas estimuladas com os compostos. Este protocolo foi testado de diferentes maneiras, mas não tivemos sucesso. Após várias tentativas, acreditamos que os compostos, de alguma forma interferem com a leitura do sly (DAF) usado.

Conclusão

O diterpeno Esclareol mostrou efeitos in vivo e hipotensores in-vitro; 2). A análise de quimioluminescência do NO plasmático não mostrou diferença significativa entre os grupos e 3) Por razões desconhecidas, o Esclareol não é seletivo em animais hipertensos. Por isso, é importante que mais pesquisas envolvendo o diterpeno Esclareol na função cardiovascular possam explorar mais detalhes sobre os mecanismos de ação. A partir dos dados obtidos neste estudo, conclui-se que a

classe de metabólitos de diterpenos seria um protótipo de fonte promissora para o desenvolvimento de novos agentes na terapia cardiovascular.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Campos DR, Celotto AC, Évora PRB; Obtenção de dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Campos DR, Celotto AC, Albuquerque AAS, Ferreira LG, Monteiro ASN, Coelho EB, Évora PRB; Análise e interpretação dos dados: Campos DR, Celotto AC, Albuquerque AAS, Monteiro ASN, Évora PRB; Análise estatística: Campos DR, Celotto AC, Albuquerque AAS, Évora PRB; Obtenção de financiamento: Évora PRB.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo CNPq.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Debora Ribeiro Campos pela Universidade de São Paulo.

Referências

1. Rieder C, Strauss G, Fuchs G, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W. Biosynthesis of the diterpene verrucosan-2beta-ol in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. A retrobiosynthetic NMR study. *J Biol Chem*. 1998;273(29):18099-108.
2. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest*. 2010;138(3):682-92.
3. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004;84(3):731-65.
4. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:749-74.
5. Caissard JC, Olivier T, Delbecque C, Palle S, Garry PP, Audran A, et al. Extracellular localization of the diterpene sclareol in clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). *PLoS One*. 2012;7(10):e48253.
6. Ulubelen A, Topcu G, Eriş C, Sönmez U, Kartal M, Kurucu S, et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*. 1994;36(4):971-4.
7. Huang GJ, Pan CH, Wu CH. Esclareol exhibits anti-inflammatory activity in both lipopolysaccharide-stimulated macrophages and the λ -carrageenan-induced paw edema model. *J Nat Prod*. 2012;75(1):54-9.
8. Noori S, Hassan ZM, Mohammadi M, Habibi Z, Sohrabi N, Bayanolhagh S. Esclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. *Cell Immunol*. 2010;263(2):148-53.
9. Dimas K, Kokkinopoulos D, Demetzos C, Vaos B, Marselos M, Malamas M, et al. The effect of Esclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leuk Res*. 1999;23(3):217-34.
10. Mahaira LG, Tsimplouli C, Sakellariadis N, Alevizopoulos K, Demetzos C, Han Z, et al. The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action. *Eur J Pharmacol*. 2011;666(1-3):173-82.
11. Golsblatt H, Lynch J, Hangal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934;59:347-79.
12. Measuring mouse & rat blood pressure. [Cited in 2016 Dec 10]. Available from: <http://www.kentscientific.com>
13. Ferrario C, Carretero O. Hemodynamics of experimental renal hypertension. In: de Jong W. (editor). *Handbook of hypertension: experimental and genetic models of hypertension*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV; 1984. v.4, p. 54-80.
14. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991;17(5):707-19.
15. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Targ Wang C, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the mystery of goldblatt hypertension. *News Physiol Sci*. 1998;13:170-6.