

COD. DEB. 68938

F. 1383 8845 / 05 11104105-1300

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E NITRÉRGICA:  
PREVENÇÃO E/OU REVERSÃO POR  
ANTIOXIDANTES NATURAIS E  
COMPONENTES DO MEDIADOR PUTATIVO  
DA INSULINA

T 616.762

N 1938

m. 3

NILBERTO ROBSON FALCÃO DO NASCIMENTO

Fortaleza-Ceará  
2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Disfunção endotelial e nitrérgica: prevenção e/ou  
reversão por antioxidantes naturais e componentes  
do mediador putativo da insulina

Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Tese apresentada ao programa de Pós-  
graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará, sob  
orientação do Prof. Dr. Manassés Claudino  
Fonteles, como requisito parcial para  
obtenção do título de doutor em  
Farmacologia

Fortaleza-Ceará  
2004



Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Defesa Formal aprovada em 10/05/2004,

---

Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Banca examinadora)

---

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles  
Orientador

---

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

---

Prof. Dra. Maria Goretti Rodriguez Queiroz

---

Prof. Dr. Gilberto de Nucci  
(UNICAMP)

---

Prof. Dra. Adriana Costa e Forti  
(UFC)

## OFERECIMENTO

Ofereço este trabalho a minha mãe Maria Consuelo Falcão que aos sete anos saiu do seringal onde morava a 300 Km de Rio Branco, foi auxiliar de enfermagem por mais de 20 anos e depois de muitos anos de luta consegui entrar na Faculdade de Enfermagem. Hoje trabalha na Fundação Hospitalar do Acre como enfermeira chefe no setor de doenças contagiosas. Apesar de terem sido raros nossos momentos juntos na infância e adolescência, pois tinha que trabalhar em três empregos para sustentar os filhos, seu exemplo me tornou forte. Espero que hoje ao ver seus filhos estudando e se formando tenha orgulho de tudo fez. Te amo.

Ofereço ao meu avô João do Rego que criou 13 filhos num seringal após a morte da esposa. Tenho certeza que sua força é nossa herança mais cara. Agradeço em especial pelo papel de pai que se o Sr. desempenhou com tanto carinho para mim e meus irmãos e pelo período (1990-1995) que morou comigo em Fortaleza me servindo de amigo e dono de casa.

Ofereço ao meu orientador prof. Manassés Claudino Fonteles que com paciência soube driblar minhas múltiplas e enormes idiossincrasias. Por sua visão empreendedora que transformou a Universidade Estadual do Ceará e por sua incansável luta para qualificar o pessoal de nível superior do Ceará. Seu exemplo de vida também me toca e inspira, desde sua infância em Aquiraz até as conferências e prêmios recebidos em Universidades americanas. O que posso dizer é que sou eternamente grato pelo privilégio de trabalhar com o Sr. e por toda ajuda, e Deus é testemunha de quanta, que o Sr. me prestou.

“Por esta razão, importa que nos apeguemos, com mais firmeza, às verdades ouvidas, para que delas jamais nos desviemos”.(Hebreus 2:1).



## AGRADECIMENTOS

A Deus fonte de toda vida e inspiração para as boas obras.

A minha mãe Maria Consuelo Falcão por seu exemplo de luta e coragem diante das dificuldades, por suas infindáveis batalhas para criar os filhos e por ter prezado sempre o estudo. Entrou na Faculdade aos quarenta anos, após dez anos de tentativa, e nos deixou um legado de persistência e hombridade.

Ao meu pai Manoel do Nascimento Almeida por ter finalmente vencido sua luta contra o alcoolismo. O silêncio de seu olhar carinhoso e as tardes de futebol na televisão ainda me são lembranças caras.

Ao meu avô João do Rego que também cumpriu com papel de pai em várias oportunidades e que é minha referência de seriedade e honestidade.

À minha avô Rita Adriana da Silva e minha vó “Bina” que me legaram o sangue Kaxinawá do qual muito me orgulho.

Aos meus irmãos José Roberto Falcão do Nascimento, Carlos Alberto Falcão do Nascimento, Humberto Wellington Falcão do Nascimento e Rita Adriana Falcão do Nascimento pelos momentos de alegria que tivemos. Tenho muita saudade e esperança de nos encontrarmos ainda.

A meus filhos Luis Alfredo Soares Falcão, Levi João Soares Falcão e Samuel de Castro Falcão que são minha força eletromotriz.

À minha companheira Ludmila Mota de Castro pela paciência nos momentos difíceis e apoio constante e irrestrito.

Ao meu orientador prof. Manassés Claudino Fonteles que nos momentos mais difíceis foi um timoneiro forte e me tornou mais maduro. A transformação que vivi

nesses doze anos de convivência, “aos pés de Gamaliel”, superou em muito o campo acadêmico e posso dizer que tive uma formação sólida para toda a vida. Estendo os agradecimentos a sua esposa Maria das Graças de Sá Roriz Fonteles que tem nos apoiado e inspirado com amizade, poesias, canções e orações.

Ao prof. Gilberto de Nucci, por abrir as portas da sua casa a um completo estranho e tratá-lo como se fosse membro de sua família. Por abrir as portas de seu laboratório no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina na Universidade de Campinas para que eu pudesse estagiar durante um mês na técnica de corpo cavernoso isolado em superfusão em cascata. Estendo o agradecimento aos seus alunos de pós-graduação Cléber Evandro Teixeira e Juliano Fernandes de Oliveira pela paciência, gentileza e prestimosidade com que me ensinaram a técnica sem nenhuma reserva.

Aos professores do Instituto de Biomedicina (IBIMED), prof. Otoni Cardoso do Vale e Helena Serra Azul Monteiro pela paciência e orientação.

Ao presidente do IBIMED, Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima pela paciência e simpatia durante todos esses anos. Pelo seu espírito inovador e por manter uma rede logística de primeira para o uso dos alunos de pós-graduação do IBIMED. Especialmente o acesso à biblioteca da Universidade da Virginia (Charlottesville, VA, USA) na qual peguei grande parte dos trabalhos que usei nesta tese.

Ao prof. José Henrique Leal Cardoso por ter me apoiado nesta difícil caminhada de doutoramento e pela disposição em ajudar sempre que necessário.

Às minhas amigas-irmãs Maria Daniele Azevedo Teixeira, Marta Regina Kerntopf e Lucília Maria de Abreu Lessa pelos momentos de descontração nos nossos mutirões no laboratório. Nosso “esforço de guerra” tem rendido bons frutos. “Em todo tempo ama o amigo, e na angústia se faz o irmão” (Provérbios 17:17) .

Aos meus amigos da Faculdade de Veterinária, Alexandre Havt Bindá, Angélica Maria Luna Costa, Paulo Hugo Leite Sousa, Márcio José Almeida de Sousa, Karina

Moreira de Alencar Cunha por terem sido minha família no Ceará e todos das turmas de 1990.1 a 1992.0.

Aos bolsistas e ex-bolsistas, eternos amigos, Jarbas de Sá Roriz Filho, Fábio Bernardo Almeida de Sousa, Francisco José Arnaud Batista, Ana Carla de Alcântara, Lucília Maria de Abreu Lessa e Clauber Mota Sousa pelo crescimento mútuo e momentos de aprendizado associados a um clima de fraternidade.

Aos alunos-amigos, Ana Lourdes Camurça Vasconcelos, Luciana Magalhães Melo, Patrícia Limaverde, Israel Moreira Lima e Gilson Barbosa Melciádes que me ensinaram tanto quanto, ou mais, do que aprenderam comigo.

Aos colegas de pós-graduação Adriana da Rocha Tomé, Messias Simões dos Santos Neto, Rômulo Feio Farias, Paulo Sérgio Barbosa, Alice Maria Costa Martins, Arlândia Cristina Lima Nobre, Lúcio Flávio Gonzaga da Silva (que não cansa de perder para mim no xadrez), Valéria Góes Ferreira (grande alma) e Maria Amélia Carneiro Bezerra pela convivência fraterna.

Aos coordenadores e professores do curso de pós-graduação em Farmacologia por sua excelência e por terem mantido sempre um clima de apoio aos pós graduandos.

Aos funcionários do IBIMED José Amadeus de Sousa, Francisco Bento de Oliveira, Jociê Andrade da Silva, Kátia Maria Lima, Sílvia Helena Freire França, Joana Tavares, Tereza Freire França, Domingos Barreto de Oliveira por estes 11 anos de convivência que nos tornaram amigos mais que colegas de trabalho.

A Domingos Barreto e Gardênia pelas inúmeras dosagens bioquímicas realizadas.

À professora Maria Goretti Rodrigues de Queiroz pela ajuda inestimável, pela colaboração preciosa que ainda nos renderá bons frutos e pela simpatia em todos os momentos. Agradeço aos seus bolsistas Renata de Sousa Alves, Roberto Falcão, Daniel, Jamille, Vânia, Cleidiane e todos os outros que não lembro o nome, mas que contribuíram em muito para a execução deste trabalho.



À professora Maria Augusta Drago Ferreira pelas valiosas dicas e pela amizade fraterna e descompromissada.

Às funcionárias da pós-graduação Aura Rhanes Yida, Silvia Lima e Roselene Ferreira por sua eficiência, prestimosidade e gentileza.

A Universidade Estadual do Ceará, em particular ao Departamento de Medicina Veterinária que sempre me apoiaram durante o decorrer deste curso de doutorado.

Às professoras Ana Paula Ribeiro Rodrigues e Adriana da Rocha Tomé por terem assumido minhas responsabilidades no curso de Medicina Veterinária da UECE neste último ano.

À atual coordenadora do curso de pós-graduação profa. Maria Elisabete Amaral de Moraes pelo empenho em manter a excelência do curso associada à paciência e sensibilidade no trato com os alunos.

À Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP) pelo auxílio financeiro salvador.

Aos animais experimentais, por último, mas não menos importantes, que deram suas vidas para permitir que tentássemos encaixar mais uma peça nos quebra-cabeças das complicações vasculares associadas ao diabetes e senescência. Espero sinceramente não ter sido em vão.

**Deus não desiste de amar você.**

Eu não tinha este rosto de hoje,  
assim calmo, assim triste, assim magro,  
nem estes olhos tão vazios,  
nem o lábio amargo.

Eu não tinha estas mãos sem força,  
tão paradas e frias e mortas;  
eu não tinha este coração que nem se mostra.

Eu não dei por esta mudança,  
tão simples, tão certa, tão fácil:  
- Em que espelho ficou perdida  
a minha face?

Cecília Meireles

“Tenho, porém, contra ti que abandonaste o teu primeiro amor. Lembra-te, pois, de onde caíste, arrepende-te e volta à prática das primeiras obras; e, se não, venho a ti e moverei do seu lugar o teu candeeiro, caso não te arrependas”. (Apoc. 2:4-5).

“Porque há esperança para a árvore, pois, mesmo cortada, ainda se renovará, e não cessarão os seus rebentos”. (Jó 14:7)

## Lista de Abreviaturas

γT	γ-glutamil transpeptidase
IT	5-hidroxitriptamina
NI	7-nitroindazol
h	Ácido ascórbico
h	Acetilcolina
OP	Adenosina difosfato
AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3	Receptores para produtos finais de glicosilação avançada
Es	Produtos finais de glicosilação avançada
X	Ácido lipóico
X	Aloxana
IPc	Adenosina monofosfato cíclico
P	Adenosina trifosfato
4	Tetrahidrobiopiterina
Ca	Canais K <sub>Ca</sub> de alta condutância
+	Íon cálcio
P 35	Proteína ligadora de carboidrato-35
RP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
P	Íon cloro
X	Pepídeo natriurético do tipo C
G	Ciclooxigenase
CT	Diacilglicerol
I	<i>Diabetes control and complications trial research group</i>
AA	D-quirositol
LA	Disfunção endotelial
A	Ácido dihidroascórbico
A	Ácido dihidrolipóico
HF	Ácido dosoxiribonucleico
RF	Enzima conversora de angiotensina
Γs	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
Γs	Fator de relaxamento derivado do endotélio
3	Derivados do ácido epoxieicosatetraenóico
M	Ácidos epoxieicosatrienoicos
·I	Estimulação por campo elétrico
D	Erro padrão da média
DH <sub>2</sub>	Endotelina – 1
N	Flavina adenina dinucleotídeo
PDH	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
AT	Frutoselisina
UT4	Flavina mononucleotídeo
IPc	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IPc	Glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase
	Transportador transmembrana de glicose (isoforma 4)
	Guanina monofosfato cíclica
	Guanosina monofosfato cíclico

Is	Glicosilfosfatidilinositóis
H	Glutation reduzido
-NO	Nitroso-glutationa
SG	Glutationa oxidada
HE	Células do hepatoma
A <sub>1c</sub>	Hemoglobina glicosilada
L	Lipoproteína de alta densidade
MED	Instituto de Biomedicina
,	Lipoproteína de densidade intermediária
BIO	1-etil-2-benzimidazolinone
-γ	Interferon-γ
,	Canais K <sub>Ca</sub> de condutância intermediária
	Interleucina-1
	Trifosfato de inositol
	Fosfoinositolglicano
	Íon fosfato
P	Canais de K <sup>+</sup> dependentes de ATP
	Canais de K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup>
	Cloreto de Potássio
	Canais de K <sup>+</sup> retificadores de entrada
,	Lipoproteína de baixa densidade
	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
ox	Lipoamida desidrogenase
DH	Metiléster de N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
AME	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
MMA	Lipopolissacarídeo
PK	Proteína quinase ativada por mitógeno
A	Malondialdeído
,	Trióxido de dinitrogênio
	Noradrenalina
+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
IC	Não-adrenérgicos não-colinérgicos
	Azul de nitrotetrazólio
β	Fator de transcrição nuclear-κβ
DK	Instituto de pesquisa americano de <i>Diabetes</i> , doenças digestivas e renais
	Óxido nítrico
	Dióxido de nitrogênio
,	Óxido nítrico sintetase constitutiva
,	Óxido nítrico sintetase endotelial
	Óxido nítrico sintetase induzida
,	Óxido nítrico sintetase neuronal
1	Trinitrato de glicerila
	Ânion superóxido
	1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona

Is	Glicosilfosfatidilinositóis
H	Glutation reduzido
-NO	Nitroso-glutationa
SG	Glutationa oxidada
IE	Células do hepatoma
A <sub>1c</sub>	Hemoglobina glicosilada
L	Lipoproteína de alta densidade
MED	Instituto de Biomedicina
,	Lipoproteína de densidade intermediária
BIO	1-etil-2-benzimidazolinone
-γ	Interferon-γ
,	Canais K <sub>Ca</sub> de condutância intermediária
	Interleucina-1
	Trifosfato de inositol
	Fosfoinositolglicano
	Íon fosfato
P	Canais de K <sup>+</sup> dependentes de ATP
	Canais de K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup>
	Cloreto de Potássio
	Canais de K <sup>+</sup> retificadores de entrada
,	Lipoproteína de baixa densidade
	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
ox	Lipoamida desidrogenase
DH	Metiléster de N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
AME	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
MMA	Lipopolissacarídeo
PK	Proteína quinase ativada por mitógeno
A	Malondialdeído
,	Trióxido de dinitrogênio
	Noradrenalina
)+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
PH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
IC	Não-adrenérgicos não-colinérgicos
	Azul de nitrotetrazólio
β	Fator de transcrição nuclear-κβ
DK	Instituto de pesquisa americano de <i>Diabetes</i> , doenças digestivas e renais
	Óxido nítrico
	Dióxido de nitrogênio
o	Óxido nítrico sintetase constitutiva
e	Óxido nítrico sintetase endotelial
:	Óxido nítrico sintetase induzida
1	Óxido nítrico sintetase neuronal
	Trinitrato de glicerila
	Ânion superóxido
	1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona



NOO	Peroxinitrito
ST-48	Oligossacaril-transferase 48
ADETEC	Parque de desenvolvimento tecnológico
AF	Fator de agregação plaquetária
AI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio
ARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
D <sub>2</sub>	Cologaritmo da concentração suficiente para causar metade da resposta máxima
IP <sub>2</sub>	Difosfato de fosfoinositol
KC	Proteína quinase C
KG	Proteína quinase G
LA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
P	Fosfatase
b <sup>86</sup>	Rubídio marcado
.max	Resposta máxima ao agonista
HR	Ratos espontaneamente hipertensos
K <sub>Ca</sub>	Canais K <sub>Ca</sub> de baixa condutância
NP	Nitroprussiato de sódio
OD-1	Superóxido dismutase dependente de Cu <sup>2+</sup> -Zn <sup>2+</sup>
TZ	Estreptozotocina
A	Tecido Adiposo
G	Triglicerídios
GF-β1	Fator de transformação tumoral β1
NF-α	Fator de necrose tumoral-α
TX	Tetrodotoxina
XA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
DP-N-acetilglicosamina	Uridina difosfato-N-acetilglicosamina
CAM-1	Moléculas de adesão de células vasculares-1
EGF	Fator de Crescimento endotelial
IP	Peptídeo intestinal vasoativo
LDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
'KY	Wistar-Kyoto
A	Xantina
O	Xantina Oxidase



## Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

<b>1. Introdução</b>	1
1.1. Apresentação	1
1.2. Fisiologia Endotelial	6
1.2.1. Principais fatores endoteliais responsáveis pelo controle do tônus vascular	7
1.3. Diabetes e Disfunção Endotelial	31
1.3.1. Generalidades	31
1.3.2. Complicações da Diabetes: Mecanismos Bioquímicos	35
1.3.3. Teoria do incremento da via da aldose redutase (via dos polióis)	37
1.3.4. Formação aumentada de produtos de glicosilação avançada (AGEs)	39
1.3.5. Ativação da proteína quinase C	48
1.3.6. Incremento na via das hexosaminas	52
1.3.7. Teoria do estresse oxidativo intracelular	53
1.4. Disfunção Erétil no Diabetes	61
1.4.1. Ereção Peniana	61
1.4.2. Disfunção erétil secundária à diabetes	64
1.5. Disfunção Endotelial na Senescência	67
1.5.1 Generalidades	67
1.5.2. Alterações na reatividade vascular na senescência	69
1.6. Glutation - GSH	82
1.7. Ácido Lipóico	86
1.8. Rutina	96
1.9. Inositóis: Ação da insulina e resistência insulínica	102
<b>2. Objetivos</b>	108
2.1 Objetivos Gerais	108
2.2 Objetivos específicos	108

<b>3. Materiais e métodos</b>	109
3.1 Animais	109
3.2 Drogas e reagentes	110
3.3 Protocolos Experimentais	111
3.3.1 Anéis de aorta	113
3.3.2 Leito Vascular Mesentérico:	114
3.3.3 Corpo cavernoso	115
3.3.4 Perfusão de Rim de Coelho em Sistema Aberto.	116
3.4. Métodos Bioquímicos para análise dos perfis glicêmicos, lipídicos	119
3.5. Dosagem de superóxido	119
3.6. Análise dos dados e estatística	120
<b>4. Resultados</b>	121
4.1. Administração das drogas teste <i>in vivo</i> : a do potencial preventivo.	121
4.1.1. Ratos diabéticos por aloxana e ratos senescentes tratados por via oral com antioxidantes naturais (rutina, GSH e ácido lipóico)	121
4.1.2 Ratos diabéticos por aloxana tratados por via oral com componentes do mediador putativo da insulina (d-qui-ro-inositol e metil-d-qui-ro-inositol)	138
4.2. Incubação ou infusão das drogas testes <i>in vitro</i> : avaliação do potencial curativo	145
4.2.1. Efeito dos antioxidantes GSH, ácido lipóico e rutina na disfunção endotelial em anéis de aorta torácica e leito vascular mesentérico de ratos diabéticos por aloxana	145
4.2.2. Efeito dos componentes do mediador putativo da ação da insulina na disfunção endotelial em anéis de aorta torácica e leito vascular mesentérico de ratos diabéticos por aloxana	162
4.2.3. Efeito dos antioxidantes GSH, ácido lipóico e rutina na disfunção endotelial em anéis de aorta torácica e leito vascular mesentérico de ratos senescentes.	166
4.1.4. Efeito dos antioxidantes GSH, ácido lipóico e rutina na disfunção endotelial no leito vascular renal e anéis de aorta torácica de coelhos diabéticos por aloxana.	173

4.2.5. Efeito dos componentes do mediador putativo da insulina na disfunção endotelial no leito vascular renal e anéis de aorta torácica de coelhos diabéticos por aloxana.	189
4.2.6 Efeito dos antioxidantes naturais GSH, ácido lipóico e rutina na disfunção endotelial e nitrérgica de corpos cavernosos de coelhos diabéticos por aloxana.	195
4.2.7 Efeito dos componentes do mediador putativo da insulina na disfunção endotelial e nitrérgica de corpos cavernosos de coelhos diabéticos por aloxana.	209
<b>5. Discussão</b>	219
<b>6. Conclusão</b>	237
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	238

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Esquema mostrando os protocolos de tratamento oral nos experimentos de prevenção da disfunção endotelial.	118
<b>Figura 2.</b>	Variação do índice aterogênico nos grupos de ratos euglicêmicos tratados com salina ou nos ratos diabéticos por aloxana tratados com salina, ácido lipóico ou rutina..	123
<b>Figura 3.</b>	Registro fisiográfico representativo do efeito relaxante endotélio-depedente induzido pela acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos euglicêmicos ou diabéticos.	125
<b>Figura 4.</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com ácido lipóico ou rutina na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica.	126
<b>Figura 5.</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos tratados com salina, ácido lipóico ou rutina na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico..	126
<b>Figura 6.</b>	Registro fisiográfico representativo da resposta endotélio-dependente para acetilcolina em aortas obtidas de ratos diabéticos tratados com salina, ácido lipóico ou rutina.	127
<b>Figura 7.</b>	Registro fisiográfico representativo da resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico obtido de ratos euglicêmicos tratados com salina, diabéticos tratados com salina ou diabéticos tratados com rutina.	128
<b>Figura 8.</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com ácido lipóico ou rutina na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica.	129
<b>Figura 9.</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos com ácido lipóico ou rutina na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico.	129
<b>Figura 10.</b>	Variação do índice aterogênico nos grupos de ratos jovens tratados com salina ou nos ratos senescentes tratados com salina, ácido lipóico ou rutina .	132
<b>Figura 11.</b>	Efeito do tratamento de ratos senescentes com ácido lipóico ou rutina na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica.	135
<b>Figura 12</b>	Efeito do tratamento de ratos senescentes com ácido lipóico ou rutina na resposta endotélio-dependente induzida por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico perfundido.	135
<b>Figura 13.</b>	Efeito do tratamento de ratos senescentes com ácido lipóico ou rutina na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica	136
<b>Figura 14.</b>	Efeito do tratamento de ratos senescentes com ácido lipóico ou rutina durante 1 mês na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico.	136
<b>Figura 15</b>	Variação do índice nos grupos de ratos euglicêmicos tratados com salina ou nos ratos diabéticos tratados com salina, D-quirositol ou pinitol.	140

<b>Figura 16.</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com D-quirositol ou pinitol na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica.	142
<b>Figura 17</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos D-quirositol ou pinitol na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico.	142
<b>Figura 18.</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com D-quirositol ou pinitol na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica.	143
<b>Figura 19.</b>	Efeito do tratamento de ratos diabéticos com D-quirositol ou pinitol na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico.	143
<b>Figura 20.</b>	A- Efeito da incubação da rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos. B- Efeito dos antioxidantes GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos.	147
<b>Figura 21.</b>	A- Efeito da incubação da rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos diabéticos. B- Efeito dos antioxidantes GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos diabéticos.	148
<b>Figura 22</b>	Registro fisiográfico representativo da resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos incubados com salina, ácido lipóico ou rutina.	149
<b>Figura 23.</b>	Efeito da incubação de rutina no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos com endotélio ou em anéis que tiveram o endotélio removido mecanicamente.	153
<b>Figura 24.</b>	Efeito da incubação de rutina no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta obtidos de ratos diabéticos e pré-contraídos com solução despolarizante ( $K^+$ 60mM).	153
<b>Figura 25.</b>	Efeito dos bloqueadores da NOS e da guanilato ciclase solúvel no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta pré-tratado ou não com rutina.	154
<b>Figura 26.</b>	Efeito da mistura caribdotoxina-apamina no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta pré-tratado ou não com rutina (1 $\mu$ M).	154

<b>Figura 27.</b>	A- Efeito da infusão de rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico. B- Efeito dos antioxidantes GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico.	155
<b>Figura 28.</b>	A- Efeito da infusão de rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico. B- Efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico.	159
<b>Figura 29.</b>	Efeito da incubação de rutina no relaxamento vascular induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico com endotélio removido quimicamente.	160
<b>Figura 30.</b>	Efeito da incubação de rutina no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico obtido de ratos diabéticos e pré-contraídos com solução despolarizante ( $K^+$ 60mM).	160
<b>Figura 31.</b>	Efeito dos bloqueadores da NOS e da guanilato ciclase solúvel no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico pré-tratado ou não com rutina (1 $\mu$ M).	161
<b>Figura 32.</b>	A- Efeito da incubação dos inositóis D-qui-ro-inositol (DCI) ou metil-D-qui-ro-inositol (me-DCI) no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos diabéticos. B- Efeito da infusão de DCI e me-DCI na resposta endotélio-dependente no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos.	163
<b>Figura 33.</b>	A- Efeito da incubação dos inositóis D-qui-ro-inositol (DCI) ou metil-D-qui-ro-inositol (me-DCI) no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica de ratos diabéticos. B- Efeito da infusão de DCI e me-DCI na resposta endotélio-independente no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos.	164
<b>Figura 34.</b>	A- Efeito da incubação de rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos senescentes B- Efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos senescentes	167
<b>Figura 35.</b>	A- Efeito da incubação de rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por SNP em anéis de aorta de ratos senescentes B- Efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por SNP em anéis de aorta de ratos senescentes	168
<b>Figura 36.</b>	A- Efeito da infusão de rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar de ratos senescentes	

	B- Efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar de ratos senescentes	169
<b>Figura 37.</b>	A- Efeito da infusão rutina ou catequina no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio no leito arteriolar de ratos senescentes B- Efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio no leito arteriolar de ratos senescentes	170
<b>Figura 38.</b>	Efeito de antioxidantes (GSH, ácido lipóico e rutina) na vasodilatação endotélio-dependente induzida por bradicinina no leito vascular renal de coelhos.	176
<b>Figura 39.</b>	Vasodilatação endotélio-dependente induzida por acetilcolina (A) ou endotélio-independente induzida por nitroprussiato de sódio (B) no leito vascular renal de coelhos na ausência e presença de GSH, ácido lipóico ou rutina.	177
<b>Figura 40.</b>	Efeito da rutina na vasodilatação endotélio-dependente induzida por acetilcolina no leito vascular renal de coelhos contraído com $K^+$ 60 mM	180
<b>Figura 41.</b>	Efeito dos bloqueadores da NOS e da guanilato ciclase sóluvel no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar renal pré-tratado ou não com rutina .	181
<b>Figura 42.</b>	Efeito de antioxidantes (GSH, ácido lipóico e rutina) no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina ou no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de coelhos.	183
<b>Figura 43.</b>	Efeito da rutina na vasodilatação endotélio-dependente induzida por acetilcolina em anéis de aorta torácica de coelhos contraídas com $K^+$ 60 mM.	186
<b>Figura 44.</b>	Efeito dos bloqueadores da NOS, da guanilil ciclase sóluvel e de canais de potássio cálcio-sensíveis no relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta pré-tratadas com rutina.	187
<b>Figura 45.</b>	A- Efeito da incubação de D-quirositol ou pinitol na vasodilatação induzida por acetilcolina B- Resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica obtidas de coelhos diabéticos .	191
<b>Figura 46.</b>	Efeito da infusão de D-quirositol ou pinitol na vasodilatação induzida por acetilcolina (ACh; A) ou por nitroprussiato de sódio (SNP; B) no leito vascular renal de coelhos diabéticos.	193
<b>Figura 47.</b>	A- Efeito do L-NAME, ODQ, 7-NI e TTX no relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (EFS) no corpo cavernoso de coelhos euglicêmicos B- Efeito do L-NAME e ODQ na resposta endotélio-dependente induzida por acetilcolina e nas respostas endotélio-independentes induzida por nitrato de sódio e nitroprussiato de sódio, além do efeito da atropina na resposta da acetilcolina	198
<b>Figura 48.</b>	Registros fisiográficos representativos do efeito do L-NAME e ODQ no relaxamento induzido por acetilcolina, nitrato de sódio e estímulo elétrico transmural no corpo cavernoso de coelhos euglicêmicos.	199





<b>Figura 59.</b>	Incremento no tônus da aorta de ratos jovens ou senescentes induzido por L-NAME quando aplicado no platô da resposta contrátil à fenilefrina.	214
<b>Figura 60.</b>	Efeito do D-quirositol (DCI), em <b>A</b> , ou pinitol (me-DCI), em <b>B</b> na resposta relaxante induzida por nitrato de sódio (pH 2,0 NO) em anéis de aorta torácica de ratos idosos normotensos	215
<b>Figura 61.</b>	Efeito do D-chiro-inositol ( <b>A</b> ) ou metil-D-quirositol ( <b>B</b> ) na resposta relaxante induzida por óxido nítrico.	216
<b>Figura 62.</b>	A- Efeito da superóxido dismutase (SOD) na taxa de redução do NBT por ânion superóxidos. B- Efeito dos inositóis D-quirositol (DCI) e pinitol (Me-DCI) na taxa de redução do NBT por ânion superóxidos.	218

### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Estimativas da função/disfunção endotelial	4
<b>Tabela 2.</b>	Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídes), pressão arterial média, peso corporal e glicemia de ratos euglicêmicos ou diabéticos por aloxana antes e após 4 semanas de tratamento com rutina, salina ou ácido lipóico.	122
<b>Tabela 3.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.	130
<b>Tabela 4.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos por aloxana tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.	130
<b>Tabela 5.</b>	Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídes), pressão arterial média, peso corporal e glicemia de ratos jovens ou senescentes antes e após 4 semanas de tratamento com rutina, salina ou ácido lipóico	131
<b>Tabela 6.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos senescentes tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.	137
<b>Tabela 7.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) no leito arteriolar mesentérico de ratos senescentes tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.	137
<b>Tabela 8.</b>	Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídes), pressão arterial média, peso corporal e glicemia ratos euglicêmicos ou diabéticos antes e após 4-semanas de tratamento com salina , D-qui-ro-inositol ou pinitol.	139
<b>Tabela 9.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana tratados com D-qui-ro-inositol (20 mg/Kg/12h) ou pinitol (20mg/Kg/12h) durante um mês.	144

<b>Tabela 10.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos por aloxana tratados com D-quirositol (20 mg/Kg/12h) ou pinitol (20mg/Kg/12h) durante um mês.	144
<b>Tabela 11.</b>	Perfil glicêmico e peso corporal, após 4 semanas da indução, dos ratos diabéticos por aloxana utilizados para os testes <i>in vitro</i> .	145
<b>Tabela 12.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana e incubadas <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico.	150
<b>Tabela 13.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) leito vascular mesentérico obtidas de ratos diabéticos por aloxana infundidos <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico na taxa de 0,1 mL/min).	151
<b>Tabela 14.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina; ACh) em anéis de aorta obtidos de ratos diabéticos por aloxana incubados <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de rutina na ausência e presença de diversos bloqueadores farmacológicos ou manipulações fisiológicas.	156
<b>Tabela 15.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina; ACh) no leito arteriolar mesentérico obtido de ratos diabéticos por aloxana incubados <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de rutina na ausência e presença de diversos bloqueadores farmacológicos ou manipulações fisiológicas.	158
<b>Tabela 16.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana incubados <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de D-quirositol (DCI) ou metil-D-quirositol (me-DCI).	165



<b>Tabela 17.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) no leito vascular mesentérico obtidas de ratos diabéticos por aloxana infundidos <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de D-quirositol (DCI) ou metil-D-quirositol (me-DCI) na taxa de 0,1 mL/min).	165
<b>Tabela 18.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos senescentes e incubadas <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico.	171
<b>Tabela 19</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) leito vascular mesentérico obtidas de ratos senescentes e infundidos <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico na taxa de 0,1 mL/min).	172
<b>Tabela 20.</b>	Perfil glicêmico e peso corporal de coelhos diabéticos por aloxana após 4 semanas da indução.	175
<b>Tabela 21.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependentes (acetilcolina;ACh e bradicinina-BK) ou ao agonista endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) na pressão de perfusão de rins obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença de antioxidantes (glutathiona reduzida=GSH, ácido lipóico e rutina, concentração de 1 $\mu$ M) comparado com a resposta obtida em animais euglicêmicos.	178
<b>Tabela 22.</b>	Peso corporal e glicemia de coelhos após 4 semanas da indução de diabetes por aloxana ou injeção de veículo e parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) na pressão de perfusão de rins, mantida por perfusão contínua com solução despolarizante (K <sup>+</sup> 60 mM), obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença de rutina, na concentração de 1 $\mu$ M, comparado com a resposta obtida em animais euglicêmicos.	180
<b>Tabela 23.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente (ACh) na pressão de perfusão de rins obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença da rutina (1 $\mu$ M), ou rutina (1 $\mu$ M) em conjunto com L-NAME (100 $\mu$ M) ou ODQ (100 $\mu$ M), comparados com a resposta obtida em animais euglicêmicos.	181

<b>Tabela 24.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) na ausência e presença de antioxidantes (glutathiona reduzida=GSH, ácido lipóico e rutina, concentração de 1 $\mu$ M) em anéis de aorta torácica obtidas de coelhos diabéticos por aloxana	184
<b>Tabela 25.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) em anéis de aorta torácica, pré-contraídas com solução despolarizante (K <sup>+</sup> 60 mM), obtidas de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença de rutina, na concentração de 1 $\mu$ M, comparado com a resposta obtida em animais euglicêmicos.	186
<b>Tabela 26.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta a acetilcolina em anéis de aorta de coelhos diabéticos na ausência e presença da rutina (1 $\mu$ M), ou rutina (1 $\mu$ M) com L-NAME (100 $\mu$ M), ou ODQ (100 $\mu$ M), ou da mistura caribdoóxina (0,1 $\mu$ M) e apamina (1 $\mu$ M).	188
<b>Tabela 27.</b>	Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de coelhos diabéticos por aloxana incubados <i>in vitro</i> com 1 $\mu$ M de D-quirositol (DCI) ou metil-D-quirositol (me-DCI)	190
<b>Tabela 28.</b>	Peso, glicemia de coelhos após 4 semanas da indução de diabetes por aloxana ou injeção de veículo e parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) na pressão de perfusão de rins obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença da D-quirositol (DCI; 1 $\mu$ M) ou pinitol (me-DCI;1 $\mu$ M)	192
<b>Tabela 29.</b>	Perfil glicêmico e peso corporal de coelhos diabéticos por aloxana após 4 semanas da indução.	197
<b>Tabela 30</b>	Perfil glicêmico e peso corporal de coelhos diabéticos por aloxana após 4 semanas da indução.	209

## Resumo

**Disfunção endotelial e nitrérgica: Prevenção e/ou reversão por antioxidantes naturais e componentes do mediador putativo da insulina – Nilberto Robson Falcão do Nascimento – Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia do Deptº de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para a obtenção do título de doutor em Farmacologia. Data da defesa: 10 de maio de 2004. Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.**

O endotélio é um órgão endócrino que regula diversas funções importantes para a homeostase vascular, como tônus, trombogênese, aterogênese, angiogênese, migração celular na inflamação, etc. Esse órgão, como qualquer outro, está sujeito a disfunção e até mesmo falência. Entre os principais fatores de risco que causam disfunção endotelial (DE) estão o diabetes (Db) e a senescência. Neste estudo avaliamos a função endotelial através da medida da resposta relaxante endotélio-dependente em vasos de ratos diabéticos e senescentes e de coelhos diabéticos. A administração oral duas vezes ao dia durante 1 mês de antioxidantes naturais (rutina e ácido lipóico-AL) em ratos diabéticos ou senescente foi capaz de prevenir a DE nestes animais. A taxa de DE na aorta ratos diabéticos tratados apenas com veículo foi de  $51,9 \pm 4,6\%$  enquanto que nos tratados com rutina foi de  $14,1 \pm 2,4\%$  ( $p < 0,05$ ) e  $44,7 \pm 3,7\%$  nos tratados com AL. No leito arteriolar mesentérico (LAM) dos ratos diabéticos a DE foi de  $44,6 \pm 5,8\%$  comparado com  $21,4 \pm 2,8\%$  nos tratados com rutina e  $24,8 \pm 3,7\%$  no grupo tratado com AL. O mesmo padrão de resposta foi observado no leito vascular renal (LVR) corpos cavernosos de coelhos (RbCC) diabéticos. Nestes tecidos a incubação por 1 hora com  $1 \mu\text{M}$  de rutina ou AL foi capaz de reverter a DE. No LVR a resposta relaxante máxima à acetilcolina (ACh) foi de  $16,0 \pm 2,0\%$  comparada com  $42,0 \pm 3,4\%$  obtidas nos LVR tratados com rutina e  $31,0 \pm 3,9\%$  nos tratados com AL. Nos RbCC a resposta nitrérgica, induzida por campo elétrico (20 V; 0,5 ms e 16 Hz), foi de  $89,6 \pm 6,0\%$  nos controles euglicêmicos comparado com apenas  $37,0 \pm 4,0\%$  ( $p < 0,05$ ) nos RbCC diabéticos. O tratamento prévio com rutina aumentou este relaxamento para  $63,8 \pm 4,8\%$  ( $p < 0,05$  Db+veículo vs. Db+ rutina). Da mesma maneira o relaxamento dos RbCC à ACh que estava bloqueada nos diabéticos (euglicêmicos =  $87,0 \pm 8,0\%$  vs. Db =  $27,8 \pm 3,8\%$ ) foi restaurada nos tecidos tratados com rutina para  $74,0 \pm 7,0\%$ . Por outro lado, os outros agentes antioxidantes utilizados, i.e., catequina e glutathione reduzida (GSH) reverteram a DE, mas apenas parcialmente. De maneira semelhante, nos tecidos obtidos de ratos senescentes a rutina e AL reverteram a DE de maneira significativa. A DE da aorta de ratos senescentes foi de  $55,0 \pm 5,2\%$  comparado com  $13,5 \pm 1,3\%$  ( $p < 0,05$ ) nos tratados com rutina e  $29,3 \pm 3,4\%$  ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com AL. No LAM o mesmo padrão de resposta foi observado com DE de  $53,4 \pm 4,2\%$  nos senescentes não tratados comparado com  $6,1 \pm 1,3\%$  no grupo tratado com rutina e  $27,9 \pm 3,7\%$  nos tratados com AL. Os inositóis preveniram e reverteram a DE de ratos e coelhos diabéticos de maneira parcial, além de terem atividade *scavenger* de superóxido *in vitro*. Além do mais, estes compostos potenciam a resposta relaxante ao óxido nítrico exógeno em anéis de aorta de ratos senescentes. Estes agentes isoladamente ou em conjunto podem se constituir num tratamento preventivo ou curativo da disfunção endotelial associada à diabetes ou senescência.



## Abstract

**Endothelial and Nitrergic dysfunction: Prevention and/or reversion by natural antioxidants and putative insulin mediators. Nilberto Robson Falcão do Nascimento.** Thesis submitted as a partial fulfillment of the requirement to the title of doctor in Pharmacology to the Graduation Pharmacology Course of Physiology and Pharmacology Department of the Medicine Faculty, Federal University of Ceará. Defense date: 2004, may 10. Advisor: Manassés Claudino Fonteles, MD, PhD.

The endothelium is a very active endocrine organ regulating many important vascular functions related to haemodynamics and blood pressure control. For instance it actively regulates the vessel tonus, the thrombotic status of blood, atherogenesis and angiogenesis, only to mention a few. This organ as anyone is subject to dysfunction and even failure. Among the major risk factors for endothelial dysfunction (ED) are diabetes and senescence. The endothelial-dependent relaxant response to acetylcholine (ACh) compared to the endothelial-independent relaxation induced by a nitrovasodilatador was used as a method to measure endothelial function in resistance (mesenteric, cavernous and renal) and conductance (aorta) vessels. We find that both diabetes and senescence strongly blunts the endothelial-dependent response in either resistance or conductance vessels. The administration of rutin (50 mg/kg/12h; p.o) or lipoic acid (LA; 20 mg/Kg/12h; p.o) to both diabetic (Db) and senescent rats was shown to be effective in the prevention of ED in aorta and arteriolar mesenteric bed (AMB). The calculated ED for aorta was  $51.9 \pm 4.6\%$  compared with  $14.1 \pm 2.4\%$  ( $p < 0.05$ ) in the rutin-treated group and  $44.7 \pm 3.7\%$  in the LA-treated group. The calculated ED for diabetic AMB was  $44.6 \pm 5.8\%$  compared with  $21.4 \pm 2.8\%$  ( $p < 0.05$ ) in the rutin group and  $24.8 \pm 3.7\%$  ( $p < 0.05$ ) in the AL group. The same pattern was observed in the renal vascular bed (RVB) and rabbit corpus cavernosus (RbCC). In this tissue 1-hour incubation with  $1 \mu\text{M}$  de rutin or AL reversed ED. In RVB the maximal relaxant response to ACh was  $16.0 \pm 2.0\%$  compared with  $42.0 \pm 3.4\%$  ( $p < 0.05$ ) obtained in rutin-treated tissues and  $31.0 \pm 3.9\%$  ( $p < 0.05$ ) in AL. The maximal nitrergic response of RbCC to electrical field stimulation (20 V; 0,5 ms e 16 Hz) was  $89.6 \pm 6.0\%$  in control euglycemic animals compared to  $37.0 \pm 4.0\%$  ( $p < 0.05$ ) in diabetic RbCC. Previous incubation with rutin restored this relaxation to  $63.8 \pm 4.8\%$  ( $p < 0.05$  Db+vehicle vs. Db+rutin). The endothelial-dependent relaxation to ACh in RbCC was also blunted in diabetic tissues (euglycemic=  $87.0 \pm 8.0\%$  vs. Db= $27.8 \pm 3.8\%$ ) and was also restored towards normal ( $74,0 \pm 7,0\%$ ) levels in rutin-treated tissues. In addition, the other antioxidant agents used, i.e., catechin and glutathione (GSH) also partially reversed ED in diabetic and senescent vascular tissues. Similarly, in senescent vascular tissues rutin and AL significantly reversed ED. The calculated ED for aorta was  $55.0 \pm 5.2\%$  compared with  $13.5 \pm 1.3\%$  ( $p < 0.05$ ) in the rutin-treated group and  $29.3 \pm 3.4\%$  ( $p < 0.05$ ) in AL-treated tissues. The same profile was shown in the AMB with  $53.4 \pm 4.2\%$  ED compared with  $6.1 \pm 1.3\%$  in rutin-treated tissues and  $27.9 \pm 3.7\%$  in the AL-treated group. The administration of the putative insulin-mediators (20 mg/Kg/12h, v.o) partially prevented or reversed ED in diabetic tissues of rats and rabbits. They were also shown to have superoxide scavenger activity *in vitro* and potentiate the relaxant response of senescent aortas to exogenous nitric oxide administration. These compounds may have a beneficial outcome as adjuvants in preventive or curative protocols for endothelial dysfunction associated with diabetes or senescence.



## 1. Introdução

### 1.1. Apresentação

A descoberta anatômica de uma camada celular sobreposta a parede vascular por Von Recklinghausen no início do século XIX permaneceu apenas como uma descrição mais detalhada da descoberta de uma separação física entre vasos e sangue por Malpighi no século XVII uma vez que nenhuma função substancial foi atribuída a este tecido. Esta visão estática foi mudada apenas mais de cem anos depois, no final da década de 70, quando Furchgott e Zawadzki descreveram a vasoreatividade dependente da integridade endotelial. Graças a esse trabalho pioneiro de Furchgott e Zawadzki (1980), o endotélio é hoje reconhecido como um importante regulador da homeostase vascular. As células endoteliais, como uma camada de revestimento dos vasos sanguíneos, estão estrategicamente localizadas entre o sangue circulante e o músculo liso vascular. Em uma pessoa com um peso corporal de 70 Kg, o endotélio cobre uma área aproximada de 5000 m<sup>2</sup> e pesa cerca de 1-1,5 Kg (Herrmann e Lerman, 2001). O endotélio vascular apresenta uma variedade de fenótipos entre os diversos leitos vasculares e apesar de sua estrutura de monocamada celular, o endotélio realiza várias funções diferentes relacionadas à manutenção da parede vascular, do sangue circulante e do balanço hemodinâmico do corpo como um todo. Uma propriedade central nesta multifuncionalidade do endotélio é o metabolismo e secreção de uma série de fatores envolvidos na coagulação, ativação e agregação plaquetária, permeabilidade e inflamação vascular, e proliferação e migração das células do músculo liso vascular. De maneira mais notável, o impacto do endotélio no tônus vascular tem sido mais bem estudado nos últimos anos com a descoberta de fatores vasorelaxantes e vasoconstritores de origem endotelial. Portanto, a integridade funcional do endotélio é crucial para a manutenção do fluxo sanguíneo e capacidade antitrombótica, uma vez que o endotélio produz e secreta uma série de fatores que afetam os mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso vascular, trombogênese, fibrinólise, mitogênese, e ativação e inibição da atividade plaquetária. Desta maneira, o endotélio contribui para o controle da pressão arterial, fluxo de perfusão tecidual e angiogênese. Assim como qualquer outro órgão, o endotélio vascular está sujeito a desregulação, disfunção, insuficiência e falência. Desta maneira, tornou-se patente que uma função endotelial débil contribui substancialmente para diversas desordens cardiovasculares

como a aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca, que levam a hipoperfusão, oclusão vascular e lesão no órgão afetado, como por exemplo infarto, acidente vascular cerebral e insuficiência renal (Behrendt e Ganz, 2002). Deste modo, um paradigma funcional, denominado integridade endotelial, baseado no balanço entre fatores contráteis e relaxantes derivados do endotélio foi definido. O desbalanço nestes fatores favorecendo vasoconstrição à vasodilatação e portanto, resistência à condutância foi denominado disfunção endotelial. No entanto, o leitor deve manter em mente que a disfunção endotelial, no campo básico, é mais do que um mero desbalanço entre fatores vasoreativos e deve além disso lembrar que este fenômeno, no campo aplicado, é mais do que um simples marcador precoce de aterosclerose. Os fatores vasoativos liberados pelo endotélio também regulam outras funções como coagulação, mitogênese e aterogênese, por exemplo. Apesar disso, a alteração da vasoreatividade endotelial tornou-se nas últimas duas décadas a medida mais utilizada para verificar a função/disfunção endotelial tanto no campo de pesquisa básico como no campo clínico em humanos e animais.

Em adição a uma grande redução no potencial vasorelaxante, a monocamada endotelial no leito vascular afetado é caracterizada por aumento na produção de moléculas de adesão, como por exemplo a molécula de adesão vascular 1, molécula de adesão intercelular 1 e E-selectina/P-selectina, aumento na produção de moléculas pró-coagulantes como a fator de von Willebrand e o fator de ativação tecidual de plasminogênio. Portanto, a disfunção endotelial pode ser entendida mais completamente como a conversão do endotélio de uma camada que contribuía para um tônus vasorelaxante, antiagregante, anti-aderente e antitrombótico para uma monocamada vasoconstritora, pró-agregante, pró-aderente e pró-trombótica. Mas como medir a disfunção endotelial ???

Normalmente, o endotélio diminui ativamente o tônus vascular, processo no qual o óxido nítrico tem um papel primordial (Vane, Anggard e Botting, 1990). O endotélio, também regula a permeabilidade vascular a nutrientes, hormônios e outras macromoléculas (Renkin, 1992) e leucócitos (Pober e Cotran, 1990). Ademais, as células endoteliais normalmente inibem a adesão e agregação plaquetária produzindo prostaciclina, óxido nítrico e ectonucleotidases, limitam a ativação da cascata de coagulação através da proteína tromboomodulina-C e pelas interações entre sulfato de

heparano e antitrombina III e regula a fibrinólise pela produção de fator tecidual de ativação de plasminogênio e seu inibidor, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) (van Hinsbergh *et al.*, 1994). O endotélio pode se adaptar a requerimentos temporais e locais. São exemplos deste fenômeno a liberação de produtos como óxido nítrico e do fator tecidual de ativação de plasminogênio após estimulação específica, a indução gênica (e.g., E-selectina) após exposição a mediadores pró-inflamatórios (Stehouwer *et al.*, 1997).

A disfunção do endotélio pode ser considerada presente quando suas propriedades, tanto no estado basal quanto quando estimulado, tenham mudado de tal maneira que se tornaram ineficientes para a preservação da função orgânica. Por exemplo, a síntese da membrana basal pode estar alterada, resultado em mudanças na interação célula-matrix. A permeabilidade vascular pode aumentar assim como o tônus vascular. Finalmente, o endotélio pode perder suas propriedades antitrombóticas e pró-fibrinolíticas e pode ao invés disto adquirir propriedades pró-trombóticas e anti-fibrinolíticas. Tais alterações não necessariamente acontecem simultaneamente. Além do mais, elas podem diferir de acordo com a natureza da injúria e das propriedades intrínsecas do endotélio (e.g., arterial *versus* venoso *versus* microvascular). Portanto, a disfunção endotelial não é uma entidade discreta e nem um padrão ouro para sua medida existe. A avaliação da função endotelial pode ser estimada indiretamente medindo-se a vasodilatação endotélio-dependente e os níveis plasmáticos de proteínas regulatórias derivadas do endotélio (Stehouwer e Donker, 1993; Vane, Anggard e Botting, 1990; Hamsten, 1995; Jansson, Nilsson e Johnson, 1991; Ridker *et al.*, 1993; Omland *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1995; Blann e Taberner, 1995). Estes procedimentos são sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Estimativas da função/disfunção endotelial

Parâmetro	Interpretação: Função endotelial alterada
Aumento da taxa de escape transcápilar de albumina radiomarcada injetada intravenosamente	Aumento da permeabilidade a macromoléculas
Vasodilatação endotélio-dependente diminuída	Diminuição na produção de vasodilatadores como óxido nítrico
Endotelina <sup>1</sup>	Síntese aumentada de vasoconstritores
Fator de Von Willebrand <sup>1</sup>	Aumento na atividade pró-trombótica e pró-coagulante
Trombomodulina	Diminuição na atividade anticoagulante
Fator tecidual de ativação do plasminogênio, PAI-1	Diminuição na atividade profibrinolítica
E-selectina, VCAM-1 Fibronectina celular, fragmentos de colágeno do tipo IV	Aumento na permeabilidade a leucócitos, ativação inflamatória Síntese da matrix extracelular alterada

<sup>1</sup>= níveis séricos ou plasmáticos aumentados; s= sóluvel; VCAM= molecular de adesão de células vasculares ; PAI-1= inibidor do ativador de plasminogênio-1.

O uso destas estimativas da disfunção endotelial é sustentada por muitos estudos demonstrando altos níveis circulantes de proteínas regulatórias derivadas do endotélio e vasodilatação endotélio-dependente diminuída em pacientes com doenças que envolvem injúria ao endotélio, como aterosclerose, pre-eclâmpsia e vasculite (Stehouwer e Donker, 1989; Vane, Anggard e Botting, 1990). Além do mais estudos prospectivos tem demonstrado que, em várias circunstâncias, pacientes com altos níveis plasmáticos de fator tecidual de ativação de plasminogênio, PAI-1, fator de Von Willebrand e endotelina tem prognóstico cardiovascular adverso (Hamsten, 1995; Jansson, Nilsson e Johnson, 1991; Ridker *et al.*, 1993; Omland *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1995; Blann e Taberner, 1995). Por outro lado, deve ser enfatizado que uma série de premissas não provadas são inerentes à interpretação destas propostas estimativas de disfunção endotelial. Primeiro, função alterada não necessariamente equivale a disfunção. Segundo, altos níveis plasmáticos de produtos derivados endotélio pode refletir síntese aumentada, “clearance” diminuído ou em alguns casos aumento do “turnover” da matrix extracelular. Terceiro, é provável que a taxa de escape transcápilar de albumina seja determinada não apenas pelo endotélio, mas também por propriedades bioquímicas e

matrix extracelular e por forças hemodinâmicas . Quarto, outros tipos  
1 contribuir para os altos níveis plasmáticos de alguns produtos que  
vam do endotélio. Por exemplo, PAI-1 pode ser produzida não apenas  
oteliais, mas também por hepatócitos, adipócitos e células do músculo  
himomura *et al.*, 1996). Quinto, uma vez que a área de superfície e  
ética do endotélio da microvasculatura é muito maior que a do endotélio  
os, muitas destas estimativas de disfunção endotelial presumivelmente  
ões ao nível de arteríolas de resistência, capilares e vênulas, enquanto  
clínicos como infarto do miocárdio são causados por trombose de  
e condutância. Finalmente, não está claro ainda se o valor prognóstico  
níveis plasmáticos de proteínas regulatórias derivadas do endotélio está  
s funções específicas (e.g., aumento da adesão plaquetária e aumento da  
do fator III da cascata da coagulação, no caso do fator de Von  
4eyer e Girma, 1993) ou ao fato de que níveis elevados de qualquer  
ória derivada do endotélio acontecem em paralelo com distúrbios em  
endoteliais, ou seja funcionam como marcadores. Em conclusão,  
áveis, mas não perfeitas, do grau de função/disfunção endotelial  
dida com mais extensa utilização tem sido a medida dos níveis  
fator de Von Willebrand e avaliação da vasodilatação endotélio-  
1 alguns casos, como na diabetes insulino-independente tem se  
e a diminuição da vasodilatação endotélio-dependente é um marcador  
e disfunção endotelial do que os níveis plasmáticos do fator de Von  
ver, Collier e Vallance, 1992; Johnstone *et al.*, 1993).

se disfunção endotelial é definida como a capacidade diminuída ou  
ada com animais controle de mesma idade e sexo, de responder a  
atador que dependa da integridade funcional do endotélio associada à  
utadora normal em resposta a agentes musculotrópicos, como os nitratos  
emplo. Este trabalho de doutorado representa um esforço na tentativa  
vel de antioxidantes naturais na prevenção e tratamento da disfunção  
odelos de disfunção associadas à senescência e da disfunção endotelial e  
abetes. Assim como o papel de mediadores putativos da via de  
ial da insulina na disfunção endotelial e nitrérgica associada ao *diabetes*

biofísicas da matrix extracelular e por forças hemodinâmicas . Quarto, outros tipos celulares podem contribuir para os altos níveis plasmáticos de alguns produtos que também se derivam do endotélio. Por exemplo, PAI-1 pode ser produzida não apenas por células endoteliais, mas também por hepatócitos, adipócitos e células do músculo liso vascular (Shimomura *et al.*, 1996). Quinto, uma vez que a área de superfície e capacidade sintética do endotélio da microvasculatura é muito maior que a do endotélio dos grandes vasos, muitas destas estimativas de disfunção endotelial presumivelmente refletem alterações ao nível de arteríolas de resistência, capilares e vênulas, enquanto que os eventos clínicos como infarto do miocárdio são causados por trombose de grandes vasos de condutância. Finalmente, não está claro ainda se o valor prognóstico do aumento nos níveis plasmáticos de proteínas regulatórias derivadas do endotélio está associado às suas funções específicas (e.g., aumento da adesão plaquetária e aumento da disponibilidade do fator III da cascata da coagulação, no caso do fator de Von Willebrand) ( Meyer e Girma, 1993) ou ao fato de que níveis elevados de qualquer proteína regulatória derivada do endotélio acontecem em paralelo com distúrbios em outras funções endoteliais, ou seja funcionam como marcadores. Em conclusão, estimativas razoáveis, mas não perfeitas, do grau de função/disfunção endotelial existem. A medida com mais extensa utilização tem sido a medida dos níveis plasmáticos do fator de Von Willebrand e avaliação da vasodilatação endotélio-dependente. Em alguns casos, como na diabetes insulino-independente tem se demonstrado que a diminuição da vasodilatação endotélio-dependente é um marcador mais sensível de disfunção endotelial do que os níveis plasmáticos do fator de Von Willebrand (Calver, Collier e Vallance, 1992; Johnstone *et al.*, 1993).

Nesta tese disfunção endotelial é definida como a capacidade diminuída ou ausente, comparada com animais controle de mesma idade e sexo, de responder a estímulo vasodilatador que dependa da integridade funcional do endotélio associada à resposta vasodilatadora normal em resposta a agentes musculotrópicos, como os nitratos orgânicos por exemplo. Este trabalho de doutorado representa um esforço na tentativa de avaliar o papel de antioxidantes naturais na prevenção e tratamento da disfunção endotelial em modelos de disfunção associadas à senescência e da disfunção endotelial e nitrérgica no diabetes. Assim como o papel de mediadores putativos da via de transdução de sinal da insulina na disfunção endotelial e nitrérgica associada ao *diabetes*

*mellitus*. Esperamos deste modo contribuir para o entendimento desta síndrome e apresentar novas opções de abordagem terapêutica para a mesma.

## 1.2. Fisiologia Endotelial

O endotélio vascular, como frisado anteriormente, funciona não apenas como uma barreira mecânica passiva entre o sangue circulante e a parede vascular como também utiliza esta localização estratégica para regular a homeostasia vascular. Um novo conceito, portanto, considerando o endotélio vascular como um órgão endócrino substituiu o conceito antigo que considerava o endotélio um componente inerte do vaso. O endotélio arterial, por exemplo, responde às forças de cisalhamento através de uma via que leva à fosforilação da enzima óxido nítrico sintase (NOS<sub>e</sub>), a qual produz óxido nítrico constitutivamente e leva à vasodilatação (Dimmeler *et al.*, 1999; Scotland *et al.*, 2002). Esta resposta permite que artérias de condutância se acomodem a aumentos de fluxo (Brouet *et al.*, 2001) e que vasos de resistência mantenham um tônus vasorelaxante (Palmer *et al.*, 1988). O estresse de cisalhamento é o principal estímulo fisiológico da atividade da NOS<sub>e</sub>, causando rápida liberação da membrana e ativação da mesma por fosforilação em resíduos de serina por ação da Akt quinase (Fulton *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999; Scotland *et al.*, 2002) e provocando regulação crescente (“up regulation”) da expressão gênica de NOS<sub>e</sub> pela ativação traducional do promotor da enzima. Em condições basais a NOS<sub>e</sub> está inativa e permanece particulada na membrana por ligação a lípidios, por miristoilação e palmitoilação, e através de uma interação inibitória com a caveolina-1, a principal proteína regulatória das cavéolas. A ligação de agonistas a receptores específicos (e.g., bradicinina, acetilcolina, substância P) leva à rápida ativação da enzima por despalmtoilação, ligação do complexo cálcio-calmodulina, desligamento da caveolina e liberação da enzima da membrana plasmática (Michel *et al.*, 1997; Prabhakar *et al.*, 1998).

Ademais, o endotélio limita a trombose local por produzir o ativador tecidual de plasminogênio, mantendo uma superfície carregada negativamente e secretando heparanas e trombomodulina (Behrendt e Ganz, 2002; Gonzalez e Selwyn, 2003).

O endotélio tem uma participação importante na modulação da homeostasia vascular e na regulação de várias funções fisiológicas, como inflamação, agregação plaquetária, fibrinólise, angiogênese e mecanorecepção (Jaffe, 1985; Vane *et al.*, 1990;



Ramos, 1992; Wu e Thiagarahan, 1996). O endotélio também contribui para o metabolismo de compostos oriundos do sangue, como a angiotensina e bradicinina, que são metabolizados pela enzima conversora de angiotensina endotelial e na superfície das células endoteliais, ecto-ATPases metabolizam nucleotídeos de adenina (Simionescu e Simionescu, 1986; Vane *et al.*, 1990; Ramos, 1992; Jaffe, 1995;).

O endotélio sintetiza uma grande variedade de substâncias parácrinas, como o fator vasoconstritor endotelina, os dois mediadores antiadesivos, antiagregantes e vasodilatadores prostaciclina e óxido nítrico, o fator de ativação plaquetária (PAF), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), ativador de plasminogênio tecidual, interleucinas, fator de von Willebrand e vários fatores de crescimento (Hanahan, 1986; Vanhoutte *et al.*, 1986; Vane *et al.*, 1990; Rubanyi, 1991; Lüscher e Dubey, 1995).

### **1.2.1. Principais Fatores Endoteliais Responsáveis pelo Controle do Tônus Vascular**

#### **Óxido Nítrico.**

O óxido nítrico (NO) tem sido implicado numa grande diversidade de funções fisiológicas incluindo relaxamento de músculo liso, neurotransmissão, resposta imune e inibição da ativação plaquetária (Schmidt e Walter, 1994; Murad, 1996). O óxido nítrico é um gás que pode atingir até 1,9mM de concentração em uma solução aquosa (Shaw e Vosper, 1977; Kerwin *et al.*, 1995) e que é um radical livre, com um elétron livre, que pode sofrer várias reações, agindo tanto como um fraco oxidante ou um agente redutor (Kanner *et al.*, 1991). Difunde-se livremente através das membranas biológicas (Welch e Loscalzo, 1994) podendo agir relativamente distante do seu local de produção. A concentração, e a fonte de NO, são os principais fatores determinantes de seus efeitos biológicos (Wink e Mitchell, 1998). Três formas redox ativas e interrelacionadas de NO tem sido descritas: radical livre, nitrosênio e ânion nitroxil (Welch e Loscalzo, 1994; Kerwin *et al.*, 1995; Bonner, 1996). NO pode reagir com o ânion superóxido e formar um forte agente oxidante, peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que participa de reações de oxidação protéica em situações fisiológicas (Welch e Loscalzo, 1994). NO ou o nitrosênio também são capazes de formar S-nitrosotióis por reagir com grupos sulfidril. S-nitrosotióis podem ter um papel no metabolismo celular ou podem servir como



carreadores de NO (Ignarro *et al.*, 1981; Stamler *et al.*, 1992; Upchurch *et al.*, 1995). S-nitrosotióis são potentes inibidores de agregação plaquetária e vasorelaxantes. Ademais, a albumina plasmática reage com o NO endógeno ou exógeno formando S-nitrosoalbumina, servindo com um estoque plasmático de NO a partir do qual pode ser lentamente liberado (Welch e Loscalzo, 1994; Minamiyama *et al.*, 1996). Os efeitos diretos do NO na sua maioria envolvem interações do NO com complexos metálicos. As reações do NO com proteínas contendo grupamento heme são as mais relevantes fisiologicamente e incluem interação com a guanilato ciclase (Martin *et al.*, 2000) e citocromo P450 (Wink *et al.*, 1993). No entanto, NO pode também interagir com proteínas não heme que contém ferro e proteínas complexadas com zinco (Davis *et al.*, 2001). Os efeitos indiretos do NO, produzidos através da interação do NO tanto com  $O_2$  ou  $O_2^-$ , incluem nitrosilação (quando  $NO^+$  é adicionado a uma amina, tiol ou hidroxila de um grupo aromático). O óxido nítrico é formado a partir da l-arginina através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Além do substrato, l-arginina, a reação catalizada pela NOS requer oxigênio molecular, NADPH, e outros cofatores como tetrahidrobiopterina, FMN, FAD, e grupamento heme para produzir NO e citrulina (Marletta, 1994; Stuehr, 1997). A enzima existe em três isoformas codificadas por genes distintos (Marletta, 1994; Murad, 1996; Stuehr, 1997). A NOS-1, também conhecida como NOS do tipo 1, neuronal ou cerebral (NOSn) é encontrada em altas concentrações em tecidos neuronais e alguns não-neuronais. A NOSn é expressa no cérebro (Schmidt *et al.*, 1989; Knowles *et al.*, 1989; Bredt e Snyder, 1990; Rodrigo *et al.*, 1994; Moncada e Higgs, 1995), medula espinhal (Dun *et al.*, 1992), gânglios simpáticos (Dun *et al.*, 1993; Sheng *et al.*, 1993), nervos nitrérgicos periféricos (Hassal *et al.*, 1992; Safrey *et al.*, 1992; Sheng *et al.*, 1992), glândulas adrenais (Dun *et al.*, 1993; Palacios *et al.*, 1989), plaquetas (Radomski *et al.*, 1990a,b) e células das ilhotas pancreáticas (Schmidt *et al.*, 1992). A enzima NOS-2, conhecida como NOS do macrófago, NOS tipo 2 ou NOS induzida (NOSi). Apesar desta isoforma ter sido originalmente encontrada em macrófagos, existe numa variedade de tipos celulares incluindo hepatócitos, células do músculo liso vascular, fibroblastos e células epiteliais (Marletta, 1994; Murad, 1996; Stuehr, 1999). A enzima NOS-3, NOS do tipo 3 ou isoforma endotelial (NOSe), foi primeiramente identificada como a enzima que produzia o fator relaxante derivado do endotélio (Marletta, 1994; Murad, 1996; Stuehr, 1999; Davis *et al.*, 2001). A NOSe é expressa em células endoteliais (Lamas *et al.*, 1992; Marsden *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1992; Sessa *et al.*, 1992; Pollock *et al.*, 1993). Enquanto as isoformas NOSn e NOSi

são enzimas predominantemente solúveis no citoplasma, a NOSe é mais de 90% particulada na membrana (Förstermann *et al.*, 1991). As isoformas NOS-1 e NOS-3, são frequentemente agrupadas como constitutivas (NOSc), uma vez que são usualmente expressas de maneira constitutiva, e suas atividades são reguladas através de alterações nas concentrações de cálcio intracelular e da subsequente formação do complexo cálcio-calmodulina (Förstermann *et al.*, 1990; Bredt e Snyder, 1992). A enzima NOS-2, por sua vez, não é expressa basalmente nas células. A expressão da NOSi depende da ativação por ação de endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias (incluindo a interleucina-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) em diversos tipos celulares como macrófagos (Curran *et al.*, 1989; Lyons *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992), células endoteliais (Knowles *et al.*, 1990; Rees *et al.*, 1990), hepatócitos (Billiard *et al.*, 1990; Knowles *et al.*, 1990), neutrófilos (McCall *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989) e células do músculo liso vascular (Wood *et al.*, 1990). Esta enzima está ligada ao complexo cálcio-calmodulina mesmo nas concentrações basais de cálcio intracelular, portanto, a função da NOS-2 não é afetada por alterações nas concentrações de cálcio intracelular. Ademais, esta enzima pode produzir níveis muito altos de NO comparado com NOS-1 e NOS-3.

Por outro lado, as enzimas NOSn, NOSe e NOSi tem sido associadas com neurônios, endotélio e indução por estímulo imunológico/inflamatório, respectivamente, no entanto, nem sempre elas tem estas localizações ou propriedades. Por exemplo, NOSe tem sido localizado em plaquetas (Radomski *et al.*, 1990b) e em certas populações neuronais no cérebro (Dinerman *et al.*, 1994), e a NOSn tem sido identificada no epitélio de brônquios e traquéia (Kobzik *et al.*, 1993). Semelhantemente, tanto a atividade como a quantidade das isoformas constitutivas, NOSn e NOSe podem ser aumentadas, indicando que estas enzimas podem ser induzidas. Por exemplo, a gravidez ou tratamento com estradiol aumentam o RNAm tanto para a NOSn como para NOSe (Weiner *et al.*, 1994). Ademais, o estresse de cisalhamento e a atividade física constante também aumentam a expressão gênica da NOSe no endotélio da aorta (Sessa, 1994; Moncada e Higgs, 1995). Ademais, a isoforma NOSi, originalmente descrita como sendo induzida apenas em condições patológicas, está também ativa em condições fisiológicas (Moncada e Higgs, 1995).

As isoformas da NOS tem sido purificadas e clonadas de várias fontes, incluindo cérebro de rato, macrófagos, células do músculo liso vascular de rato, células

endoteliais de aorta de bovinos entre outros (Nakane *et al.*, 1993; Kerwin *et al.*, 1995; Moncada e Higgs, 1995). Em humanos foram identificados três genes que codificam as isoformas de NOS. Estes genes codificantes da NOS<sub>n</sub>, NOS<sub>i</sub> e NOS<sub>e</sub> estão localizados nos cromossomos 12 (Marsden *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1993), 17 (Xu *et al.*, 1994) e 7 (Marsden *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994), respectivamente.

Os DNAs complementares da isoforma NOS<sub>n</sub> humana e de ratos tem sido caracterizada, mostrando que possuem um RNAm de aproximadamente 10 kb codificando proteínas de 1429 e 1433 aminoácidos, respectivamente. A identidade sequencial das proteínas correspondentes nestas duas espécies é alta (93%) (Knowles e Moncada, 1994; Moncada e Higgs, 1995). As isoformas humanas NOS<sub>e</sub> e NOS<sub>n</sub> diferem entre si em massa molecular (133.000 para a NOS<sub>e</sub> 162.000 para a NOS<sub>n</sub>) e tem apenas 53% de identidade na sequência de aminoácidos (Knowles e Moncada, 1994; Moncada e Higgs, 1995; Farrel e Blake, 1996). A terminação amínica da NOS<sub>e</sub> não possui um domínio de 220 aminoácidos presentes na NOS<sub>n</sub>, e pode sofrer miristoilação (Busconi e Michael, 1993) e palmitoilação, o que explica sua localização particulada na membrana (Kerwin *et al.*, 1995; Moncada e Higgs, 1995). A isoforma NOS<sub>i</sub> de macrófagos de roedores tem homologia com a NOS<sub>e</sub> e NOS<sub>n</sub> de 51% e 54%, respectivamente. No rim de rato, duas diferentes formas de NOS<sub>i</sub> tem sido identificadas, a expressão das quais pode ser diferentemente induzidas por lipopolissacarídeo e citocinas, sugerindo que alguns tipos celulares são capazes de expressar diferentes isoenzimas NOS<sub>i</sub> (Mohaupt *et al.*, 1994).

As isoformas NOS usam L-arginina, oxigênio molecular e NADPH, nas reações catalizadas. Além do mais, as três isoenzimas contém um grupo heme e requerem tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) como cofatores (Bredt e Snyder, 1990; Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991). As isoformas NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>e</sub> são enzimas cálcio-calmodulina dependentes (Bredt e Snyder, 1990; Förstermann *et al.*, 1990, 1991; Mayer *et al.*, 1991; Nakane *et al.*, 1991; Pollock *et al.*, 1991; Bredt e Snyder, 1992), enquanto a NOS<sub>i</sub> é uma enzima cálcio e calmodulina independente cuja tradução é regulada por várias citocinas. A NOS<sub>i</sub> também se liga a calmodulina (Lyons *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992) e na verdade, em macrófagos de ratos, esta ligação é tão forte que a calmodulina pode ser considerada uma subunidade da enzima (Zoche *et al.*, 1996). A isoforma NOS<sub>i</sub> produz

endoteliais de aorta de bovinos entre outros (Nakane *et al.*, 1993; Kerwin *et al.*, 1995; Moncada e Higgs, 1995). Em humanos foram identificados três genes que codificam as isoformas de NOS. Estes genes codificantes da NOS<sub>n</sub>, NOS<sub>i</sub> e NOS<sub>e</sub> estão localizados nos cromossomos 12 (Marsden *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1993), 17 (Xu *et al.*, 1994) e 7 (Marsden *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994), respectivamente.

Os DNAs complementares da isoforma NOS<sub>n</sub> humana e de ratos tem sido caracterizada, mostrando que possuem um RNAm de aproximadamente 10 kb codificando proteínas de 1429 e 1433 aminoácidos, respectivamente. A identidade sequencial das proteínas correspondentes nestas duas espécies é alta (93%) (Knowles e Moncada, 1994; Moncada e Higgs, 1995). As isoformas humanas NOS<sub>e</sub> e NOS<sub>n</sub> diferem entre si em massa molecular (133.000 para a NOS<sub>e</sub> 162.000 para a NOS<sub>n</sub>) e tem apenas 53% de identidade na sequência de aminoácidos (Knowles e Moncada, 1994; Moncada e Higgs, 1995; Farrel e Blake, 1996). A terminação amínica da NOS<sub>e</sub> não possui um domínio de 220 aminoácidos presentes na NOS<sub>n</sub>, e pode sofrer miristoilação (Busconi e Michael, 1993) e palmitoilação, o que explica sua localização particulada na membrana (Kerwin *et al.*, 1995; Moncada e Higgs, 1995). A isoforma NOS<sub>i</sub> de macrófagos de roedores tem homologia com a NOS<sub>e</sub> e NOS<sub>n</sub> de 51% e 54%, respectivamente. No rim de rato, duas diferentes formas de NOS<sub>i</sub> tem sido identificadas, a expressão das quais pode ser diferentemente induzidas por lipopolissacarídeo e citocinas, sugerindo que alguns tipos celulares são capazes de expressar diferentes isoenzimas NOS<sub>i</sub> (Mohaupt *et al.*, 1994).

As isoformas NOS usam L-arginina, oxigênio molecular e NADPH, nas reações catalizadas. Além do mais, as três isoenzimas contém um grupo heme e requerem tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) como cofatores (Bredt e Snyder, 1990); Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991). As isoformas NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>e</sub> são enzimas cálcio-calmodulina dependentes (Bredt e Snyder, 1990; Förstermann *et al.*, 1990, 1991; Mayer *et al.*, 1991; Nakane *et al.*, 1991; Pollock *et al.*, 1991; Bredt e Snyder, 1992), enquanto a NOS<sub>i</sub> é uma enzima cálcio e calmodulina independente cuja tradução é regulada por várias citocinas. A NOS<sub>i</sub> também se liga a calmodulina (Lyons *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992) e na verdade, em macrófagos de ratos, esta ligação é tão forte que a calmodulina pode ser considerada uma subunidade da enzima (Zoche *et al.*, 1996). A isoforma NOS<sub>i</sub> produz

uma quantidade maior e libera por longo tempo o óxido nítrico quando comparada com as isoformas NO<sub>s</sub>e e NO<sub>s</sub>n, os quais geram pequenas quantidades de NO (Moncada *et al.*, 1991; Nathan e Hibbs, 1991; Moncada e Higgs, 1995). Ambas as isoformas são competitivamente inibidas pela N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) e outros análogos de L-arginina (Joly *et al.*, 1994; McCall e Vallance, 1992; Moncada *et al.*, 1991), e a expressão da NOS<sub>i</sub> é inibida por corticosteróides (Cohen, 1995; Moncada *et al.*, 1991).

### **Prostaciclina**

A prostaciclina foi o primeiro fator relaxante derivado do endotélio a ser descrito, mesmo antes dos trabalhos seminais de Furchgott e Zawadzki que levaram posteriormente à identificação do óxido nítrico (Furchgott e Zawadzki, 1980). Em 1976, Moncada e cols. descreveram um agente anticoagulante que também era capaz de relaxar o músculo liso vascular. Eles chamaram a entidade de PGX, a qual, logo depois, foi identificada como prostaciclina (Moncada *et al.*, 1976; Moncada e Vane, 1979).

A prostaciclina é um membro da família prostaglandina de mediadores lipídicos, sendo um ácido carboxílico insaturado com 20 carbonos e um anel ciclopentano. Essa substância, que é o principal produto do metabolismo do ácido araquidônico nas células endoteliais, possui potentes atividades vasodilatadoras e antitrombóticas (Vane, Anggard e Botting, 1990; Moncada *et al.*, 1997; Caughey *et al.*, 2001; Vane e Corin, 2003).

A liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídios ligados à membrana por ação de fosfolipases forma a base da produção de prostanóides. A ciclooxigenase converte o ácido araquidônico em prostaglandina H<sub>2</sub>, que sofre ação de várias sintases, resultando na produção de potentes prostanóides vasoativos como a prostaciclina, prostaglandina E e F e tromboxano. Desses, a prostaciclina é o principal prostanóide produzido pelas células endoteliais (Vane e Corin, 2003). A formação de prostaciclina é regulada por dois passos limites: a liberação de ácido araquidônico da membrana fosfolipídica pela fosfolipase A<sub>2</sub> e a conversão desse ácido a um precursor prostanóide pela ciclooxigenase. Dois tipos de ciclooxigenases (COX) têm sido identificados: COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tipos de células e

parece ser responsável pela síntese de prostaglandinas que são importantes para funções homeostáticas, enquanto a COX-2 é rapidamente induzida por citocinas e fatores de crescimento (Vane, Bakhle e Botting, 1998). Frias e colaboradores (2003) mostraram que em músculo liso vascular, a angiotensina II, um hormônio vasoativo, promove a produção de prostaciclina em larga extensão através do aumento da expressão da COX-2, o qual é mediado pelo ácido fosfatídico gerado pelo aumento da atividade da fosfolipase D dependente de proteína quinase C (Frias *et al.*, 2003), sendo este um mecanismo independente da COX-1.

A prostaciclina causa relaxamento predominantemente via sistema de transdução adenilato ciclase/AMPC. O mecanismo ocorre pela interação da prostaciclina com receptor específico na membrana plasmática do músculo liso vascular. Essa interação leva a ativação da adenilato ciclase e aumento da produção de AMPC. Por sua vez, o AMPC ativa a proteínaquinase A, a qual fosforila proteínas-alvo específicas e leva ao relaxamento vascular (Kukovetz *et al.*, 1979; Ignarro *et al.*, 1985). A proteínaquinase A tem um efeito semelhante a proteínaquinase G, podendo ativar canais de potássio sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimular a saída de cálcio do citosol inibindo a maquinaria contrátil (Carvalho *et al.*, 2001). Entretanto, embora a remoção do cálcio do citoplasma e a redução da sensibilidade ao cálcio do aparato contrátil seja um importante mecanismo para produção de relaxamento por esse sistema, a prostaciclina pode também induzir a hiperpolarização do músculo liso vascular. A hiperpolarização obtida no músculo liso vascular induzida por prostaciclina exógena e pelo componente da hiperpolarização derivada do endotélio que é sensível aos bloqueadores de ciclooxigenase está associada a um aumento de condutância de membrana com aproximação do potencial de membrana do potencial de equilíbrio do potássio (Parkington *et al.*, 1993; Schubert *et al.*, 1997; Clapp *et al.*, 1998; Yajima *et al.*, 1999; Thapaliya, Matsuyama e Takewaki, 2000). A liberação de prostaciclina do endotélio arterial é capaz também de suprimir a liberação de transmissor vasoconstrictor de nervos da adventícia vascular (Tare, Parkington e Coleman, 2000).

Embora a participação de hiperpolarização, por aumento da condutância ao potássio, no relaxamento induzido por prostaciclina tenha sido demonstrado, a natureza dos canais de potássio envolvidos pode não ser a mesma nos diferentes leitos arteriais. Pesquisa utilizando artérias coronárias (Parkington *et al.*, 1993; Clapp *et al.*, 1998;



Yajima *et al.*, 1999; Thapaliya, Matsuyama e Takewaki, 2000) e mamárias de cobaias (Tare, Parkington e Coleman, 2000) mostraram o envolvimento de canais de potássio sensíveis ao ATP. No entanto, estudos realizados na artéria da cauda de rato mostraram que os canais de potássio ativados por cálcio parecem estar envolvidos (Schubert *et al.*, 1997).

Desde a descrição inicial do EDRF por Furchgott em 1980 tem sido reconhecido que o NO e a prostaciclina tem várias atividades e peculiaridades semelhantes. Por exemplo, muitos, mas não todos, os estímulos para liberação de NO são também estímulos potentes para liberação de prostaciclina (Radomski, Palmer e Moncada, 1987; de Nucci *et al.*, 1988; Fostermann *et al.*, 1989). A bradicinina e a acetilcolina, por exemplo, induzem vasodilatação que é dependente de NO e prostaciclina (Lamontagne *et al.*, 1992). Em grandes vasos e na microcirculação, citocinas induzem “up-regulation” da produção de NO e prostaglandinas (Moatter e Gerritsen, 1992 e 1994; Kilbourn e Belloni, 1990; Akarasereenont *et al.*, 1995). Além do mais, as vias biossintéticas das prostaglandinas e do óxido nítrico podem sofrer interferências uma da outra. Por exemplo a indução da produção de PGE<sub>2</sub> no pulmão por administração de LPS em ratos foi inibida por inibidores da síntese de óxido nítrico e mimetizado por administração de nitroprussiato de sódio (Sautebin e DiRosa, 1994). Após inibição da NOS os níveis plasmáticos de prostaciclina aumentam (Wu *et al.*, 1999) e o efeito hipertensivo do bloqueio da NOS em suínos é amplificado pelo pré-tratamento com indometacina (Albertini, Vanelli e Clemente, 1996). Existem relatos que o óxido nítrico pode inibir a ciclooxigenase (Kanner *et al.*, 1992) e assim como nitrovasodilatadores suprimir a liberação de prostaciclina vascular (Doni *et al.*, 1988; Thelen *et al.*, 1992; Matthews *et al.*, 1995; Barker *et al.*, 1996; Bauersachs *et al.*, 1996; Kosonen *et al.*, 1998). Portanto, durante o bloqueio crônico da NOS ou após deleção do gene codificados da NOS a prostaciclina pode parcialmente compensar a perda do NO. Neste sentido, durante inibição crônica da NOS a excreção urinária de prostaciclina aumenta 2-3 vezes (Danielson e Conrad, 1996). A vasodilatação induzida pelo fluxo nas arteríolas do músculo gracilis e induzida por acetilcolina nas artérias mesentéricas, que são primordialmente mediadas por NO, permanecem inalteradas em camundongos “Knockouts” para NOSe. No entanto, a indometacina, a qual não afeta a resposta de vasos de animais controle (“wild-type”), abole quase que completamente as respostas citadas acima em animais que sofreram deleção do gene para NOSe (Chataigneau *et al.*,

1999; Sun *et al.*, 1999). Estes dados apontam para um papel compensatório da prostaciclina no caso de diminuição ou perda da atividade do óxido nítrico. Puybasset e colaboradores também demonstraram um incremento na via da ciclooxigenase levando a um aumento da liberação de prostanóides vasorelaxantes na artéria femoral de cães após inibição crônica da NOS (Puybasset *et al.*, 1996).

Do ponto de vista funcional, várias evidências também sugerem que um vasodilatador prostanóide, presumivelmente a prostaciclina, pode atuar como fator compensatório após a perda crônica de óxido nítrico na circulação coronária. Em artérias coronárias, a prostaciclina causa liberação e potenciação do efeito do fator de relaxamento derivado do endotélio (óxido nítrico) (Marcelín-Jiménez e Escalante, 2001), enquanto nitrovasodilatadores tem ações sinérgicas com um análogo sintético da prostaciclina (Lidbury *et al.*, 1989). Estudo realizado em artérias coronárias de cães sujeitos a bloqueio crônico de óxido nítrico sintase mostrou que a liberação de prostaciclina estimulada por bradicinina foi duas vezes maior quando comparada com controle (Beverelli *et al.*, 1997). Lacza e colaboradores (2003) mostraram que em caso de redução dos níveis de óxido nítrico na circulação coronariana, o tônus arterial é mantido pela produção de prostaciclina (Lacza *et al.*, 2003). Tem sido, então, proposto que a interação prostaciclina/óxido nítrico pode representar um mecanismo compensatório promovendo o aumento de um dos agonistas relaxantes quando a produção do outro está reduzida.

Os mecanismos de interação ainda estão sendo estudados, por exemplo, Marcelín-Jiménez e Escalante (2001) sugeriram que o óxido nítrico inibe a atividade da COX através da atividade da proteína quinase dependente de GMPc que fosforila a proteína ciclooxigenase associada e essa inibição atenua o relaxamento vascular mediado por prostaciclina. Por outro lado, a ciclooxigenase, com seu centro ferro-heme que lhe confere atividade hidroxidase, pode ser um alvo para ação inibitória do NO (Kalyanaranman *et al.*, 1982). Alternativamente a nitrosilação de outros alvos na ciclooxigenase (tirosina, cisteínas livres) ou em outras enzimas, como a prostaciclina sintetase podem ser mecanismos potenciais (Gerritsen, 1996). Miceli e colaboradores (2003), demonstraram que a síntese aumentada de prostaciclina induzida por fatores pró-inflamatórios em células endoteliais da veia umbilical humana pode ser bloqueada

por bloqueadores da NOS induzida mostrando uma interação sinérgica entre as isoformas induzidas destas enzimas.

A prostaciclina e óxido nítrico são liberados a partir das células endoteliais por uma variedade de substâncias vasoativas, incluindo acetilcolina, nucleotídeos de adenina, bradicinina, vasopressina e angiotensina (Barker *et al.*, 1996). Alguns autores demonstraram que a geração de prostaciclina e óxido nítrico pelas células endoteliais pode ser estimulada pela bradicinina, ADP, ATP, ácido araquidônico ou fosfolipase C e que estes efeitos podem ser antagonizados por miristato de forbol (inibidor de proteína quinase C), por um inibidor da quinase dependente de diacilglicerol e por gentamicina, sugerindo que a liberação de óxido nítrico e prostaciclina estão acopladas e que o passo comum inicial é o aumento do cálcio intracelular com regulação por ativação da fosfolipase C e PKC (de Nucci *et al.*, 1988; Hyslop e de Nucci, 1991).

Por outro lado, o bloqueio farmacológico (Gardiner *et al.*, 1989; Vallance, Collier e Moncada, 1989) ou a deleção gênica da NOS (Huang *et al.*, 1995) tem efeitos rápidos e profundos na pressão arterial, aumentando a mesma em cerca de 30-50mmHg. No entanto, o bloqueio da enzima ciclooxigenase com indometacina ou aspirina não afeta a pressão sanguínea de repouso em humanos (Duffy *et al.*, 1999) ou ratos (Gardiner, Compton e Bennett, 1990; Parkington *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2002). Ademais, ratos *knockout* para a isoforma induzida da ciclooxigenase (COX-2) são normotensos (Lim *et al.*, 1999). No entanto, em uma população de japoneses com polimorfismos na região promotora do gen codificante da prostaciclina sintetase, apresentando baixa atividade de transcrição, a pressão sanguínea está elevada e há uma prevalência aumentada de acidentes vasculares cerebrais e de infartos cardíacos (Iwai *et al.*, 1999). A pressão sanguínea também é maior em camundongos *knockout* para a prostaciclina sintetase. Nestes animais, há aumento da razão lúmen/parede vascular na aorta, vasos pulmonares e renais e também glomeruloesclerose (Yokoyama *et al.*, 2002).

Além disso, a razão prostaciclina/tromboxano A<sub>2</sub> tem um importante papel na determinação do tônus vascular (Bunting, Moncada e Vane, 1983). O trabalho de Yokoyama e colaboradores (2002), citado anteriormente, demonstra que nos animais com deleção no gene que codifica a prostaciclina sintetase e consequente ausência do

metabólito prostaciclina tem um aumento de cerca de cinco vezes na produção de tromboxano A<sub>2</sub>. Evidências recentes demonstram que o estresse oxidativo que é uma consequência destrutiva comum a vários fatores de risco cardiovasculares, incluindo diabetes e hipertensão, afeta a razão prostaciclina/tromboxano A<sub>2</sub>. Ânions superóxido, por exemplo, reagindo com óxido nítrico, formam peroxinitrito, uma molécula citotóxica que pode nitrosilar proteínas. A nitrosilação da prostaciclina sintetase pelo peroxinitrito deprime sua atividade e torna disponíveis quantidades aumentadas de prostaglandina H<sub>2</sub> a qual, além de ter ação vasoconstritora direta, é também precursor do tromboxano A<sub>2</sub>, agente vasconstritor e com ação pró-coagulante (Bachschmid *et al.*, 2003; Ozaki *et al.*, 2002; Hink *et al.*, 2003). Portanto a manutenção desta via é importante para regulação local de tônus e coagulabilidade sanguínea e o seu bloqueio parece estar associado com complicações vasculares.

Neste sentido, o uso de análogos estáveis da prostaciclina tem efeitos benéficos em pacientes com doença vascular periférica, incluindo aquelas derivadas do *diabetes mellitus* (Szczeklik *et al.*, 1983; Toyota e Oikawa, 2002; Suzuki *et al.*, 2002). Uma série de estudos clínicos, por exemplo, durante um período de doze anos envolvendo 2000 pacientes com doença vascular periférica demonstrou que a infusão intravenosa do análogo estável da prostaciclina, iloprost, tem um benefício significativo quando comparado com placebo em termos de cicatrização das ulcerações e dor em repouso ao fim do período de tratamento (2-4 semanas), além do mais a frequência de amputação ou morte durante os seis meses que seguiram ao tratamento também foram significativamente reduzidas (Dormandy, 1996).

### **Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio**

Em 1988, Taylor e Weston sugeriram que o relaxamento endotélio-dependente do músculo liso vascular produzia uma liberação de um fator adicional de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, do inglês “*endothelium-derived relaxing factor*”), o qual poderia causar relaxamento por aumento do potencial de membrana das células musculares. Este fator adicional foi denominado fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, do inglês, “*endothelium-derived hyperpolarizing factor*”) para distingui-lo do EDRF descrito por Furchgott e Zawadzki, (Taylor e Weston, 1988; Chen *et al.*, 1988). As evidências para a existência de um fator derivado do endotélio distinto

do NO foi baseada em três importantes observações. Primeiro, mesmo antes da importância do endotélio na modulação do tônus vascular ter sido reconhecida, já havia sido demonstrado que a acetilcolina causava hiperpolarização do músculo liso (Kuriyama e Suzuki, 1978). A constatação de que o endotélio era responsável por este efeito na propagação do potencial de membrana ocorreu logo após a descoberta do EDRF (Furchgott e Zawadzki, 1980), quando Bolton e colaboradores (1984) descreveram a ação hiperpolarizante do carbacol em artéria mesentérica de cobaio, e um efeito similar foi descrito com a substância P em artéria coronária (Bény e Brunet, 1988a). A segunda evidência para indicar a existência de um fator de hiperpolarização endotélio-dependente distinto do NO, foi baseada nas diferenças dos mecanismos de transdução celular. O relaxamento do músculo liso em resposta ao NO é mediado por ativação heme-dependente da guanilato ciclase, com a subsequente geração de GMPc (Ignarro *et al.*, 1982). No entanto, apesar desta ação do NO na guanilato ciclase ser reproduzida por nitrovasodilatadores, a ação destes no tecido vascular não está associada com uma significativa hiperpolarização da membrana (Taylor *et al.*, 1988). Finalmente, uma evidência direta para a existência de mais de um mecanismo para a ação vasorelaxante da acetilcolina foi demonstrada utilizando aorta e artéria pulmonar de rato onde a resposta dependente do NO endotelial pode ser bloqueada de maneira independente da hiperpolarização do músculo liso (Chen *et al.*, 1988). O relaxamento e o aumento na produção de GMPc em resposta à acetilcolina foi quase completamente abolido pela hemoglobina (liga-se e inativa NO) ou azul de metileno (bloqueia a guanilato ciclase e capta NO) ao mesmo tempo que a hiperpolarização transitória dos vasos permaneceu inalterada. Mostrando que a hiperpolarização do músculo liso vascular independe do mecanismo mediado pelo NO.

Estas observações sugerem que o EDHF pode ser importante no início do relaxamento do músculo liso pela redução indireta do transporte de  $Ca^{2+}$  através dos canais voltagem-dependente. Além disso, sugere que o EDHF pode ter papel predominante nas pequenas arteríolas nas quais, em comparação com as grandes, as células do músculo liso parecem ser mais dependentes do influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular durante a contração (Nilsson *et al.*, 1995).

Evidências adicionais sugerem que a hiperpolarização endotélio-dependente é um processo fisiológico e esta afirmação é sustentada pelo fato de que a estimulação

do NO foi baseada em três importantes observações. Primeiro, mesmo antes da importância do endotélio na modulação do tônus vascular ter sido reconhecida, já havia sido demonstrado que a acetilcolina causava hiperpolarização do músculo liso (Kuriyama e Suzuki, 1978). A constatação de que o endotélio era responsável por este efeito na propagação do potencial de membrana ocorreu logo após a descoberta do EDRF (Furchgott e Zawadzki, 1980), quando Bolton e colaboradores (1984) descreveram a ação hiperpolarizante do carbacol em artéria mesentérica de cobaio, e um efeito similar foi descrito com a substância P em artéria coronária (Bény e Brunet, 1988a). A segunda evidência para indicar a existência de um fator de hiperpolarização endotélio-dependente distinto do NO, foi baseada nas diferenças dos mecanismos de transdução celular. O relaxamento do músculo liso em resposta ao NO é mediado por ativação heme-dependente da guanilato ciclase, com a subsequente geração de GMPc (Ignarro *et al.*, 1982). No entanto, apesar desta ação do NO na guanilato ciclase ser reproduzida por nitrovasodilatadores, a ação destes no tecido vascular não está associada com uma significativa hiperpolarização da membrana (Taylor *et al.*, 1988). Finalmente, uma evidência direta para a existência de mais de um mecanismo para a ação vasorelaxante da acetilcolina foi demonstrada utilizando aorta e artéria pulmonar de rato onde a resposta dependente do NO endotelial pode ser bloqueada de maneira independente da hiperpolarização do músculo liso (Chen *et al.*, 1988). O relaxamento e o aumento na produção de GMPc em resposta à acetilcolina foi quase completamente abolido pela hemoglobina (liga-se e inativa NO) ou azul de metileno (bloqueia a guanilato ciclase e capta NO) ao mesmo tempo que a hiperpolarização transitória dos vasos permaneceu inalterada. Mostrando que a hiperpolarização do músculo liso vascular independe do mecanismo mediado pelo NO.

Estas observações sugerem que o EDHF pode ser importante no início do relaxamento do músculo liso pela redução indireta do transporte de  $Ca^{2+}$  através dos canais voltagem-dependente. Além disso, sugere que o EDHF pode ter papel predominante nas pequenas arteríolas nas quais, em comparação com as grandes, as células do músculo liso parecem ser mais dependentes do influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular durante a contração (Nilsson *et al.*, 1995).

Evidências adicionais sugerem que a hiperpolarização endotélio-dependente é um processo fisiológico e esta afirmação é sustentada pelo fato de que a estimulação



transmural de vasos sanguíneos isolados resulta em hiperpolarização e relaxamento e que a potente ação vasodilatadora das drogas que ativam canais de  $K^+$  (e.g., nicorandil, pinacidil, cromocalina, levocalina) é principalmente devido a um aumento do potencial de membrana (Mekata, 1986; Plane e Garland, 1993).

Em geral, do ponto de vista mecanicista, a hiperpolarização do músculo liso produz relaxamento tanto pela redução da probabilidade de abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  como da taxa de renovação dos fosfatidilinositóis intracelulares, assim diminuindo a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$   $\{[Ca^{2+}]_i\}$  (Nelson e Quayle, 1995). A contribuição das respostas mediadas pelo EDHF como um mecanismo para o relaxamento endotélio-dependente aumenta a medida que o calibre do vaso diminui (Shimokawa *et al.*, 1996), com exceção do leito vascular renal e coronariano, nos quais o EDHF tem um papel maior mesmo em artérias de condutância (Quilley *et al.*, 1997; Félétou e Vanhoutte 1999). Em camundongos, as respostas mediadas por EDHF em vasos de resistência são pelo menos tão importante quanto às induzidas pelo NO endotelial, uma vez que nem a deleção do gene que codifica a NOSe nem a inibição farmacológica da mesma atenua a resposta endotélio-dependente induzida por agonistas *in vivo* e *in vitro* (Waldron *et al.*, 1999 ; Brandes *et al.*, 2000).

Hiperpolarizações endotélio-dependente estão também presentes em vários vasos sanguíneos de humanos, artérias, incluindo as coronárias (Nakashima *et al.*, 1993; Kemp e Cocks, 1997; He, 1997), gastroepiplóica (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997), subcutânea (Woolfson e Poston, 1990; Deng *et al.*, 1995; Van de Voorde *et al.*, 1997, omental (Pascoal e Umans, 1996; Ohlmann *et al.*, 1997; Wallerstedt e Bodelsson, 1997), renal (Kessler *et al.*, 1996) e radial (Hamilton *et al.*, 1997) e veias safenas (Yang e He, 1997). Como acontece em estudos em animais (Mugge *et al.*, 1991; Nagao *et al.*, 1992; Shimokawa *et al.*, 1996), a contribuição da resposta ao EDHF em artérias humanas é mais significativa em vasos de pequeno calibre que em vasos de grande calibre (Woolfson e Poston, 1990; Urakami-Harasawa *et al.*, 1997).

Existem evidências de que o EDHF pode agir como um mecanismo vasodilatador alternativo de compensação aguda em situações em que outras vias estão comprometidas. Como exemplo temos que a vasodilatação endotélio-dependente mediada por EDHF está supra-regulada em doenças vasculares inflamatórias

caracterizadas por disfunção endotelial. Esta mudança na atividade do EDHF parece ser um mecanismo compensatório agudo para com a deficiência do NO derivado da NOSe; uma característica presente em desordens cardiovasculares com disfunção endotelial associada (Cai e Harrison, 2000). Além disso, existem vários exemplos, tanto em estudos com humanos como em animais, onde a atividade do NO derivado da a NOSe está comprometida: em animais deleção do gene da NOSe (Scotland *et al.*, 2001), hipercolesterolemia (Najibi e Cohen, 1995; Urakami-Harasawa *et al.*, 1997), hipertensão (Taddei *et al.*, 1999) e insuficiência cardíaca congestiva (Katz e Krum, 2001). Ademais, a identificação do EDHF tem significância fisiológica e patofisiológica, e pode prover novas abordagens terapêuticas para desordens cardiovasculares (Chauhan *et al.*, 2003).

Inicialmente, várias evidências sugeriam que a hiperpolarização endotélio-dependente das células do músculo liso resultava da abertura dos canais de potássio no plasmalema do músculo liso. Primeiramente a hiperpolarização era abolida por concentrações de  $K^+$  maiores que 25mM (Chen e Suzuki, 1989). Segundo, agonistas que produziam hiperpolarização endotélio-dependente também estimulavam o efluxo de  $K^{42}$  (ou  $Rb^{86}$ ) de artérias pré-carregadas com estes marcadores (Taylor *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1988). Terceiro, uma diminuição na resistência das membranas das células do músculo liso vascular foi observada durante hiperpolarizações endotélio-dependentes (Chen e Suzuki, 1989), sugerindo que a hiperpolarização foi devido à abertura dos canais de  $K^+$  e não ao fechamento de, por exemplo, de canais de  $Cl^-$  ou outro canal de cátion não específico. Conjuntamente, estas observações sugeriam que a hiperpolarização endotélio-dependente das células do músculo liso envolvia um aumento na condutância de  $K^+$  e que o EDHF era um fator derivado do endotélio que promovia a abertura do canal de  $K^+$ .

Hiperpolarizações endotélio-dependentes (na presença de inibidores da NO sintase e cicloxigenases) não são prevenidas pela glibenclamida (um inibidor dos canais de  $K^+$  dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ )). Em contraste, estudos demonstram que a manutenção das hiperpolarizações da membrana provocadas pela prostaciclina (e iloprost) são bloqueadas pela glibenclamida, sugerindo o envolvimento de canais de potássio dependentes de ATP (Parkington *et al.*, 1993, 1995; Corriu *et al.*, 1996) Da mesma forma que, em vasos sanguíneos onde o NO causa hiperpolarização, reproduzida

com o uso de microeletrodos intracelulares, a resposta é também bloqueada pela glibenclamida (Miyoshi *et al.*, 1994; Plane *et al.*, 1995; Murphy e Brayden, 1995; Parkington *et al.*, 1995; Corriu *et al.*, 1996), mas não pela combinação de caribdotoxina e apamina (Corriu *et al.*, 1996). Outros pesquisadores demonstraram que as hiperpolarizações endotélio-dependente são bloqueadas por toxinas específicas que inibem os canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ). Além disso, um fato importante da resposta mediada pelo EDHF, primeiramente observada pelo grupo de Garland, é sua abolição pela combinação de apamina (um inibidor específico dos canais  $K_{Ca}$  de baixa condutância (canais  $SK_{Ca}$ ) mais caribdotoxina (um inibidor não seletivo dos canais de alta condutância ( $BK_{Ca}$ ), de condutância intermediária ( $IK_{Ca}$ ), e de alguns canais de  $K^+$  voltagem-dependente) (Zygmunt e Hoggstatt, 1996; Corriu *et al.*, 1996), apesar de a toxina ser efetiva sozinha em algumas circunstâncias (Murphy e Brayden, 1995; Miura *et al.*, 1999).

O efeito da apamina pode ser reproduzido pela scyllatoxina, um inibidor do canal  $SK_{Ca}$ , estruturalmente distinto da apamina, indicando que os canais  $SK_{Ca}$  estão envolvidos nas hiperpolarizações endotélio-dependentes (Corriu *et al.*, 1996). No entanto, apesar da iberiotoxina (um inibidor de canais  $BK_{Ca}$ ) poder abolir a vasodilatação independente de NO e prostaciclina em alguns leitos vasculares *in vivo* (Nishikawa *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000), em artérias nas quais a combinação de caribdotoxina e apamina é essencial para inibir respostas, iberiotoxina não pode substituir a caribdotoxina (Zygmunt e Hoggstatt, 1996; Chataigneau *et al.*, 1998a), excluindo portanto um papel primordial dos canais  $BK_{Ca}$  em muitas respostas mediadas pelo EDHF.

Estudos que mostrem a existência de canais de  $K_{Ca}$ , que são sensíveis à caribdotoxina mas não à iberiotoxina, no músculo liso, o que sugere que o canal  $IK_{Ca}$  ativado por EDHF não está presente nas células do músculo liso. No entanto, tanto o canal  $IK_{Ca}$  como o  $SK_{Ca}$  são expressos nas células endoteliais (Marchenko e Sage, 1996; Burnham *et al.*, 2002) e canais de  $K^+$  endoteliais são ativados por estímulo que produz um aumento na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  (Busse *et al.*, 1988). A hiperpolarização das células endoteliais promovida pela acetilcolina ou bradíciclinina é bloqueada pela combinação de apamina e caribdotoxina (Edwards *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2000). Em adição, estas duas toxinas previnem o relaxamento do músculo liso

quando seletivamente aplicadas ao endotélio (Doiugthy *et al.*, 1999) Finalmente 1-etil-2-benzimidazolinone (I-EBIO), um ativador de canais  $IK_{Ca}$  (e possivelmente  $SK_{Ca}$ , mas não canais  $BK_{Ca}$ ) induz hiperpolarização da célula endotelial e a hiperpolarização endotélio-dependente das células do músculo liso, respostas que são sensíveis à caribdotoxina mas insensíveis a iberiotoxina (Edwards *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2001). Coletivamente, estas evidências sugerem que a combinação das toxinas atua nos dois tipos de canais  $K_{Ca}$  (canais  $IK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$ ) expressos nas células endoteliais (i.e. previnem a hiperpolarização da célula endotelial), preferencialmente ao bloqueio dos canais  $K^+$  ativados por EDHF e localizados nas células do músculo liso .

Em alguns tecidos, a hiperpolarização das células endoteliais pode ser regulada pela ativação da citocromo P450 resultando na geração de ácidos epoxieicoatrienoicos (EETs). EETs são produtos derivados das epoxigenases do citocromo P450 que parecer ter um importante papel na regulação da homeostase vascular (Fleming *et al.*, 2001). A maioria das evidências a favor do EDHF ser um metabólito do ácido araquidônico de vida curta, produzido através da via das epoxigenases do citocromo P450, têm sido obtidas utilizando artérias coronárias de bovinos (Hecker *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1996), suínos (Hecker *et al.*, 1994; Popp *et al.*, 1996), caninos (Widmann *et al.*, 1998) e humanos (Miura *et al.*, 1999; Quilley e McGiff, 2000). Nestes vasos, respostas mediadas por EDHF foram bloqueadas por inibidores do citocromo P450. No entanto, inibidores da citocromo P450 são notoriamente inespecíficos, bloqueando inclusive canais de  $K^+$  (Graier *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1996; Féléto e Vanhoutte, 1996; Zygmunt *et al.*, 1996; Resende, Ballejo e Salgado, 1998) e em vasos de ratos, cobaias, cães e suínos, inibidores, estruturalmente não relacionados, da citocromo P450 não inibem ou produzem uma inibição não específica da resposta ao EDHF (Corriu *et al.*, 1996a,b; Graier *et al.*, 1996; Zygmunt *et al.*, 1996; Fukao *et al.*, 1997; Chataigneau *et al.*, 1998; Resende, Ballejo e Salgado, 1998).

Além disso, EETs tem o efeito de relaxar artérias coronárias e hiperpolariza as células do músculo liso por aumentar a probabilidade de abertura dos canais de  $K_{Ca}$  que são sensíveis ao tetraetilamônio, caribdotoxina ou iberiotoxina (Campbell *et al.*, 1996); Gebremedhin *et al.*, 1992; Fulton *et al.*, 1998; Fisslthaler *et al.*, 1999). Vale também ressaltar que, as respostas mediadas por EDHF são incrementadas por agentes que aumentam a expressão endotelial de citocromo P450, na artéria coronária de suínos

(Popp *et al.*, 1996; Fisslthaler *et al.*, 1999). Além da hiperpolarização endotélio-dependente e do relaxamento poderem ser inibidos por “anti-sense” oligonucleotídeos contra o citocromo P450 2C (Fisslthaler *et al.*, 1999). Estes dados sugerem fortemente que a ativação de uma epoxigenase citocromo P450 é um pré-requisito para a geração do relaxamento mediado por EDHF na artéria coronária de suíno.

No entanto, apesar dos EETs serem gerados pelas células endoteliais tanto em condições de repouso como em resposta à estimulação celular por agonistas, existe uma pouca evidência direta demonstrando que estes metabólitos do citocromo P450 podem ser liberados das células endoteliais em quantidades suficientes para promover a hiperpolarização e relaxamento das células do músculo liso. Concentrações supramáximas de agonistas receptor-dependente ou independente, estímulo hemodinâmico tal como o “stretch” pulsátil, são, no entanto, capazes de estimular a liberação de EETs de artérias coronárias de suíno e bovino em adição à cultura de células endoteliais (Popp *et al.*, 1996; Fisslthaler *et al.*, 1999; Gebremedhin *et al.*, 1998; Popp *et al.*, 1998). Sobre estas circunstâncias, EETs são fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio que promovem relaxamento do músculo liso por abertura dos canais  $BK_{Ca}$ . No entanto, o fato de EETs exógenos ativarem canais  $BK_{Ca}$ , ao invés dos canais  $IK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$  (os canais ativados nas respostas ao EDHF), sugere que um EET difusível proporciona uma resposta de maneira diferente da maioria das respostas mediadas por EDHF.

Uma possibilidade que pode satisfazer muitas das observações experimentais é que a hiperpolarização das células do endotélio pode ser em parte regulada pela ativação do citocromo P450. Por exemplo, EETs podem modular o influxo endotelial de  $Ca^{2+}$  em resposta a uma depleção no estoque de  $Ca^{2+}$  (Hoebel *et al.*, 1997) e pode facilitar a ativação dos canais de  $K^+$  endoteliais por aumento de sua sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  (Li e Campbell, 1997; Baron *et al.*, 1997). Adicionalmente, EETs também exercem uma mudança bifásica na comunicação eletrotônica através de junções “gap” entre as células endoteliais (Popp *et al.*, 2002). Além disso, em artérias coronárias, EETs e outros produtos do citocromo P450 poderiam ser reclassificados como segundos mensageiros intracelulares cruciais para a iniciação e transmissão da hiperpolarização da célula endotelial, e como uma consequência, para a hiperpolarização mediada por EDHF e relaxamento das células do músculo liso vascular.

Randall e colaboradores (1996) postularam que nos leitos arteriolar e coronariano de rato, EDHF poderia ser o anandamide (Randall *et al.*, 1997; Randall e Kendall, 1997, 1998), um derivado do ácido araquidônico suspeito de ser um ligante endógeno para o do canabinóide CB<sub>1</sub> (Devane *et al.*, 1992; Di Marao *et al.*, 1994). No entanto, em vasos sanguíneos isolados de várias espécies (suíno, cobaio e rato) o anandamide não produziu hiperpolarização ou produziu hiperpolarização através de um mecanismo diferente do mediado por EDHF. Assim, um canabinóide endógeno parece não ser o maior mediador de hiperpolarizações endotélio-dependente (Plane *et al.*, 1997; Zygmunt *et al.*, 1997; White e Hiley, 1997; Chataigneau *et al.*, 1998; Pratt *et al.*, 1998).

Outros mediadores tem sido propostos como sendo um EDHF, entre eles os isoprostanóides. Os isoprostanos fazem parte de uma nova classe de metabólitos do ácido araquidônico que são gerados quando as membranas celulares são atacadas por radicais de oxigênio livres, e são usados clinicamente e experimentalmente como marcadores para muitas doenças nas quais o estresse oxidativo é uma característica proeminente (Morrow e Roberts, 1996; Rokach *et al.*, 1997). Além disso, exercem importantes efeitos biológicos, que vão de poderosa vasoconstrição à vasodilatação, dependendo do isoprostano particular, tecido e espécie estudada (Janssen, 2001). Particularmente aqueles da série E (e.g. 8-isoPGE<sub>1</sub> e 8-isoPGE<sub>2</sub>), promovem vasorelaxamento no músculo liso arterial, apesar do mecanismo ainda não estar elucidado.

Várias linhas de estudo apresentam isoprostanos como EDHF, baseado em evidências como: os isoprostanos são liberados pelo endotélio, independentes da COX, porém sua liberação pode ter regulação enzimática; radicais livres e espécies reativas de oxigênio representam um papel central na produção de isoprostanos e muitos estudos ligam espécies reativas de oxigênio a EDHFs; PLA<sub>2</sub> representa um papel chave na produção e liberação de isoprostanos, tanto pela liberação do ácido araquidônico antes da sua conversão a isoprostano ou pela liberação do isoprostano preformado (devido ao ácido araquidônico ser vulnerável ao ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio em sua forma livre em adição a quando está esterificado dentro da membrana) (Rokach *et al.*, 1997; Morrow *et al.*, 1992). Efeitos mediados por EDHF são também sensíveis a inibidores da PLA<sub>2</sub> (Hecker *et al.*, 1994; Hayabuchi *et al.*, 1998; Hutcheson *et al.*, 1999;



Bauersachs *et al.*, 1994; Adeagbo e Henzel, 1998; Adeagbo, 1997; Barlow *et al.*, 2000). Peróxido ativa canais de  $K_{Ca}$  em células do músculo liso coronariano via metabólitos do ácido araquidônico que são liberado pela  $PLA_2$  (Barlow *et al.*, 2000).

O mecanismo pelo qual os isoprotanos promovem vasorelaxamento permanece inexplorado, apesar de estarem envolvidos a receptores de prostanóides inibitórios. O envolvimento de receptores de prostanóides nas respostas de EDHF não tem sido testado, em parte devido à definição: EDHFs não são dependentes de metabólitos da COX e dessa forma não devem atuar através de receptores de prostanóides (Janssen, 2002).

Outra hipótese corrente é que a ativação de canais de potássio no endotélio por ação do EDHF e posterior hiperpolarização seriam conduzidas eletrotonicamente através de junções “gap” até o músculo liso vascular. As junções “gap” não somente unem células endoteliais a células endoteliais, e células do músculo liso a células do músculo liso, mas também unem células do músculo liso a células endoteliais, promovendo assim uma via de baixa resistência elétrica entre esses dois tipos celulares (Chris *et al.*, 1996). Um estudo tem sugerido que o número de junções “gap” mioendoteliais aumenta com a diminuição do calibre da artéria (Sandow e Hill, 2000), um achado que se compararia à mudança da importância da contribuição do EDHF para o controle do tônus vascular (Shimokawa *et al.*, 1996). Em vários leitos microcirculatórios, a ligação entre o fenômeno EDHF e a origem da corrente elétrica através das junções “gap” mioendoteliais tem sido estabelecida. Por exemplo, em arteríolas submucosas do intestino delgado de cobaio, a acetilcolina induz correntes externas, nas células endoteliais e nas células do músculo liso, que são bloqueadas pela combinação de caribdotoxina e apamina. Após a administração de bloqueadores de junções “gap”, a corrente induzida pela acetilcolina não alcança as células do músculo liso, o que sugere que os dois tipos celulares estão conectados eletricamente e formam um sincício funcional (Yamamoto *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2001). Em arteríolas e artérias do músculo retrator do hamster, medidas simultâneas do potencial de membrana das células endoteliais e das células do músculo liso mostraram que os sinais elétricos percorrem livremente e bidirecionalmente entre os dois tipos celulares. Estes sinais elétricos são associados com respostas vasomotoras, e uma hiperpolarização originada em uma única célula endotelial pode desenvolver

relaxamento das células do músculo liso através de um segmento arteriolar inteiro (Emerson e Segal, 2000; Emerson e Segal 2001). A ativação celular por um agonista facilita a comunicação em junções “gap” mioendoteliais devido a um acoplamento mais pronunciado ser observado em artérias estimuladas por acetilcolina do que em artérias nas quais tanto o músculo liso como as células endoteliais foram estimuladas por injeção de uma corrente negativa (Emerson e Segal, 2000).

Em vasos sanguíneos de maior calibre, a sugestão de que as respostas mediadas por EDHF requerem uma comunicação entre junções “gap” mioendoteliais é mais controversa. A especificidade dos inibidores das junções “gap” (carbenoxolona, ácido glicirético, halotano e heptanol) é frequentemente questionável. Em contraste, peptídeos com sequências similares à porção do alça extracelular das proteínas de conexão (também chamados “peptídeos gap” (e.g. GAP27) podem inibir a condução via junções “gap” (Chaytor *et al.*, 1998; Chaytor *et al.*, 2001). Apesar de tais peptídeos serem inibidores das junções “gap” mioendoteliais assumidos, este fato está meramente relacionado à habilidade destes peptídeos de reduzir o acoplamento sensível à coloração em cultura de células que expressam somente as conexinas 43 e 40 (Chaytor *et al.*, 2001). No entanto, o acoplamento elétrico entre as células endoteliais e as do músculo liso pode ser observado na ausência do acoplamento sensível à coloração (Coleman *et al.*, 2001). Além disso, a afirmação de que as junções “gap” estão atuando a nível das junções endoteliais poderia ser um erro. Por exemplo, na artéria coronária de suíno, a hiperpolarização endotélio-dependente induzida pela substância P pode ser reproduzida nas células do músculo liso situadas junto a camada íntima ou à camada adventícia. O peptídeo GAP27 inibe a hiperpolarização na camada mais externa, no entanto as respostas permanecem inalteradas na camada íntima, sugerindo que o músculo liso e não as junções “gap” mioendoteliais, são o alvo para este peptídeo (Edwards *et al.*, 2000). Claramente, existe a necessidade de mais informações a respeito da função das junções “gap” e de uma melhor compreensão do mecanismo de ação destes inibidores de junções “gap”.

Alternativamente as junções “gap” podem funcionar como um sítio privilegiado para a transferência de cargas elétricas ou para a transferência de uma molécula mensageira (e.g. EDHF). Em alguns leitos microcirculatórios, tais como o músculo retrator do hamster, uma corrente elétrica originada das células endoteliais para as

células do músculo liso parece estar relacionada com a explicação do fenômeno EDHF (Emerson e Segal, 2001). A possibilidade das junções “gap” facilitarem a difusão de um “fator hiperpolarizante”, tal como AMPc (Chaytor *et al.*, 2001), do endotélio para o músculo liso origina outras questões. Em primeiro lugar, se o AMPc for transferido de células endoteliais para o músculo liso a resposta total seria similar à produzida pela prostaciclina e deveria ser sensível a um inibidor de canais  $K_{ATP}$ . Em segundo lugar, qualquer “fator” transferido via junções “gap” teria que ser hidrofílico e deveria também ser ativamente regenerado devido ao fato de que uma significativa diluição do fator ocorreria do sítio de sua produção durante sua rápida distribuição através das camadas do músculo liso da parede vascular. Além disso, o AMPc deve exercer um papel na resposta do EDHF, especialmente envolvido na regulação dinâmica da comunicação na junção “gap” do que atuando como um EDHF *per se* (Popp *et al.*, 2002).

Neste sentido, uma consequência da abertura dos canais de  $K_{Ca}$  da célula endotelial é a acumulação de íons  $K^+$  no espaço intercelular entre as células endoteliais e as células do músculo liso. O efluxo de  $K^+$  através dos canais  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  poderia promover a hiperpolarização de miócitos pela ativação de  $K_{IR}$  (canais  $K^+$  retificadores de entrada) e/ou da enzima  $Na^+-K^+-ATPase$ . Em artérias hepáticas e mesentéricas de rato, a hiperpolarização endotélio-dependente é parcialmente inibida pela ouabaína (um inibidor da  $Na^+-K^+-ATPase$ ) e bário (em uma concentração que inibe seletivamente os canais  $K_{IR}$ ), e é abolida pela administração destes inibidores em conjunto (C). A manutenção da hiperpolarização da célula endotelial a despeito da abolição da hiperpolarização do músculo liso na presença de bário mais ouabaína indicam que estes inibidores atuam no músculo liso (Edwards *et al.*, 1998).

No entanto, a proposta de que o EDHF poderia simplesmente ser  $K^+$  derivado do endotélio tem sido refutada (Andersson *et al.*, 2000; Lacy *et al.*, 2000; Doughty *et al.*, 2000; Doughty *et al.*, 2001). Além disso, relaxamentos induzidos por  $K^+$  e hiperpolarizações não são observados em alguns vasos sanguíneos que exibem respostas mediadas por EDHF (Edwards *et al.*, 1999). Contudo, em muitos vasos, estas aparentes discrepâncias podem ser explicadas. A hipótese de  $K^+$  ser um EDHF tem sido estabelecida com base em experimentos eletrofisiológicos, onde as análises foram baseadas em experimentos medindo o tônus vascular. Em comparação com estudos eletrofisiológicos, reproduções de tensão são de mais difícil interpretação devido a

presença obrigatória de um agonista contrátil para a indução do tônus. A elevação da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pode resultar na difusão de  $\text{Ca}^{2+}$  através das junções “gap” mioendoteliais e assim influenciar em processos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula endotelial (Dora *et al.*, 1997). Experimentos nos quais foram medidos simultaneamente tanto tensão como potencial de membrana claramente demonstraram que a habilidade do  $\text{K}^+$  de causar hiperpolarização, e assim atuar como EDHF, diminui a medida que o nível da estimulação agonista-dependente aumenta (Dora e Garland, 2001).

Estes mecanismos não são mutuamente exclusivos e, em um dado vaso sanguíneo, eles podem ocorrer simultaneamente ou seqüencialmente e podem atuar sinergisticamente. A relativa proporção de cada mecanismo depende quase certamente de numerosos parâmetros incluindo o estado de ativação do músculo liso vascular, da densidade das junções “gap” mioendoteliais e do nível de expressão do citocromo P450 e de isoformas apropriadas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e/ou canais  $\text{K}_{\text{IR}}$ .

Por outro lado, a ativação da guanilato ciclase é provavelmente o mecanismo primário pelo qual o NO induz relaxamento do músculo liso vascular, apesar da possibilidade de outras proteínas alvo estarem envolvidas. Assim, o NO produz repolarização da despolarização induzida por agonista no músculo liso vascular de alguns vasos sanguíneos isolados, incluindo a artéria uterina de cobaio (Tare *et al.*, 1990). Na aorta de coelho os relaxamentos em resposta ao NO exógeno são resistentes ao inibidor da guanilato ciclase, azul de metileno (Bolotina *et al.*, 1994). Nestes vasos, NO ativa diretamente canais  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Bolotina *et al.*, 1994). Em artérias mesentéricas de rato, a hiperpolarização induzida pelo NO é prevenida pela glibenclamida, sugerindo o envolvimento de canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Garland e McPherson, 1992). No músculo liso vascular, uma elevação do  $\text{GMPc}$  (atuando através da proteína quinase G induz a ativação de canais  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Archer *et al.*, 1994), estimula a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmalemal (Popescu *et al.*, 1985) e diminui a sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Morgan e Morgan, 1984). No entanto, na maioria dos vasos sanguíneos nos quais o papel para o EDHF (em particular em artérias coronárias de caninos, suínos e humanos), NO exógeno não causa hiperpolarização do músculo liso vascular e hiperpolarizações endotélio-dependente não são afetadas por inibidores da NO sintase (Félétou e Vanhoutte, 1996; Garland *et al.*, 1995; Waldron *et al.*, 1996) ou pela oxihemoglobina (Mombouli *et al.*, 1992).

Além do NO, a produção de GMPc pode também ser aumentada por monóxido de carbono, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil (Schmidt, 1992) e estes mediadores poderiam também explicar alguns relaxamentos independentes de NO e prostaglandinas. Na artéria coronária, o ânion superóxido reage com células endoteliais para produzir um fator relaxante ainda não caracterizado, que não aumenta GMPc, mas ativa canais de  $K^+$  (Hong *et al.*, 1989). Em arteríolas cerebrais de ratos, radicais hidroxil mediam o relaxamento sensível à superóxido dismutase que é induzido pela bradicinina (Rosenblum, 1984). A catalase não afeta respostas mediadas por EDHF em artérias coronárias de suíno (Beny e von der Weid, 1991), o que exclui o envolvimento de peróxido de hidrogênio, apesar deste mediador ter uma potente ação hiperpolarizante no músculo liso vascular (Beny e von der Weid, 1991). Artérias pulmonares de suíno expressam heme oxigenase (Zakhary *et al.*, 1996). Um inibidor desta enzima, protoporfirina IX (agente bloqueador não-seletivo) (Ny *et al.*, 1995), previne os relaxamentos independentes de NO e prostaglandinas (Zakhary *et al.*, 1996). Nestes estudos, no entanto, a ação da oxihemoglobina, a qual remove o monóxido de carbono, não foi testada para confirmar a participação do monóxido de carbono. Da mesma forma, experimentos eletrofisiológicos não confirmaram se o monóxido de carbono hiperpolariza o músculo liso vascular. Consequentemente, a evidência do monóxido de carbono de ser um EDHF é fraca.

Em artérias carótida e coronária de cobaio, parte da hiperpolarização endotélio-dependente do músculo liso vascular é mediada por prostaciclina derivada do endotélio (Parkington *et al.*, 1993; Corriu *et al.*, 1996). Prostanóides vasodilatadores induzem relaxamento por indução da síntese de AMPc (Kukovetz *et al.*, 1979) a qual estimula a extrusão de  $Ca^{2+}$  do citosol (Raeymaekers *et al.*, 1990) e diminui a sensibilidade do aparato contrátil para o  $Ca^{2+}$  (Morgan e Morgan, 1984). AMPc também induz a ativação de canais  $K_{ATP}$ , e a hiperpolarização induzida pela prostaciclina (como as evocadas por outros ativadores da adenilato ciclase) é antagonizada pelas glibenclamida (Siegel *et al.*, 1989; Nakashima e Vanhoutte, 1995). No entanto, na maioria dos casos, a hiperpolarização endotélio-dependente do músculo liso vascular é resistente à inibição da síntese de prostaglandinas (Mombouli e Vanhoutte, 1997)

Além do NO, a produção de GMPc pode também ser aumentada por monóxido de carbono, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil (Schmidt, 1992) e estes mediadores poderiam também explicar alguns relaxamentos independentes de NO e prostaglandinas. Na artéria coronária, o ânion superóxido reage com células endoteliais para produzir um fator relaxante ainda não caracterizado, que não aumenta GMPc, mas ativa canais de  $K^+$  (Hong *et al.*, 1989). Em arteríolas cerebrais de ratos, radicais hidroxil mediam o relaxamento sensível à superóxido dismutase que é induzido pela bradicinina (Rosenblum, 1984). A catalase não afeta respostas mediadas por EDHF em artérias coronárias de suíno (Beny e von der Weid, 1991), o que exclui o envolvimento de peróxido de hidrogênio, apesar deste mediador ter uma potente ação hiperpolarizante no músculo liso vascular (Beny e von der Weid, 1991). Artérias pulmonares de suíno expressam heme oxigenase (Zakhary *et al.*, 1996). Um inibidor desta enzima, protoporfirina IX (agente bloqueador não-seletivo) (Ny *et al.*, 1995), previne os relaxamentos independentes de NO e prostaglandinas (Zakhary *et al.*, 1996). Nestes estudos, no entanto, a ação da oxihemoglobina, a qual remove o monóxido de carbono, não foi testada para confirmar a participação do monóxido de carbono. Da mesma forma, experimentos eletrofisiológicos não confirmaram se o monóxido de carbono hiperpolariza o músculo liso vascular. Conseqüentemente, a evidência do monóxido de carbono de ser um EDHF é fraca.

Em artérias carótida e coronária de cobaio, parte da hiperpolarização endotélio-dependente do músculo liso vascular é mediada por prostaciclina derivada do endotélio (Parkington *et al.*, 1993; Corriu *et al.*, 1996). Prostanóides vasodilatadores induzem relaxamento por indução da síntese de AMPc (Kukovetz *et al.*, 1979) a qual estimula a extrusão de  $Ca^{2+}$  do citosol (Raeymaekers *et al.*, 1990) e diminui a sensibilidade do aparato contrátil para o  $Ca^{2+}$  (Morgan e Morgan, 1984). AMPc também induz a ativação de canais  $K_{ATP}$ , e a hiperpolarização induzida pela prostaciclina (como as evocadas por outros ativadores da adenilato ciclase) é antagonizada pelas glibenclamida (Siegel *et al.*, 1989; Nakashima e Vanhoutte, 1995). No entanto, na maioria dos casos, a hiperpolarização endotélio-dependente do músculo liso vascular é resistente à inibição da síntese de prostaglandinas (Mombouli e Vanhoutte, 1997)

Outra molécula que tem sido implicada como um provável EDHF é o peptídeo natriurético do tipo C (CNP, do inglês *C-type natriuretic peptide*). O CN é membro da família de peptídeos natriuréticos e tem homologia estrutural tanto com os peptídeos natriuréticos atrial (ANP) como com o peptídeo natriurético cerebral (BNP). CNP é o peptídeo natriurético mais conservado entre as espécies com 100% de homologia entre o peptídeo humano, bovino, suíno, ovino e de roedores (Suzuki *et al.*, 2001). O CNP foi primeiramente isolado do cérebro de suínos (Sudoh *et al.*, 1990), mas tem sido identificado em vários tipos celulares incluindo nervos, monócitos, células endoteliais, rim e tem sido identificada também no plasma sanguíneo (Chen e Burnett, 1998). Este peptídeo é liberado das células endoteliais em resposta a citocinas e agonistas endotélio-dependentes, como a acetilcolina (Suga *et al.*, 1992). Ademais os níveis circulantes deste peptídeo estão aumentados na sepse (Hama *et al.*, 1994). CNP exerce uma variedade de efeitos cardiovasculares incluindo vasodilatação de veias e artérias, é anti-mitogênico e inibe o sistema renina-angiotensina. Este peptídeo também reduz a pressão diastólica final cardíaca e o débito cardíaco, secundário ao vasorelaxamento e diminuição do retorno venoso (Chen e Burnett, 1998).

Existe uma evidência de que CNP causa hiperpolarização das membranas das células do músculo liso vascular, e relaxamento de uma maneira GMPc-dependente. Além disso em vários tipos diferentes de artérias, particularmente os vasos de resistência de menor calibre, o vasorelaxamento induzido por CNP é sensível a uma variedade de bloqueadores de canais de  $K^+$  (Suzuki *et al.*, 2001). Recentemente, Chauhan e colaboradores (2003) demonstraram que a hiperpolarização induzida no músculo liso vascular de artérias de resistência, por CNP pode ser atenuada em presença de alta concentração de  $K^+$  e uma combinação de bário e ouabaína (bloqueadores dos canais  $K_{IR}$  e  $Na^+/K^+$  ATP ase, respectivamente), o mesmo ocorre com a hiperpolarização induzida pela acetilcolina. Sugerindo uma via que é independente da guanilato ciclase e pode significar uma atividade biológica similar ao EDHF para o CNP. Em adição, uma evidência conclusiva demonstrando que o CNP é um EDHF, foi demonstrada pela observação de que o relaxamento induzido pela acetilcolina foi associado com a liberação de CNP derivado do endotélio, medido por radioimunoensaio e esta liberação foi bloqueada na ausência do endotélio (Chauhan *et al.*, 2003).



Desta maneira, o número de mediadores putativos para os efeitos do EDHF parece crescer a cada ano e um consenso parece improvável. Na realidade parece que todos estes fenômenos coexistem e sua importância relativa é que resta a ser determinada.

No entanto, a hiperpolarização mediada por EDHF envolve o aumento da condutância ao potássio. A amplitude da hiperpolarização é inversamente relacionada às concentrações de potássio extracelulares e são completamente bloqueadas quando as concentrações de potássio extracelular são maiores que 25 mM (Chen e Suzuki, 1989; Jagao e Vanhoutte, 1993a,b; Corriu *et al.*, 1996a). Portanto, o uso de soluções nutritivas com concentrações de potássio acima de 25 mM podem ser utilizadas para escartar a participação deste mediador nos fenômenos estudados.

As células endoteliais liberam diferentes substâncias vasoativas que regulam o tônus das células do músculo liso vascular subjacente. Dependendo do vaso sanguíneo estudado, o óxido nítrico, prostaciclina, ácidos eicosatetraenóicos e EDHF (o qual não foi formalmente identificado ainda) podem agir como mediadores hiperpolarizantes derivados do endotélio. O termo EDHF deve ser restringido para descrever fenômenos nos quais a hiperpolarização endotélio-dependente são insensíveis a glibenclamida e resistentes também a inibidores da NO sintases e ciclooxigenases (Léauté-Vanhoutte e Vanhoutte, 1996).

A identificação do EDHF e/ou a descoberta de inibidores específicos de sua síntese e/ou de suas ações pode permitir um melhor entendimento de seu papel fisiológico e fisiopatológico.

Neste sentido, o endotélio é um importante modulador do tônus e reatividade do músculo liso vascular (Furchgott e Zawadzi, 1980), e existe um consenso generalizado de que a disfunção endotelial pode contribuir para complicações vasculares do *diabetes mellitus* (De Vriese *et al.*, 2000). No entanto, o que ainda não está totalmente estabelecido é quais leitos vasculares ou quais fatores endoteliais podem ser implicados na disfunção. Kiff e colaboradores, por exemplo, demonstraram que apesar do efeito vasodilatador endotélio-dependente e endotélio-independente na pressão arterial em ratos diabéticos não anestesiados está normal quando comparada com euglicêmicos,

a resposta destes agonistas varia em diferentes leitos vasculares quando estudados isoladamente (Kiff *et al.*, 1991). Tais diferenças refletem, pelo menos em parte, diferenças na contribuição de vários fatores relaxantes derivados do endotélio em diferentes leitos vasculares (Nagao, Illiano e Vanhoutte, 1992; Zygmunt, Ryman e Högestätt, 1995). Por exemplo, o relaxamento endotélio-dependente à acetilcolina na artéria femoral é quase que totalmente dependente de óxido nítrico, enquanto outro fator relaxante derivado do endotélio, principalmente o EDHF, tem um papel importante na artéria mesentérica (Zygmunt, Ryman e Högestätt, 1995). Apesar da maioria dos estudos sobre disfunção endotelial na diabetes focar o óxido nítrico, Taylor e colaboradores (Taylor, Graves e Poston, 1995) demonstraram um bloqueio no componente relaxante resistente a bloqueadores da síntese de NO e prostaciclina, induzido pela acetilcolina nas artérias mesentéricas de ratos diabéticos. Adicionalmente, a hiperpolarização atribuída ao EDHF nesta artéria está reduzida em ratos diabéticos (Fukao *et al.*, 1997). Neste trabalho, de Fukao e colaboradores, o potencial transmembrana foi estudado na ausência de contração e despolarização e demonstraram bloqueio do EDHF no curso da diabetes. De maneira semelhante, Wigg e cols. (2001), demonstraram um bloqueio do relaxamento endotélio-dependente nas artérias mesentéricas de ratos diabéticos, o qual foi atribuído a uma redução na resposta dependente de EDHF mais do que da resposta dependente de óxido nítrico (Wigg *et al.*, 2001).

### **1.3. Diabetes e Disfunção Endotelial**

#### **1.3.1. Generalidades**

A concentração plasmática de glicose permanece entre os limites estreitos de 4 a 7 mM (72 – 126 mg/dL) em indivíduos normais, excluindo o período pós-prandial e o de jejum. Este controle é governado pelo balanço entre absorção de glicose pelo intestino, produção pelo fígado, e captação e metabolismo pelos tecidos periféricos. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e tecido adiposo (TA), e inibe a produção de glicose hepática, assim tem o papel de regulador primário da concentração sanguínea de glicose. A insulina também estimula o crescimento e diferenciação celular, e promove a estocagem de substratos no TA, fígado e músculo por estimular a lipogênese, síntese proteica e de glicogênio, e inibir a lipólise, glicogenólise e lise

proteica. Resistência ou deficiência insulínica resulta na profunda desregulação desses processos, e produz elevação dos níveis pós-prandiais e no jejum, de glicose e lipídio.

A insulina aumenta a captação de glicose pelas células por estimular a translocação do transportador de glicose GLUT4 dos sítios intracelulares para a superfície da célula. Mais de 75% da glicose destina-se, em tecidos insulino-dependentes, ao músculo esquelético, enquanto TA participa apenas com uma pequena fração (Klip e Paquet, 1990). Apesar disso, camundongos desprovidos geneticamente do receptor para insulina no músculo têm tolerância normal à glicose (Bruning, *et al.*, 1998), no entanto aqueles desprovidos do transportador de glicose sensível a insulina no TA têm tolerância a glicose diminuída, aparentemente devido à resistência insulínica induzida no músculo e fígado (Abel, *et al.*, 2001). Tanto obesidade como lipodistrofia também causam resistência insulínica e predisposição à diabetes tipo 2, demonstrando que o TA é crucial na regulação do metabolismo além de sua habilidade de captar glicose (Gavrilova, *et al.*, 2000). Apesar da insulina não estimular a captação de glicose no fígado, bloqueia a glicogenólise e gliconeogênese, e estimula a síntese de glicogênio, regulando assim os níveis de glicose durante o jejum. A ação da insulina em tecidos normalmente considerados insensíveis à insulina, incluindo cérebro e células  $\beta$  do pâncreas, podem também ter papel importante na homeostase da glicose (Bruning, *et al.*, 1998; Kulkarni, *et al.*, 1999 a e b).

Por outro lado, o *Diabetes mellitus* é um grupo de doenças de caráter crônico caracterizadas por altas concentrações de glicose sanguínea resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Existem duas formas principais de diabetes: Diabetes do tipo 1, também chamada de insulino-dependente ou *diabetes* juvenil, resulta primariamente de uma deficiência absoluta de insulina devido destruição mediada pelo sistema imune das células  $\beta$  pancreáticas. Pacientes com *diabetes* do tipo 1 devem receber insulina exógena para sobreviver (Atkinson e Eisenbarth, 2001). Outra forma chamada de diabetes não-insulino dependente ou tipo 2 se caracteriza por resistência insulínica, principalmente nos músculos esqueléticos e gordura que é acompanhada por mecanismos compensatórios que são ativados nas células  $\beta$  para secretar mais insulina que não são suficientes para manter a glicose sanguínea em níveis fisiológicos (Cavaghan, Erhmann e Polonski, 2000). Além do mais a diabetes do tipo 2 tem várias

apresentações clínicas as quais são caracterizadas por graus variáveis de resistência insulínica e disfunção das células  $\beta$  (Bell e Polonski, 2001). Em cada extremo deste espectro de apresentações estão desordens genéticas que afetam a habilidade das células  $\beta$  pancreáticas de secretar insulina (Fajans, Bell e Polonski, 2001; Owen e Hattersley, 2001) ou a habilidade do músculo esquelético, tecido gorduroso e células hepáticas de responder às ações da insulina (Taylor e Arioglu, 1999; Barroso *et al.*, 1999).

Mudanças profundas no ambiente de vivência do homem, no comportamento humano e no seu estilo de vida, acompanharam os processo de globalização, e estas mudanças tem resultado em taxas aumentadas de *diabetes* e obesidade (Zimmet, Alberti e Shaw, 2001).

A frequência da diabetes do tipo 1 na população relativa a *diabetes* do tipo 2, que representa mais de noventa por cento dos casos no mundo, é baixa. A *diabetes* do tipo 2, também chamada insulino-independente ou *diabetes* da senescência, é caracterizada por resistência insulínica e/ou insuficiência pancreática com baixa taxa de secreção de insulina, uma das quais pode ser predominante. Pacientes com *diabetes* do tipo 2 não dependem da administração de insulina para sobreviver, mas podem requerer administrações agudas para controlar os níveis glicêmicos se isto não for obtido com associação de dieta e exercícios físicos sozinhos ou em conjunto com hipoglicemiantes orais (Bell e Polonski, 2001).

A abordagem da *diabetes* como epidemia diz respeito particularmente ao tipo 2 da doença e reflete grande número de paciente diagnosticados/ano tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Paradoxicalmente, parte do problema está relacionado às conquistas obtidas na saúde pública durante o século vinte, com aumento da expectativa de vida devido principalmente à eliminação de muitas doenças comunicantes (que podem ser transmitidas horizontal ou verticalmente por vetores humanos ou animais). As doenças não comunicantes, como *diabetes* e doenças cardiovasculares tem se tornado o maior desafio para a saúde pública do século 21, como um resultado de seu impacto na saúde dos pacientes com morbidade e mortalidade prematuras e por ser líder em diversos países de mortalidade por causas associadas (Zimmet, Alberti e Shaw, 2001).

A estimativa global de pacientes diabéticos no mundo é de cerca de 150 milhões de indivíduos e deve crescer para 220 milhões em 2010 e 300 milhões em 2025 (Amos, Accarthy e Zimmet, 1997; King, Aubert e Herman, 1998).

A *diabetes* é associada com complicações sérias como doença coronariana, doenças vasculares cerebrais, doença renal terminal, cegueira e amputações nos membros inferiores (Albright, 2000). No entanto, a maioria destas seqüelas pode ser retardada ou prevenida através da rápida detecção e tratamento. Um grande estudo clínico conduzido pelo instituto de pesquisa americano de *Diabetes*, doenças digestivas e renais (NIDDK) demonstrou que a manutenção dos níveis glicêmicos tão próximos do normal quanto possível retarda o início e a progressão da retinopatia (76% de redução de risco), nefropatia (50% de redução do risco) e neuropatia (60% de redução do risco) (NIDDK, 1994).

Apesar disto, a mortalidade e morbidade associada ao *diabetes* estão entre as maiores, e de acordo com dados demográficos publicados recentemente, estão aumentando, enquanto a mortalidade por complicações cardiovasculares em geral estão diminuindo (Novak, 1999). Por exemplo, em relação a morbidade, a retinopatia diabética é a causa líder de cegueira em países ocidentais e só na Alemanha é responsável por aproximadamente 6000 a 10000 novos casos de cegueira por ano (Graf, Ibach e Kaufmann, 1999; Krumpaszky *et al.*, 1999; Trautner *et al.*, 2001).

Krop (1999) relata que os custos totais para o sistema de saúde e impacto econômico provocado pela *diabetes* ultrapassa os US\$ 90 bilhões/ano. Estes incluem custos médicos diretos de aproximadamente US\$ 44 bilhões para cuidados médicos, hospitalizações e material auxiliar necessário para o tratamento, e custos indiretos de aproximadamente 54 bilhões de dólares para pagamentos por aposentadorias precoces, custos de licença para tratamento e morte prematura.

O determinante do dano vascular no diabetes é a hiperglicemia crônica tanto no tipo 1 quanto no tipo 2 da doença (*The Diabetes Control and Complications Trial Research Group-DCCT, 1993; UK Prospective Diabetes Study Group, 1998*). Por exemplo, foi demonstrado no DCCT que cada percentual de aumento no nível de hemoglobina glicada está relacionado positivamente com risco de desenvolvimento de complicações macro e microvasculares. Assim, se um paciente tem uma média de

hemoglobina glicada de 6 %, seu risco relativo de desenvolver retinopatia dentro de cinco anos é 1. Em contraste, um paciente que tem um nível de hemoglobina glicada de 12 % tem um risco relativo de 20 de desenvolver o mesmo tipo de complicação.

Por outro lado, uma grande soma de evidências apontam a disfunção do endotélio como a causa primária da aterosclerose (Lusis, 2000). Este fenômeno é de particular relevância para pacientes diabéticos, uma vez que aterosclerose mostra um curso acelerado nestes pacientes e é determinante principal de mortalidade, principalmente no diabetes do tipo 2. Um fator contribuinte para a disfunção endotelial no diabetes é um aumento no estresse de cisalhamento induzido pelo incremento na pressão arterial em combinação com resistência insulínica e hiperglicemia. A diminuição da produção endotelial de óxido nítrico, em conjunto com sinais proliferativos para as células do músculo liso vascular através da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) são eventos posteriores (Hammes, 2003). Os níveis altos de glicose inibindo a produção de óxido nítrico contribui para os elevados níveis de moléculas antifibrinolíticas/protrombóticas como o inibidor de ativador de plasminogênio (Du *et al.*, 2000; Hsueh e Law, 1998; Williams *et al.*, 1998).

A resistência insulínica e a hiperglicemia estão frequentemente associadas a com a dislipidemia diabética (Hammes, 2003).

A ligação entre hiperglicemia e dano na célula endotelial no diabetes tem sido estudado intensivamente nos últimos 20 anos. Bioquimicamente, quatro vias independentes foram investigadas: aumento na via dos polióis, aumento na formação de produtos de glicosilação avançada (AGEs), ativação da proteína quinase C (PKC) e aumento na via das hexosaminas. Uma superprodução de espécies reativas de oxigênio foi recentemente identificada como a alteração bioquímica subjacente à disfunção endotelial, a qual é não apenas o denominador comum destes quatro mecanismos, aparentemente não relacionados, mas também um ponto de convergência para a idealização de novos compostos anti-angiopáticos no tratamento da diabetes (Brownlee, 2001; Nishikawa *et al.*, 2000). Estes mecanismos são discutidos a seguir.

### **1.3.2. Complicações da Diabetes: Mecanismos Bioquímicos**

Todas as formas de *diabetes* são caracterizadas pelo desenvolvimento de microangiopatia na retina, no glomérulo renal e nervos periféricos. Como consequência desta patologia na microvasculatura, a *diabetes* é uma das causas principais de cegueira, doença renal terminal e uma grande variedade de neuropatias debilitantes. A *diabetes* está também associada com doença aterosclerótica macrovascular afetando as artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores. Como resultado disto, pacientes diabéticos tem maior risco de infarto do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais e amputação nos membros inferiores. Hiperglicemia e resistência insulínica tem ambos papéis importantes no desenvolvimento das complicações macrovasculares (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998; Wei *et al.*, 1998; Ebara *et al.*, 2000; Ginsberg, 2000).

A microangiopatia diabética na retina, glomérulo e *vasa nervorum* tem características patofisiológicas similares. Cedo no curso da *diabetes*, a hiperglicemia intracelular causa anormalidades no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular aumentada. Estes efeitos refletem a atividade diminuída de vasodilatadores como o óxido nítrico, aumento na atividade de vasoconstritores como a angiotensina II e endotelina-1, e síntese de fatores que aumentam a permeabilidade como o fator de crescimento endotelial (VEGF). Anormalidades quantitativas e qualitativas da matrix extracelular contribui para um aumento irreversível na permeabilidade vascular. Há aumento da perda celular por apoptose e progressiva oclusão capilar devido tanto a grande produção de matrix extracelular induzidos por fatores de crescimento como o fator de transformação  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e à deposição de proteínas plasmáticas extravasadas. A hiperglicemia diminui também a produção de fatores tróficos para o endotélio e células neuronais. Em conjunto, essas mudanças podem levar a edema, isquemia e neovascularização induzida por hipóxia na retina; proteinúria, expansão da matrix das células mesangiais e glomerulosclerose no rim e degeneração multifocal axonal em nervos periféricos.

Nas artérias, a disfunção endotelial precede as alterações da macrovasculatura que levam a aterosclerose. A disfunção cursa com diminuição da produção de óxido nítrico, molécula com atividade antiaterogênica, com conseqüente aumento da proliferação do músculo liso vascular e aumento da produção do inibidor do ativador de



plasminogênio 1 (Hsueh e Law, 1998). A alta concentração de glicose plasmática também induz níveis aumentados de apolipoproteínas B contendo colesterol oxidado.

A característica que distingue as células que são lesadas por conta da hiperglicemia é ausência de processos de regulação decrescente do transportador de glicose quando as concentrações de glicose extracelular estão elevadas. A hiperglicemia intracelular parece ser o determinante principal do dano no tecido diabético. Por exemplo, células do músculo liso vascular que não foram danificadas pela hiperglicemia mostram uma relação inversa entre as concentrações de glicose e transporte da glicose em contraste com as células endoteliais, um alvo principal do dano hiperglicêmico, que não demonstra diminuição do transporte de glicose em situações de concentração elevada de glicose no meio extracelular (Giardino, Edelstein e Brownlee, 1996). A hiperglicemia intracelular causa dano tecidual por mecanismos que podem ser agrupados em duas categorias. Uma categoria de mecanismos envolve mudanças agudas repetidas no metabolismo celular que são reversíveis quando a euglicemia é restaurada. Outra categoria envolve mudanças cumulativas em macromoléculas de longa existência que persistem após restauração dos níveis glicêmicos. Estes mecanismos são influenciados por determinantes genéticos de susceptibilidade ou resistência ao dano hiperglicêmico (Brownlee, 2001).

Existem quatro teorias principais, bem documentadas, que explicam como hiperglicemia pode causar as alterações celulares que levam a micro e macroangiopatia diabéticas. Estas teorias geraram quantidade extensiva de dados científicos, assim como vários testes clínicos utilizando inibidores destes mecanismos. Estas teorias são: 1- Aumento das taxas de atividade da enzima aldose redutase (teoria da via dos polióis); 2- aumento da produção de produtos de glicosilação avançada (AGEs); 3-ativação desregulada de isoformas de proteína quinase C (PKC) e 4- aumento das taxas de atividade da glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT), enzima limitante da conversão de glicose em glicosamina (via das hexosaminas). Todas estas vias foram recentemente associadas a um único mecanismo comum: superprodução mitocondrial de superóxido e outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Brownlee, 2001).

### **1.3.3. Teoria do incremento da via da aldose redutase (via dos polióis)**

A aldose redutase (alditol:NAD (P)<sup>+</sup> 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.21) é a primeira enzima da via dos polióis. Trata-se de uma oxidoreductase citosólica, monomérica que catalisa a redução NADPH-dependente de uma grande variedade de compostos contendo carbonila incluindo glicose. No entanto, a esta enzima tem baixa afinidade (alto  $K_m$ ) por glicose, e em concentrações normais de glicose, encontrada em normoglicêmicos, o metabolismo da glicose por esta via representa uma percentagem muito baixa do destino da glicose. Contudo, num ambiente hiperglicêmico, o aumento das concentrações de glicose intracelulares resulta em um aumento da conversão enzimática da glicose no poli-alcóol, sorbitol, com concomitante diminuição dos níveis de NADPH. Na via dos polióis, o sorbitol é oxidado a frutose pela enzima sorbitol desidrogenase, com NAD<sup>+</sup> reduzido a NADPH. O fluxo através desta via durante hiperglicemia varia de 33% do consumo total da glicose na retina de coelho a 11% no eritrócito humano (González *et al.*, 1984). Portanto, a contribuição desta via às complicações da diabetes podem ser muito mais espécie, sítio e tecido dependente (Yabe-Nishimura, 1998, Brownlee, 2001).

Uma série de mecanismos tem sido propostos para explicar os potenciais efeitos deletérios do incremento da via dos polióis induzido pela hiperglicemia. No cristalino ocular, a acumulação de polióis induz tumescência hiperosmótica e dano da membrana celular, resultando em extravasamento de aminoácidos, glutatona e mioinositol provocando o surgimento de catarata (Nagata *et al.*, 1989). As concentrações de sorbitol, que se difunde pobremente através da membrana, medida em vasos e nervos diabéticos são, no entanto, muito baixas para causar dano hiperosmótico (Brownlee, 2001). O fluxo aumentado da glicose na via dos polióis e conseqüente gasto de cofatores da aldose redutase (NADPH) e sorbitol desidrogenase (NAD<sup>+</sup>) leva a uma mudança no estado redox e uma cascata de desarranjas metabólicos interrelacionados (Yabe-Nishimura, 1998). Mais, recentemente, tem sido proposto que a oxidação do sorbitol pelo NAD<sup>+</sup> aumenta a taxa citosólica de NADH:NAD<sup>+</sup>, e conseqüentemente inibindo a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase culminando com aumento das concentrações de metilgloxal, um precursor de produtos de glicosilação avançada (AGEs) e diacilglicerol (DAG), portanto levando a ativação de proteína quinase C (PKC) (Williamson *et al.*, 1990). Apesar da hiperglicemia aumentar a taxa NADH:NAD<sup>+</sup> em células endoteliais, este fenômeno reflete uma marcada diminuição na concentração absoluta de NAD<sup>+</sup> como resultado do consumo pela ativação da poli

(ADP-ribose) polimerase (PARP) por radicais livres (Garcia Soriano, 2001). Tem sido também proposto que o incremento da via dos polióis com a redução de glicose a sorbitol consome o NADPH e como este cofator é também requerido no ciclo redox da glutatona reduzida (GSH) o que pode induzir ou exacerbar o estresse oxidativo (Brownlee, 2001). Níveis diminuídos de GSH tem sido encontrados no cristalino em camundongos transgênicos que tem a expressão de aldose redutase aumentada (Lee e Chung, 1999) e em camundongos “knockout” homozigóticos para esta enzima, em contraste com o controle não transgênico, o diabetes não diminuiu a concentração de GSH do nervo ciático e nem a velocidade de condução do mesmo.

Estudos da inibição da via dos polióis *in vivo* tem dado resultados inconsistentes. Em um estudo de 5 anos em cães, a inibição da aldose redutase previniu a neuropatia diabética, no entanto falhou em prevenir a retinopatia ou engrossamento da membrana basal dos capilares na retina, rins e músculo esquelético (Engerman, Kern e Larson, 1994). Vários testes clínicos com resultados negativos tem questionado a relevância deste mecanismo em humanos (Sorbinil Retinopathy Trial Research Group, 1990). O efeito positivo da inibição da aldose redutase na neuropatia diabética foi, contudo, confirmada em humanos em um rigoroso ensaio clínico multi-dose, controlado com placebo utilizando o potente inibidor zenarestat (Greene, Arezzo e Brown, 1999).

Mais recentemente, Akamine e colaboradores (2003), utilizando técnica de microscopia intravital demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos por via oral com um inibidor da aldose redutase, minalrestat, é capaz de prevenir a disfunção endotelial nas arteríolas mesentéricas.

#### 1.3.4. Formação aumentada de produtos de glicosilação avançada (AGEs)

A glicação não enzimática de grupos amínicos primários, como os que ocorrem em proteínas e outras moléculas, como apolipoproteína B, por açúcares redutores formando produtos estáveis é uma reação há muito conhecida. A primeira descrição deste processo foi a do químico francês Louis Camil Maillard, que em 1912 relatou a formação de produtos amarelo-amarronzados após aquecer uma mistura de aminoácidos e açúcares (Maillard, 1912). A adição enzimática de açúcares a proteínas é chamada glicosilação, enquanto a adição não enzimática de açúcares redutores é chamada

glicação (Kikuchi *et al.*, 2003). No entanto, estes termos não são estritamente diferenciados e glicosilação é algumas vezes utilizada para referir tanto a adição de açúcar enzimática quanto a não-enzimática. Uma vez que a glicação é acompanhada de oxidação, terminologias como glicoxidação ou produtos de glicoxidação são também utilizados. De maneira geral, a glicação acontece sob estresse oxidativo e uma grande quantidade de espécies reativas é formada através da glicação (Hunt, Dean e Wolff, 1988; Sakurai e Tsuchiya, 1988; Mullarkey, Eldestein e Brownlee, 1990; Dan *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995; Kaneto *et al.*, 1996).

Os produtos de glicação se acumulam *in vivo* com a senescência e em taxa mais acelerada no diabetes. Nos estágios iniciais desta reação, também chamada de glicação não enzimática, um intermediário reversível, base de Schiff, se forma e a reação atinge equilíbrio após um período de várias horas (Njoroge e Monnier, 1989; Ledl e Schliecher, 1990; Bucala e Cerami, 1992). A base de Schiff então sofre um rearranjo intramolecular característico formando produtos estáveis, chamados produtos de Amadori (Bucala e Vlassara, 1995). A quantidade de substrato glicosilado varia diretamente com a concentração de glicose no meio e com a taxa de “turnover” da molécula contendo a amina modificada quimicamente. Este princípio forma a base para o ensaio da hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>), que mede o conteúdo de produtos de Amadori presente na valina N-terminal da cadeia  $\beta$  da hemoglobina. Uma vez que o eritrócito é altamente permeável à glicose sanguínea e que o produto de Amadori é muito estável, o conteúdo de hemoglobina glicada é um indicativo da exposição cumulativa da hemoglobina a altas concentrações de glicose durante o período de 3-4 semanas, requerido para a reação atingir o equilíbrio (Koenig *et al.*, 1976). A taxa de formação e degradação da base de Schiff e intermediários de Amadori é fixa, no entanto, e uma vez que o equilíbrio é atingido em uma proteína de meia-vida longa, a concentração absoluta de produtos de Amadori não aumenta com o tempo. Esta limitação cinética explica porque os níveis de produtos de Amadori nunca excedem 2,5-3 vezes de incremento quando tecidos diabéticos são comparados com tecidos não diabéticos. Mesmo com tratamento intensivo com insulina, por exemplo, as variações glicêmicas de um paciente diabéticos não se comparam aos níveis precisamente controlados de indivíduos com células  $\beta$  pancreáticas funcionais. Portanto, as concentrações teciduais de produtos iniciais das reações de glicação não enzimática permanecem aumentadas, mesmo em pacientes diabéticos com bom controle glicêmico.

No entanto, a medida quantitativa de produtos iniciais de glicação avançada, como o teste da HbA<sub>1c</sub>, permanecem úteis como medidas objetivas do controle glicêmico a longo prazo de pacientes diabéticos ( Koenig *et al.*, 1976; Larsen, Horder e Mogensen, 1990). De maior significância é o fato de que estes produtos iniciais de glicosilação são os precursores diretos de um grupo de produtos que se formam mais lentamente chamados de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs-do inglês, advanced glycosylation end products) (Njoroge e Monnier, 1989; Ledl e Schliecher, 1990; Bucala e Cerami, 1992). Os produtos finais de glicosilação avançada surgem após o rearranjo lento, desidratação e condensação de produtos de Amadori formando moléculas irreversivelmente ligadas que persistem por toda a vida da proteína ou molécula contendo grupamento amínico alvo. Estes produtos possuem propriedades de absorvância e fluorescência distintas, ou seja, podem ser identificados e quantificados independentemente, e essencialmente, têm a capacidade de gerar ligações cruzadas de grupamentos amínicos entre si (Bucala e Vlassara, 1995).

A citotoxicidade da glicação resulta da inibição ou diminuição de funções específicas das proteínas glicadas, ligações cruzadas, agregação e precipitação de proteínas e produção de espécies reativas de oxigênio (Kikuchi *et al.*, 2003).

Estes produtos finais de glicosilação tem sido encontrados em quantidades aumentadas no glomérulo renal e vasos da retina de diabéticos (Stitt *et al.*, 1997; Horie, K *et al.*, 1997). Originalmente, pensou-se que estes compostos surgiam da reação entre proteínas extracelulares e glicose. No entanto, a taxa de formação de AGEs a partir da glicose é várias ordens de magnitude mais lenta que a taxa de formação de AGEs a partir de precursores dicarbonila derivados da glicose gerados intracelularmente, e parece que a hiperglicemia intracelular é o evento primário iniciador na formação tanto dos AGEs intracelulares como dos extracelulares (Degenhardt, Thorpe e Baynes, 1998). Intermediários da glicação com duas carbonilas (p.ex., glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona) são de grande importância para a citotoxicidade uma vez que causam ligações cruzadas entre proteínas. Estas ligações são muito estáveis e formam agregados, os quais são depósitos resistentes às protease e proteasoma, consequentemente inibindo o transporte intracelular. AGEs podem originar-se da auto-oxidação intracelular da glicose para formar glioxal (Wells-Knecht, *et al.*, 1995), decomposição dos produtos de Amadori para formar 3-deoxiglicosona e fragmentação

do gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato para formar metil-glioxal (Thornalley, 1990). Estas dicarbonilas reativas intracelulares (glioxal, 3-deoxiglicosona e metil-glioxal) reagem com grupamentos amínicos tanto de proteínas intracelulares como extracelulares para formar AGEs (Brownlee, 2001).

A potencial importância dos AGEs na patogênese das complicações diabéticas é indicada pela observação em modelos animais que dois inibidores, de estrutura química não relacionada, da formação de AGEs preveniram parcialmente várias manifestações funcionais e estruturais da microangiopatia diabética na retina, rim e nervo (Hammes *et al.*, 1991, Soulis-Liparota *et al.*, 1995).

A produção intracelular de precursores de AGEs danifica as células-alvo por três mecanismos gerais: primeiro, as proteínas intracelulares modificadas tem função alterada. Segundo, componentes da matrix extracelular modificados interagem anormalmente com outros componentes da matriz e com receptores de outras células (integrinas) para componentes da matrix. Terceiro, as proteínas plasmáticas modificadas ligam-se a receptores para AGEs (RAGEs) nas células endoteliais, mesangiais e macrófagos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (Brownlee, 2001). Ademais a ligação dos AGEs com seus receptores ativa o fator de transcrição pleiotrópico, NF- $\kappa$ B, causando mudanças patológicas na expressão gênica.

Em células endoteliais expostas a alta concentração de glicose, a formação intracelular de AGEs ocorre dentro de uma semana. O fator de crescimento de fibroblastos é uma das principais proteínas modificadas por AGEs nas células endoteliais (Giardino, Eldestein, Brownlee, 1994). Proteínas envolvidas na endocitose de macromoléculas são também modificadas por AGEs, uma vez que o aumento da endocitose induzida pela hiperglicemia é prevenida pela superexpressão da enzima detoxificadora de metilglioxal, glioxalase I (Shinohara *et al.*, 1998).

A formação de AGEs altera as propriedades funcionais de várias moléculas importantes da matriz. As ligações cruzadas intermoleculares de colágeno do tipo I como consequência da interação com AGEs diminuem a elasticidade de vasos de grande calibre de ratos diabéticos, mesmo quando o tônus vascular é abolido, e aumentam a filtração de fluido através da artéria carótida (Huijberts *et al.*, 1993).

Os receptores de AGEs identificados parecem mediar os efeitos a longo prazo destas moléculas em alvos celulares-chaves afetados pelo diabetes como macrófagos, células mesangiais glomerulares e células endoteliais vasculares. Estes efeitos incluem expressão de citocinas e fatores de crescimento por macrófagos e células mesangiais (interleucina-1, fator de crescimento insulina-símile, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , fator de transformação tumoral  $\beta$ , fator estimulante de colônia de macrófagos, fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas), e expressão de moléculas pró-coagulantes e pró-inflamatórias pelas células endoteliais (trombomodulina, fator de ativação de origem tecidual e molécula de adesão de células vascular-VCAM 1) (Vlassara *et al.*, 1988; Kirsstein *et al.*, 1992; Abordo *et al.*, 1996; Skolnik *et al.*, 1991; Doi *et al.*, 1992). Ademais a ligação de AGEs aos receptores endoteliais mediam em parte a hiperpermeabilidade da parede capilar induzida pela diabetes, provavelmente através da indução de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Lu *et al.*, 1998).

Os produtos de glicosilação avançada também inativam quimicamente o óxido nítrico (NO) endotelial. Em modelos de diabetes experimental, uma resposta vasodilatadora defeituosa desenvolve-se em um padrão e em um período de tempo (semanas a meses) compatível com a inativação de NO por AGEs acumulados na região subendotelial (Bucala, Tracey e Cerami, 1991). Uma perda de reatividade vascular similar que se correlaciona com a acumulação subendotelial de AGEs foi demonstrada acontecer em animais normais não diabéticos que receberam por via endovenosa proteínas modificadas por AGEs (Vlassara *et al.*, 1992). Em ambos os sistemas experimentais citados anteriormente, a diminuição da função vasodilatadora ocorre mais lentamente após tratamento com o inibidor da glicosilação avançada, aminoguanidina. A inativação do óxido nítrico vascular por AGEs na parede vascular pode explicar em grande parte o progressivo bloqueio das respostas endotélio-dependente que acontecem na circulação renal, coronariana, mesentérica e na circulação sistêmica de pacientes diabéticos (de Tejada *et al.*, 1989; McVeigh *et al.*, 1992).

A potencial toxicidade renal destes produtos, por outro lado, tem sido avaliada em vários estudos experimentais. Células mesangiais em cultura, por exemplo, possuem receptores para AGEs e respondem à ligação aumentando a síntese de proteínas da

matriz extracelular, como colágeno do tipo IV e as lamininas A, B1 e B2 e estes efeitos são bloqueados por anticorpos contra os receptores de AGEs (Skolnik *et al.*, 1991). A administração *in vivo* de proteínas modificadas por AGEs a camundongos normais por 4 semanas induz hipertrofia glomerular que está associada a um aumento na expressão do RNAm para colágeno do tipo 4, laminina B1 e fator de transformação tumoral  $\beta$  (Yang *et al.*, 1994).

Ademais, pacientes diabéticos sofrem de uma maior incidência de doença vascular aterosclerótica, a qual tem sido associada com uma elevação nos níveis plasmáticos dos componentes da apolipoproteína-B, i.e., lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Ruderman e Haudenschild, 1984; Jensen, Stender e Deckert, 1988). A lipoproteína de baixa densidade é a principal lipoproteína responsável pela transferência de lipídios absorvidos da dieta ou sintetizados endogenamente para os tecidos periféricos, e a elevação persistente tanto de LDL como de seu precursor metabólico, lipoproteína de densidade muito baixa, tem sido repetidamente demonstrado ser um fator de risco importante, em diferentes populações, para o desenvolvimento de aterosclerose (Ross, 1993; Goldstein e Brown, 1977). Interessante ressaltar que em 1986, Ludmer e colaboradores demonstraram que a infusão intracoronariana de acetilcolina causa uma vasoconstrição no coração humano com doença arterial coronariana. Portanto, a aterosclerose bloqueia a vasodilatação coronariana endotélio-dependente o que predispõe este leito a vasoconstrição (Ludmer *et al.*, 1986; Zeiher *et al.*, 1991), uma resposta paradoxal que representa um defeito fundamental na regulação endotelial do tônus vascular.

A dislipidemia do diabetes também inclui alterações importantes no “clearance” plasmático de LDL com diminuição da captação celular (Lopes-Virella *et al.*, 1982; Hiramatsu, Bierman e Chait, 1985). Uma das formas de alteração química que tornam as partículas de LDL mais aterogênicas é a oxidação, formando a LDL oxidada (oxLDL). Lipoproteínas de baixa densidade que sofreram oxidação *in vitro* possuem afinidade diminuída pelos receptores LDL celulares e são captados preferencialmente por uma classe distinta de receptores de macrófagos. Como resultado desta captação, macrófagos da parede vascular podem alterar-se formando “células espumosas” fato este que precede as complexas lesões inflamatórias e proliferativas da placa



aterosclerótica (Steinberg *et al.*, 1989; Witztum e Steinberg, 1991; Goldstein, *et al.*, 1979; Fogelman *et al.*, 1980; Goldstein *et al.*, 1979). No entanto, as reações que levam a oxidação da LDL *in vivo* ainda não estão bem definidas. A grande capacidade antioxidante do plasma em conjunto com a disponibilidade extremamente baixa de metais de transição são indícios de que a oxidação catalisada por metais é improvável de gerar suficiente oxidação que afete a função da LDL (Frei *et al.*, 1989; Frei, Stocker e Ames, 1988).

Alguns estudos demonstram, no entanto, um nível aumentado de modificações induzidas por AGEs na LDL obtidas de pacientes diabéticos comparada com LDL obtida de pacientes normais (Bucala *et al.*, 1993; Bucala *et al.*, 1994). Análises estruturais revelaram que as moléculas de AGEs estão presentes tanto na apoproteína (AGE-apoB) como no componente lipídico da LDL (AGE-lipídio) e estes estão aumentados mais de duas vezes na diabetes (Bucala *et al.*, 1994).

Duas proteínas ligadoras de AGEs, originalmente descritas como p60 e p90 foram inicialmente isoladas de membranas de fígado de rato. Em estudo mais recente, Li e colaboradores (1996) demonstraram que a molécula p60 (referida como AGE-R1) é homóloga a um componente de aproximadamente 50 kD do complexo oligossacaril-transferase (OST-48), enquanto a p90 (chamada AGE-R2) é homóloga ao substrato da proteína quinase 80-KH. Ambas estas proteínas são expressas na superfície de muitas células humanas, incluindo células endoteliais, monócitos/macrófagos, linfócitos-T, tecido neural, células renais e músculo liso (Li *et al.*, 1996; Stitt *et al.*, 1997). Ademais, uma proteína ligadora de AGEs de 32kDa tem sido associada ao complexo AGEs-receptor (Vlassara *et al.*, 1995). Esta proteína, originalmente descrita como galectina-3, Mac-2 ou proteína ligadora de carboidrato-35 (CBP 35), exibe alta afinidade por ligantes AGEs e está presente em quase todos os tipos celulares (referida agora como AGE-R3) (Stitt, He e Vlassara, 1999). Outras proteínas com características ligadoras de AGEs tem sido identificadas, incluindo uma nova proteína de 35 kDa a qual tem sido descrita como receptor para AGE ou RAGE (Vlassara *et al.*, 1995). Esta molécula tem a capacidade de interagir com vários outros ligantes além de AGEs. Por exemplo, tem alta afinidade por anfoterina (Hori *et al.*, 1995) indicando que esta proteína tem outras funções, como reconhecimento intercelular e receptor de certos fatores de crescimento. Este receptor tem sido localizado em muitas células e tecidos, incluindo as células

endoteliais (Stitt, He e Vlassara, 1999), onde pode modular vários efeitos mediados por AGEs (Brett *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1994). O endotélio vascular expressa todos os receptores de AGEs (Stitt e , He e Vlassara, 1999). A ligação de AGEs a estes receptores contribue para sua captação, transporte e processamento assim como para outras funções que são tecido-específicas. A ligação de AGEs pode desencadear respostas celulares importantes como aumento da permeabilidade a proteínas, regulação da trombosmodulina e moléculas de adesão (Esposito *et al.*, 1989; Vlassara *et al.*, 1995; Kunt *et al.*, 1998). Portanto, o complexo AGE-receptor nas células endoteliais tem um papel único na resposta vascular como pro-coagulação, aderência celular, reatividade vascular e função de barreira anatômica (Esposito *et al.*, 1989). Um destes tecidos, o endotélio vascular, internaliza AGEs através de um mecanismo mediado por receptor (Esposito *et al.*, 1989) e a especificidade da ligação de moléculas modificadas por AGEs com o receptor do endotélio parece ser maior do que a de outros tecidos (Vlassara, Brownlee e Cerami, 1985; Esposito *et al.*, 1989; Radoff, Cerami e Vlassara, 1990; Radoff, Makita e Vlassara, 1991). Portanto, em estados patológicos caracterizados por elevados níveis circulantes de AGEs, como na diabetes, o endotélio pode responder acelerando o transporte transcelular destes ligantes. Este fenômeno *in vivo*, pode ser em parte responsável pela aceleração e progressão da vasculopatia diabética, dadas as múltiplas conseqüências patogênicas do depósito de AGEs na parede vascular (Cerami, Vlassara e Brownlee, 1986; Vlassara, Bucala e Striker, 1994).

O significado dos AGEs como mediadores da patogênese induzida pela glicose nos tecidos alvos tem sido também identificados pelo uso de um inibidor da formação de AGEs, a aminoguanidina. Em animais experimentais, o desenvolvimento das alterações patognômicas foi inibido de 85 a 90%. Estas incluem o desenvolvimento de capilares retiniais acelulares e microaneurismas, aumento da excreção urinária de albumina e volume mesangial, diminuição na velocidade de condução de nervos motores e sensoriais e amplitude dos potenciais de ação, elasticidade arterial diminuída (Cochrane e Robinson, 1995).

Além da glicose, AGEs podem ser formar a partir de uma variedade de compostos, incluindo frutose, trioses, ribose e derivados de lipoxidação (Vánder Jagt, Hunsanker, 2003).

A aminoguanidina tem a capacidade de remover 2-oxo-aldeídos reativos, intermediários chaves na formação da maioria dos AGEs, (Brownlee *et al.*, 1986; Frank *et al.*, 1997).

A importância dos produtos de glicação avançada na patogênese das complicações diabéticas é reforçada pelo fato de que compostos que clivam AGEs *in vitro* e *in vivo* restauram a função vascular na diabetes experimental (Vasan *et al.*, 1996; Wolfenbittel *et al.*, 1998).

Os produtos de glicação avançada que têm sido identificados são produtos de reação envolvendo 2-oxo-aldeídos reativos, principalmente glioxal, metil-glioxal e 3-deoxiglicosona. Neste sentido, anticorpos contra AGEs derivados do metil-glioxal apresentam reação cruzada com AGEs produzidos por modificação de proteínas com glicose, frutose, ribose, gliceraldeído, glioxal, sugerindo que o metil-glioxal pode ser um intermediário comum na formação de AGE a partir de uma grande variedade de agentes que promovem glicação (Shamsi *et al.*, 1998). AGEs derivados do glioxal, metil-glioxal e 3-deoxiglicosona estão elevados no curso da diabetes (Nagaraj *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 1995; Shamsi *et al.*, 1998; Kilhovd *et al.*, 2003). A administração oral de metil-glioxal resulta em acúmulo de colágeno no rim e espessamento da membrana basal glomerular (Golej *et al.*, 1998).

Sistemas detoxificantes endógenos contrabalançam a produção de AGEs degradando estes intermediários reativos 2-oxo-aldeídos. O sistema ubíquo da glioxalase funciona principalmente contra a toxicidade do metil-glioxal (Mannervick e Ridderstrom, 1993). Esta enzima, é altamente ativa na maioria dos tecidos, mas é dependente dos níveis de glutathione reduzida (GSH) (Mannervick e Ridderstrom, 1993; Thornalley, 1998; Creighton e Hamilton, 2001). Portanto, o estresse oxidativo aumentado característico do *status* diabético, além de contribuir para a formação aumentada destes intermediários reativos, incluindo o metil-glioxal, pode ter impacto nas concentrações de GSH intracelular e limitar a capacidade do sistema glioxalase de proteger contra a toxicidade do metil-glioxal (Vander Jagt *et al.*, 2001).

Outras enzimas envolvidas com a detoxificação destes aldeídos incluem a aldose redutase que apresenta baixa seletividade (Vander Jagt *et al.*, 1992) e 2-oxo-aldeído

desidrogenase que catalisa a oxidação do metil-glioxal em piruvato principalmente no fígado (Vander Jagt e Hunsaker, 2003).

### 1.3.5. Ativação da proteína quinase C

A família de proteínas quinase do tipo C (PKC) compreende pelo menos onze isoformas, nove das quais são ativadas pelo segundo mensageiro lipídico diacilglicerol (DAG). A hiperglicemia intracelular aumenta a concentração de DAG em células microvasculares em cultura, na retina e glomérulo renal de animais diabéticos (Xia *et al.*, 1994). Este fenômeno parece acontecer primariamente pelo aumento na síntese de novo de DAG a partir do intermediário da via glicolítica dihidroxiacetona-fosfato (Koya e King 1998). O aumento na síntese de novo de DAG ativa PKC tanto em células vasculares em cultura (Xia *et al.*, 1994) como na retina e glomérulo de animais diabéticos (Koya e King, 1998). As isoformas  $\beta$  e  $\delta$  da PKC são primariamente ativadas, mas aumento na concentração de outras isoformas tem sido relatado, como a PKC- $\alpha$  e  $\epsilon$  na retina (Koya e King, 1998) e PKC- $\alpha$  e  $\beta$  no glomérulo de ratos diabéticos (Koya *et al.*, 1997). A hiperglicemia também pode ativar as enzimas PKC indiretamente tanto através da ligação de AGEs a receptores (Portilla *et al.*, 2000) como aumento da taxa de reação na via dos polióis (Keogh, Dunlop e Larkins, 1997).

A PKC é ativada no glomérulo renal do rato dentro de uma semana após a indução de diabetes experimental e tem sido implicada na glomerulopatia diabética. As consequências metabólicas da hiperglicemia são proeminentemente expressas nas células endoteliais e mesangiais no glomérulo (Kreisberg e Ayo, 1993; Corkey, Corkey e Gimbrone, 1981). Nestas células o transporte de glicose é em grande parte independente de insulina, o que permite que as concentrações intracelulares de glicose se aproximem dos níveis extracelulares no *diabetes*.

A hiperglicemia é um dos principais fatores que levam ao aumento de atividade da PKC. Este fenômeno, i.e., ativação da PKC pela hiperglicemia, foi observado em glomérulo isolado (Craven e DeRubertis, 1989), células mesangiais em cultura (Ayo *et al.*, 1990, Studer, Craven e DeRubertis, 1993), células endoteliais (Inoguchi *et al.*, 1992), células do músculo liso vascular (Williams, Tsai e Schrier, 1992; Williams e Schrier, 1992), adipócitos (Ishizuka *et al.*, 1989) e outros tecidos (Ayo *et al.*, 1990;



Wolff *et al.*, 1991; Inoguchi *et al.*, 1992). Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia leva a ativação da PKC são múltiplos, mas o principal parece ser a síntese *de novo* de diacilglicerol (DAG) pelo aumento da concentração de intermediários da via glicolítica (Craven, Davidson e DeRubertis, 1990). O tipo de DAG formado por esta via é determinado pelos ácidos graxos disponíveis na célula para incorporação nas posições 1 e 2. Portanto, ao contrário do DAG derivado da hidrólise do difosfato de fosfoinositol (PIP<sub>2</sub>), que resulta exclusivamente na formação do 1-esteroil-2-araquidonil DAG, formas mais heterogêneas são formadas quando o DAG é formado na síntese *de novo* a partir da glicose. No entanto, estudos *in vitro* usando PKC purificada do cérebro de rato indicam que uma variedade de formas de DAG contendo diferentes ácidos graxos insaturados, são tão potentes quanto o 1-esteroil-2-araquidonil DAG com respeito à ativação da PKC (Go *et al.*, 1987).

Outro mecanismo pelo qual a diabetes pode incrementar a atividade da PKC é via tromboxano/endoperóxidos que ativam esta enzima em glomérulo isolado (Craven, Studer e DeRubertis, 1993), células mesangiais (Mene *et al.*, 1988; Spurney *et al.*, 1993) e outras células, incluindo plaquetas (Baldassare *et al.*, 1993) e células endoteliais (Clesham *et al.*, 1992). Cohen e colaboradores, a partir de estudos em aortas de ratos diabéticos (Cohen, 1993), sugeriram uma participação do aumento na produção de prostanóides vasoconstritores e TXA<sub>2</sub>/endoperóxidos (como PGH<sub>2</sub>) na atenuação da vasodilatação mediada por NO no *diabetes*. Este efeito da hiperglicemia pode ao menos em parte se dever a aumento da atividade da PKC como sugerido por outro trabalho deste grupo (Teshfamariam *et al.*, 1991).

Outro fenômeno associado ao incremento da atividade da PKC no *diabetes* é o bloqueio do aumento na concentrações de GMPc induzido por NO em resposta ao estímulo colinérgico no glomérulo isolado (Craven, Studer e DeRubertis, 1993) e em células mesangiais, GMPc suprime o aumento da síntese de matrix mediado por PKC. Portanto, o bloqueio geração de GMPc induzido por NO no glomérulo de indivíduos diabéticos pode amplificar a síntese de proteína na matrix em resposta a hiperglicemia (DeRubertis e Craven, 1994).

Em modelos agudos de diabetes experimental, a ativação da isoforma PKC-β foi demonstrada mediar anormalidades de fluxo sanguíneo retinal e renal, talvez devido a

diminuição da produção de óxido nítrico ou aumento da síntese de endotelina-1 (Ishii, *et al.*, 1996). A ativação anormal da PKC tem sido implicada na diminuição da produção glomerular de óxido nítrico induzido pelo diabetes experimental (Craven, Studer e DeRubertis, 1994), e na diminuição da produção de óxido nítrico em células do músculo liso que é induzida por hiperglicemia (Ganz e Seftel, 2000). A ativação da PKC também inibe a expressão, estimulada pela insulina, do RNA mensageiro para a óxido nítrico sintase endotelial (NOS<sub>e</sub>) em células endoteliais em cultura (Kuboki *et al.*, 2000). A hiperglicemia induz um aumento na atividade, estimulada pela endotelina-1, da quinase ativada por mitógeno (MAPK) em células mensageiras glomerulares através da ativação de isoformas da PKC (Glogowski *et al.*, 1999). A ativação de PKC pelo aumento da concentração de glicose também induz a expressão pelas células do músculo liso vascular de um fator, VEGF, que aumenta a permeabilidade vascular (Williams *et al.*, 1997). Além de participar da anormalidades de fluxo e permeabilidade induzidas pela hiperglicemia, a ativação de PKC contribui para a acumulação de proteína na matrix extracelular da microvasculatura pela indução da expressão do fator de transformação  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), fibronectina e colágeno do tipo IV tanto em células mensageiras em cultura (Studer, Craven, De Rubertis, 1993) como nos glomérulos de ratos diabéticos (Koya *et al.*, 1997). Estes efeitos parecem estar associados a diminuição, induzido por PKC, da produção de óxido nítrico (Craven *et al.*, 1997). A ativação de PKC induzida por hiperglicemia tem sido também implicada na superexpressão do inibidor de fibrinólise, o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) (Feener *et al.*, 1996), a ativação do fator nuclear  $\kappa\beta$  em células endoteliais em cultura e células do músculo liso vascular (NF- $\kappa\beta$ , que por sua vez induz a expressão de genes pró-inflamatórios (p.ex., genes da IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e na regulação e ativação de várias oxidases dependentes de NAD (P) H associadas a membrana, o que levaria a um incremento na produção celular de espécies reativas de oxigênio (Pieper e Riaz-al-Haq, 1997; Yerneni *et al.*, 1999). O tratamento de animais diabéticos com um inibidor específico da PKC- $\beta$  reduziu significativamente a atividade da PKC na retina e glomérulo renal. Concomitantemente, o tratamento normalizou o aumento, induzido pela diabetes, no ritmo de filtração glomerular e corrigiu parcialmente a excreção urinária de albumina (Koya *et al.*, 2000).

Nishikawa e colaboradores demonstram que a ativação de PKC depende de um incremento na produção de superóxido na mitocôndrias e indução da síntese de novo de



DAG. A ativação de PKC leva também a ativação de NFK- $\beta$  com posterior aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e TNF- $\alpha$  (Nishikawa *et al.*, 2000).

Similarmente, Pricci e colaboradores (2003), demonstraram que células endoteliais da retina de bovinos quando expostas a um meio de cultura contendo 30 mM de glicose apresentavam aumento de atividade da PKC com concomitante incremento na permeabilidade à albumina e que estes efeitos da alta concentração de glicose eram reproduzidos por ativadores de PKC. Estes autores concluem que a ativação de PKC é mediada diretamente por agentes oxidantes uma vez que inibidores da PKC também inibem aumento de permeabilidade induzido por superóxido e peroxinitrito. A ativação da PKC por espécies reativas, como hidroperóxido, havia sido demonstrada anteriormente por Gopalakrishna e Jaken (2000). A ativação de PKC pode causar perda da função de barreira pelo endotélio induzindo retração das células endoteliais através da fosforilação de moléculas que fazem ligações com actina (Lum e Malik, 1994).

Por outro lado, a atividade da enzima produtora de superóxido mais importante do tecido vascular, a NAD(P)H oxidase, aumenta em resposta a estimulação por PKC (Lassegue *et al.*, 2001) e também em resposta a altas concentrações de glicose de uma maneira dependente de PKC (Inoguchi *et al.*, 2000).

Este fenômeno também acontece *in vivo*, uma vez que altos níveis de glicose plasmática também são capazes de aumentar a atividade da NAD(P)H oxidase em vasos diabéticos, o que acontece concomitantemente a um grande aumento na expressão do RNAm da subunidade *gp91phox* da NAD(P)H oxidase (Hink *et al.*, 2001). Esta subunidade é expressa nas células endoteliais (Jones *et al.*, 1996), na adventícia dos vasos (Wang *et al.*, 1998) e em células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos (Bastian e Hibbs, 1994).

O aumento da produção de superóxido associada a incremento expressão e atividade da NAD(P)H oxidase, secundária a ativação de PKC, foi demonstrada na artéria mamária e veia safena de pacientes diabéticos que sofreram intervenção cirúrgica de revascularização (Guzik *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstram que em adição a ativação de enzimas produtoras de superóxido mediada por PKC, o próprio ânion superóxido é um potente estímulo para ativação da PKC (Nishikawa *et al.*, 2000).

Nishikawa e cols. demonstraram que altas concentrações de glicose aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio em cultura de células endoteliais da aorta de bovinos. Este fenômeno foi relacionado a um incremento na produção mitocondrial de superóxido e a normalização dos níveis de espécies reativas de oxigênio de origem mitocondrial com o uso de bloqueadores da cadeia respiratória previne a ativação de PKC induzida por altas concentrações de glicose (Nishikawa et al., 2000a). Estes dados indicam que a PKC, assim como a superprodução mitocondrial de ânion superóxido, tem uma participação crucial no aumento do estresse oxidativo nos vasos diabéticos, não apenas por estimular a produção de superóxido mediada por NAD(P)H-oxidase, mas também por sua ativação em resposta ao estresse oxidativo, formando assim um mecanismo de retroalimentação positiva.

### 1.3.6. Incremento na via das hexosaminas

O deslocamento do excesso de glicose intracelular para a via das hexosaminas pode também ser um fator subjacente importante causando várias manifestações das complicações diabéticas (Kolm-Litty *et al.*, 1998). Nesta via, a frutose-6-fosfatase diverge da glicólise para fornecer substrato para reações que requerem uridina-difosfato-*N*-acetilglicosamina (UDP-*N*-acetilglicosamina), como a síntese de proteoglicanos e formação de algumas glicoproteínas. A inibição da enzima limitante na conversão de glicose em glicosamina, a glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT), bloqueia o aumento na transcrição de TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (Kolm-Litty *et al.*, 1998) e do fator inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) (Du *et al.*, 2000). Estes produtos tem atividade proliferativa principalmente a nível de matrix que contribuem para a glomeroesclerose renal e pró-trombóticos, respectivamente. Esta via também tem participação importante na resistência insulínica induzida por glicose e lipídios (Marshall, Bacote e Traxinger, 1991; Hawkins *et al.*, 1997)

A modificação covalente de fatores de transcrição, como o Sp1 que regula ativação da região promotora do PAI-1, explica como o incremento da via das hexosaminas participa das alterações promovidas pela hiperglicemia no *diabetes*. Este fenômeno tem sido demonstrado em células endoteliais (Du *et al.*, 2000), células mesangiais glomerulares (Goldberg, Scholey e Fantus, 2000) e em células do músculo liso vascular (Chen *et al.*, 1998).



Adicionalmente, além de fatores de transcrição, outras proteínas nucleares e citoplasmáticas podem ser modificadas por O-acetilglicosaminilação (Hart, 1997). Um exemplo, relevante para as complicações diabéticas é a inibição da atividade da NOSe pela O-acetilglicosaminilação, secundária à hiperglicemia, do sítio Akt da enzima NOSe (Du *et al.*, 2000).

Portanto, a ativação da via das hexosaminas pela hiperglicemia pode resultar em mudanças na expressão gênica e função de proteínas, as quais em conjunto podem contribuir para a patogênese das complicações diabéticas.

### 1.3.7. Teoria do estresse oxidativo intracelular

Cerca de 95% de todo oxigênio respirados pelos seres humanos sofre uma redução tetravalente para produzir água ( $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ ) em uma reação catalisada pela citocromo oxidase C no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons. A citocromo oxidase é o aceptor final de elétrons na cadeia que gera um gradiente de prótons que permite a fosforilação oxidativa e produção de ATP. Apesar da cadeia transportadora de elétrons ser um sistema bastante eficiente, a natureza das reações de oxido-redução alternantes que acontece neste sistema, predispõe cada carreador de elétrons a reações com o oxigênio molecular. Por exemplo, enquanto a ubiquinona dentro do complexo I cadeia respiratória cicla entre os estados completamente oxidada (quinona), semiquinona (produto da redução por 1 elétron) e quinol (completamente reduzida), existe uma tendência de um elétron passar diretamente para o oxigênio (gerando  $O_2^-$ ) ao invés do próximo carreador de elétron na cadeia. A geração de  $O_2^-$  mitocondrial representa a principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio em condições fisiológicas. Estima-se que 1-2% do oxigênio total consumido diariamente gera  $O_2^-$  na mitocôndria. Neste caso, uma mulher de 60 Kg produziria diariamente 160-320 mmol de  $O_2^-$  apenas originado da cadeia respiratória (baseado num consumo de  $O_2$  de 6,4 L/dia) e um homem de 80 g produziria em torno de 215-430mmol de  $O_2^-$ /dia (Cadenas e Davies, 2000).

Por outro lado, a oxidação intracelular da glicose começa com a glicólise no citoplasma, a qual gera NADH e piruvato. O Piruvato é transportado para mitocôndria,

onde é oxidado no ciclo dos ácidos tricarbóxicos para produzir dióxido de carbono, água, quatro moléculas de NADH e uma molécula de FADH<sub>2</sub>. NADH e FADH<sub>2</sub> mitocondriais provêm energia para produção de ATP através da fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons (Trumpower, 1990). O fluxo de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é mantido por quatro complexos multienzimáticos associados à membrana interna. O NADH derivado tanto da oxidação citoplasmática da glicose como do ciclo dos ácidos tricarbóxicos na mitocôndria doa elétrons no complexo I (NADH:ubiquinona oxidoreductase) que transfere elétrons para ubiquinona. A ubiquinona pode também ser reduzida por elétrons doados de várias desidrogenases que contém FADH<sub>2</sub>, incluindo a succinato:ubiquinona oxidoreductase (complexo II) e glicerol-3-fosfato desidrogenase. Os elétrons são então transferidos da ubiquinona reduzida para o complexo ubiquinol:citocromo C oxidoreductase (complexo III) através do ciclo Q. O transporte de elétrons que prossegue através da citocromo c:citocromo c oxidase (complexo IV) e finalmente oxigênio molecular (Trumpower 1990; Korshunov *et al.*, 1998).

A transferência de elétrons através dos complexos I, III e IV gera um gradiente de prótons que energiza a reação catalisada pela ATP sintetase (complexo V). Quando a diferença de potencial eletroquímico gerado por este gradiente de prótons é alta, como acontece na hiperglicemia, a produção de superóxido é marcadamente aumentada (Korshunov *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2001). A hiperglicemia aumenta o gradiente de prótons como resultado da superprodução de doadores de elétrons pelo ciclo dos ácidos tricarbóxicos, o que por sua vez causa um grande aumento na produção de superóxido pelas células endoteliais, por exemplo.

Nishikawa e cols. (2000), utilizando células endoteliais da aorta de bovinos, demonstraram que o desacoplamento da fosforilação oxidativa através da quebra do gradiente de prótons criado pela cadeia respiratória bloqueia completamente a ativação de PKC induzida por altas concentrações de glicose. Indicando que a superprodução de superóxido pela mitocôndria pode iniciar a síntese de novo de DAG ou hidrólise de fosfatidilcolina que ativa PKC (Koya e King, 1998). A formação intracelular de produtos de glicosilação avançada (AGEs) também é completamente bloqueada pela quebra do fluxo de elétrons na cadeia respiratória ou pela quebra do gradiente eletroquímico. Uma vez que o metilglioxal é formado pela fragmentação da

gliceraldeído-3-fosfato, esta sensibilidade ao aumento da produção de superóxido mitocondrial pode refletir a bem descrita inibição reversível da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) por espécies reativas de oxigênio (Knight *et al.*, 1996). Alternativamente, a ativação da poli-ADP-ribose polimerase (PARP) e depleção de  $\text{NAD}^+$  podem resultar também em inibição da GAPDH (Garcia-Soriano *et al.*, 2001). O fluxo aumentado da glicose através da via dos polióis, outro mecanismo que parece ser importante na gênese das complicações diabéticas (Lee, Chung e Chung, 1995), também é bloqueado pela inibição da produção de superóxido mitocondrial. O acúmulo de sorbitol neste caso parece ser secundário à estimulação da aldose redutase pelo aumento da produção de superóxido mitocondrial.

O grupo do prof. Michael Brownlee, demonstrou também (Du *et al.*, 2000) que o deslocamento da glicose intracelular na via das hexosaminas, levando a aumento da transcrição de genes ou modificando função de proteínas que contribuem para a patogênese da diabetes (como TGF- $\beta$  e PAI-1), também é bloqueado pela inibição da superprodução de superóxido na mitocôndria.

Portanto, as principais vias bioquímicas que levam às principais complicações diabéticas incluindo a macro e microangiopatia parecem ter um fator subjacente comum, a superprodução mitocondrial de ânions superóxido.

Outros mecanismos e fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também tem sido demonstradas participar da patogênese das complicações diabéticas.

Por exemplo, espécies derivadas do sistema NAD(P)H oxidase vascular, como peróxido de hidrogênio e superóxido tem surgido como moléculas importantes na patogênese das complicações vasculares da diabetes (Inoguchi *et al.*, 2003; Griendling, Sorescu e Ushio-Fukai, 2000). A expressão da NAD(P)H oxidase aumenta nos tecidos da micro e macrovasculatura de animais diabéticos em associação com várias alterações funcionais e histoquímicas (Inoguchi *et al.*, 2003). A ativação do sistema NAD(P)H oxidases induz injúria vascular e bloqueio do relaxamento endotélio-dependente (Zhang *et al.*, 2003). Cotter e Cameron (2003), demonstraram que a administração oral de um inibidor da NAD(P)H-oxidase, a apocinina, bloqueou o déficit na velocidade de

condução e fluxo sanguíneo de nervos sensoriais e motores de ratos diabéticos, mostrando um papel para esta enzima tanto na neuropatia quanto na vasculopatia diabética.

Por outro lado, Kang (2003) demonstrou que o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio podem também ser gerados durante as reações de glicação com posterior formação de radical hidroxila citotóxicos.

Estes fenômenos de aumento do estresse oxidativo acontecem de maneira associada à diminuição da capacidade do organismo diabético de se contrapor aos mesmos. Por exemplo, Yue e colaboradores (2003) demonstraram que as concentrações do principal agente redutor intracelular, o GSH está reduzida significativamente tanto na aorta como nos tecidos oculares de ratos diabéticos e que esta redução acontece logo após 1 semana da indução da diabetes e se mantém até a oitava semana (Yue *et al.*, 2003).

Rubanyi e Vanhoutte demonstraram em 1986, que a enzima superóxido dismutase (SOD) aumenta significativamente a meia-vida do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF- do inglês *endothelium-derived relaxing factor*) liberado da artéria femoral de cães após estímulo com acetilcolina (Rubanyi e Vanhoutte, 1986). Gryglewski e cols. (1986) utilizando células endoteliais em cultura obtiveram achados similares. Em 1987, a natureza química do EDRF foi determinada e o óxido nítrico (NO) identificado como principal mediador do relaxamento endotélio-dependente (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer, Ferrige e Moncada, 1987). Posteriormente, o grupo do prof. Salvador Moncada, demonstrou em artérias coronárias isoladas de bovinos que a inativação da SOD causa inibição seletiva dos relaxamentos mediados por NO (Omar *et al.*, 1991). A SOD protege o óxido nítrico da inativação, reforçando-se o conceito de que os níveis e a atividade do NO na parede vascular podem ser profundamente afetados pela atividade da SOD e pelo antagonismo químico entre o NO e o ânion superóxido (Mugge *et al.*, 1991). NO reage com o  $O_2^{\bullet -}$  produzindo o forte oxidante, peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Huie e Padmaja, 1993).  $ONOO^-$  pode agir como um agente que promove nitratação ou oxidação e pode assim modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. No entanto, vários fatores limitam a taxa de produção e os efeitos do  $ONOO^-$ . As

concentrações relativas de NO e  $O_2^{\bullet-}$  são fatores críticos. Por exemplo, a SOD remove  $O_2^{\bullet-}$  a uma taxa de  $2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ , próximo à taxa de formação de ONOO<sup>-</sup>. Portanto, quando a SOD está presente em concentrações micromolares, pode competir eficazmente pelo  $O_2^{\bullet-}$ . De maneira similar, NO reage rapidamente com proteínas com grupamento heme, especialmente oxihemoglobina, limitando a difusão *in vivo* ao sítio de produção do  $O_2^{\bullet-}$ . As quantidades relativas de NO e  $O_2^{\bullet-}$  são também críticas na produção de ONOO<sup>-</sup> (Wink e Mitchell, 1998). A atividade máxima do ONOO<sup>-</sup> ocorre quando  $O_2^{\bullet-}$  e NO são produzidos em quantidades equivalentes. Quando acontece uma maior produção de NO do que de  $O_2^{\bullet-}$ , o peroxinitrito reage com NO formando dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), o qual pode reagir com NO formando a agente promotor de nitrosilação,  $N_2O_3$ . Quando há uma superprodução de  $O_2^{\bullet-}$  as formas oxidativas prevalecem (Davis *et al.*, 2001).

As principais fontes de ânion superóxido nas células endotélias são a cadeia respiratória mitocondrial, NAD(P)H oxidoredutases, ciclooxigenase-1, NOSe, xantina oxidase e enzimas do citocromo P450 (Kontos, 1985; Cosentino, Sill e Katusic, 1994; Pritchard *et al.*, 1995; Guzik *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2000; Lounsbury, Hu e Ziegelstein, 2000).

A ativação da óxido nítrico sintase na presença de concentrações subótimas do substrato L-arginina ou do cofator tetrahydrobiopterina pode levar a redução do oxigênio por um ou dois elétrons e levar a produção de superóxido ou peróxido de hidrogênio, respectivamente, um estado chamado de desacoplamento da enzima (*uncoupling of NOS*) (Olken e Marletta, 1993; Cosentino e katusic, 1995; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1998). Tem sido também demonstrado que a administração de tetrahydrobiopterina pode reverter a disfunção endotelial diabética (Pieper, 1997; Shinozaki *et al.*, 2000).

A interação do ânion superóxido com o óxido nítrico acontece numa taxa rápida e pode ser muito alta na presença de estresse oxidativo ou baixas concentrações de SOD-1 e leva a formação do potente oxidante, peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Beckman *et al.*, 1990). Portanto, o ânion superóxido consome óxido nítrico favorecendo um aumento do tônus arterial e forma um radical citotóxico que pode amplificar o dano endotelial. No

entanto, o destino e ação do peroxinitrito dependem das condições redox do ambiente onde é formado. Por exemplo, o peroxinitrito apresenta atividade antiagregante plaquetária em plasma rico em plaquetas. Este efeito depende de suas interações com tióis e subsequente liberação de óxido nítrico (Moro *et al.*, 1994). Liu e cols. (1994) demonstraram que o peroxinitrito causa relaxamento das artérias coronárias de cães (Liu, Beckman e Ker, 1994) e resultados similares foram obtidos em artérias pulmonares isoladas de bovino (Wu *et al.*, 1994). Estes efeitos também são mediados pela formação de óxido nítrico. Portanto em sistemas biológicos, a reatividade do peroxinitrito é tal que pode levar a formação de compostos com capacidade de gerar óxido nítrico, como nitrosotióis (Davis *et al.*, 2001). No entanto, a produção persistente de oxidantes, incluindo peroxinitrito, pode causar depleção de tióis, como o GSH. Este fenômeno, por sua vez pode tornar o tecido desprotegido contra os efeitos do peroxinitrito com injúria oxidativa subsequente e disfunção vascular. Por exemplo, em experimentos de perfusão de coração de isolado de rato o peroxinitrito causa vasodilatação coronariana mediada por NO, mas após exposição repetida causa disfunção vascular com inibição do relaxamento de outros fatores vasodilatadores (Villa *et al.*, 1994).

Outro fenômeno importante é que a produção aumentada de superóxido e consequentemente peroxinitrito inibe a síntese de prostaciclina, por nitrosilação da prostaciclina sintetase (Ozaki *et al.*, 2002; Bachschmid *et al.*, 2003), aumentando a quantidade de substrato para tromboxano sintetase com aumento da síntese de TXA<sub>2</sub> (Moncada *et al.*, 1976; Katusic e Vanhoutte, 1989). Esses efeitos em conjunto favorecem o bloqueio das respostas relaxantes endotélio-dependentes, diminuem a capacidade antiagregante nos vasos, aumentando tônus e capacidade pró-coagulante.

Por outro lado, o dano oxidativo foi sugerido como um fator que contribui no desenvolvimento e complicações do diabetes. (Wohaieb e Godin, 1987; Baynes, 1991; Tesfamariam, 1994; Giugliano, Ceriello e Paolisso, 1996). Por exemplo, alguns estudos relataram a atividade diminuída de enzimas antioxidantes, níveis diminuídos de glutathione (GSH) intracelular e sérico, aumento nos marcadores celulares de peroxidação de lipídio no córtex renal de animais diabéticos e reversão destas alterações através da suplementação dietética com Vitamina E, ácido  $\alpha$ -lipóico ou GSH reduzido (Jachec *et al.*, 2002, Dincer *et al.*, 2002, Ueno *et al.*, 2002). Uma relação causal entre stress

oxidativo e a disfunção endotelial durante o diabetes é apoiada pelos resultados de transferência de gene e expressão aumentada de isoformas de superóxido dismutase reverterem a disfunção endotelial na aorta diabética (Zanetti *et al.*, 2001) e pelo fato da disfunção endotelial ser acompanhada pela expressão diminuída de SOD em aortas de ratos diabéticos. (Kobayashi e Kamata, 1999). Além disso, Ohishi e Carmines (1995) demonstraram que a SOD-1 restaura a resposta ao óxido nítrico em arteríolas renais. Da mesma forma, alguns autores relataram recentemente que radicais de oxigênio contribuem no aumento do tônus vascular basal, na retroalimentação tubuloglomerular, na infiltração de monócito/macrófagos e no relaxamento endotélio-dependente prejudicado no rim diabético (Park *et al.*, 2001; Schnackenberg e Wilcox, 2001).

A ciclooxigenase é uma fonte importante de superóxido na célula endotelial. Uma vez que a produção enzimática de  $PGH_2$  a partir do ácido araquidônico é maior no endotélio do que no músculo liso vascular, níveis aumentados de radicais livres são gerados no endotélio durante a ativação da ciclooxigenase. Neste sentido, o bloqueio do relaxamento endotélio-dependente no diabetes está também provavelmente associada a um aumento na produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio durante a ativação da ciclooxigenase, com inativação do NO liberado basalmente e produção de prostanóides vasoconstritores (Gryglewski, Palmer, Moncada, 1986; Rubanyi, 1988; Pieper e Gross, 1988; Tesfamariam e Cohen, 1992; Katusic *et al.*, 1993).

Por outro lado, o incremento no estresse oxidativo ativa o metabolismo do ácido araquidônico (Hemler e Lands, 1980). Assim, a geração exógena de radicais livres pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase mimetiza várias características de altas concentrações extracelulares de glicose, notavelmente a geração de prostanóides vasoconstritores (Tesfamariam e Cohen, 1992).

Outro fenômeno agravante no diabetes é a diminuição das defesas antioxidantes. Vários autores tem mostrado uma marcante diminuição nos mecanismos de defesa antioxidantes no diabetes. Esses incluem glutathione, superóxido dismutase, ácido ascórbico, ácido úrico e vitamina E (Wolff e Dean, 1987; Jain, 1989; Del Boccio, 1990; Arai *et al.*, 1987). Essa diminuição na atividade dos sistemas antioxidantes pode significar um aumento na sensibilidade da célula endotelial ao estresse oxidativo.

Ademais, uma diminuição na atividade da superóxido dismutase endotelial leva a uma diminuição na liberação do NO derivado do endotélio (Mugge *et al.*, 1991; Omar *et al.*, 1991). Enquanto que a administração de superóxido dismutase, ou do removedor de peróxido de hidrogênio, catalase, melhora os relaxamentos endotélio-dependentes anormais causados pelo diabetes elevadas concentrações de glicose extracelular *in vitro* (Hattori *et al.*, 1991; Tesfamariam e Cohen, 1992; Pieper *et al.*, 1992). A transferência genética de isoformas da superóxido dismutase na aorta de ratos diabéticos por aloxana também reverte a disfunção endotelial (Zanetti *et al.*, 2001).

Produtos intermediários da glicosilação não-enzimática consomem (*quench*) o NO produzido, e este é um fator adicional para a diminuição da resposta endotélio-dependente nos vasos de indivíduos diabéticos (Bucala, Tracey e Cerami, 1991).

Vários estudos têm mostrado bloqueio da resposta endotélio-dependente a diferentes agonistas vasodilatadores com ação em diferentes receptores e em diferentes leitos vasculares (aorta, artérias cerebrais, coronárias, mesentéricas, e renais) de animais diabéticos (ratos, coelhos e cães) (Oyama *et al.*, 1986; Meraji *et al.*, 1987; Wakabayashi *et al.*, 1987; Durante, Sem e Sunahara, 1988; Kamata, Miyata, Kasuva, 1989).

Alguns autores também relataram que há uma diminuição dos níveis de GMPC basais ou pós estimulação em animais diabéticos (Kamata, Miyata, Kasuva, 1989; Abiru *et al.*, 1990). Um defeito semelhante nos relaxamentos endotélio-dependente tem sido demonstrado em pacientes humanos diabéticos com disfunção erétil (Saenz de Tejada *et al.*, 1989) e no leito arterial do antebraço de pacientes diabéticos (Calver, Collier e Vallance, 1992; Kingwell *et al.*, 2003. Essas respostas endotélio-dependente diminuídas não são devidas a uma diminuição da responsividade do músculo liso vascular uma vez que relaxamentos induzidos por agonistas que agem diretamente no músculo liso (p.ex. nitrovasodilatadores) estão inalteradas no diabetes (Mayan, Simmons e Sharpe, 1991; Durante, Sen e Sunahara, 1988; Kamata, Miyata e Kasuva, 1989; Saenz de Tejada *et al.*, 1989)

Apesar da hiperglicemia ser um fator de risco reconhecido para o desenvolvimento de disfunção endotelial, alguns pesquisadores relataram nenhuma alteração nas respostas endotélio-dependentes de animais diabéticos ou em pacientes



moderadamente hiperglicêmicos com diabetes do tipo I (Head *et al.*, 1987; Gebremedhin *et al.*, 1988; Smits *et al.*, 1993). A razão para esta discrepância está relacionada tanto aos níveis glicêmicos quanto à duração do *status* hiperglicêmico. Por exemplo, alguns autores demonstraram que hiperglicemia moderada não causava disfunção endotelial *in vitro* nem em pacientes moderadamente hiperglicêmicos (Tesfamariam *et al.*, 1990; Tesfamariam *et al.*, 1991; Smits *et al.*, 1993). Orié e colaboradores relataram que o bloqueio do relaxamento a acetilcolina é dependente do tempo de duração do diabetes, sendo evidente já a partir da quarta semana (Orié, Aloamaka e Iyawé, 1993).

#### 1.4. Disfunção Erétil no Diabetes

##### 1.4.4. Ereção Peniana

O processo de ereção peniana depende de um sistema nervoso central e periférico intactos. Basicamente é mediado por um arco reflexo medular que envolve processamento e integração no sistema nervoso central de estímulos táteis, olfativos, auditivos e psíquicos (Andersson, 2001). A função erétil normal envolve três processos sinérgicos e simultâneos: um aumento no influxo arterial no pênis, o qual é mediado neurologicamente, relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos e restrição do retorno venoso a partir do pênis (Bivalacqua *et al.*, 2000). O pênis, de maneira grosseira, é composto de três corpos separados por septos de tecido conjuntivo. Um corpo esponjoso único que sustenta e protege a uretra ao longo da superfície ventral do pênis e forma a glândula distalmente. Dois corpos cavernosos paralelos, que se estendem ao longo da superfície dorsal do pênis, que além de prover estrutura para o pênis funciona como um reservatório de sangue no estado erétil. Os corpos cavernosos são envolvidos por uma camada fibrosa, túnica albugínea (Andersson e Wagner, 1995).

Os corpos cavernosos compreendem uma rede de sinusóides supridos pelas artérias helicinais, que são ramos terminais das artérias cavernosas. No estado flácido, as trabéculas do músculo liso dos corpos cavernosos, os quais sustentam os sinusóides vasculares, estão tonicamente contraídos por ação simpática e permitem apenas uma pequena quantidade de influxo arterial (Burnett *et al.*, 1992). A liberação de neurotransmissores de terminais dos nervos cavernosos e do endotélio em resposta a

estimulação sexual resulta em relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e ereção peniana.

O balanço entre fatores contráteis (p.ex. neurotransmissão simpática, endotelina, angiotensina II, tromboxano A<sub>2</sub>) e relaxantes (p.ex. óxido nítrico, acetilcolina, ATP, adenosina, entre outros) controla o grau de tônus da vasculatura do pênis e da musculatura lisa dos corpos cavernosos e determina o estado funcional do pênis: detumescência e flacidez ou tumescência e ereção (Andersson, 2001).

O pênis é innervado por fibras nervosas autonômicas e somáticas (Andersson e Wagner, 1995). Nervos simpáticos e parassimpáticos a partir da pélvis se unem para formar os nervos cavernosos, os quais innervam os corpos cavernosos regulando o fluxo sanguíneo para o pênis (Lue, 2000). O nervo somático podendo provê sensações para o pênis através do nervo dorsal do pênis. Nervos colinérgicos, não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC), óxido nítrico (NO), ATP e adenosina, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) são fatores que mediam relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos (Tong *et al.*, 1992; Andersson, 2001). Ademais, o estresse de cisalhamento estimula a produção de NO no endotélio dos sinusóides trabeculares. O NO liberado tanto das fibras NANC como do endotélio dos sinusóides difunde-se no músculo liso dos corpos cavernosos e das helicinais onde interagem diretamente com a guanilil ciclase aumentando as concentrações de GMPc (Burnett *et al.*, 1992; Rajfer *et al.*, 1992). O aumento de GMPc altera vários processos celulares que culminam com o relaxamento dos músculos lisos, tais como: ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), ativação de canais iônicos que reduzem as concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular através do seqüestro ou extrusão do mesmo, abertura de canais de potássio que causam hiperpolarização das células dos músculo lisos e ativação das fosfatases da cadeia leve de miosina (Stief *et al.*, 1997; Moreland *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997). Os efeitos do GMPc são controlados por ação da fosfodiesterase do tipo 5 que hidrolisa a ponte 3'5' (Moreland *et al.*, 1999). O polipeptídeo intestinal vasoativo, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e prostanoídes (PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>, via receptores EP2/EP4) aumentam as concentrações intracelulares de AMPc, e podem contribuir em menor escala para o relaxamento do músculo liso do tecido erétil peniano (Andersson, 2001).

Os principais sistemas contráteis que mantêm o tônus de detumescência peniana são a neurotransmissão simpática noradrenérgica mediada principalmente por receptores  $\alpha$ -1 com sinalização através de fosfolipase C com quebra de fosfoinosítídeos de membrana e ação posterior de um metabólito (IP3) liberando cálcio dos estoques intracelulares e ativação de PKC (Christ, 1995).

Evidências mais recentes apontam para o papel da RhoA, uma GTPase citosólica e uma quinase serina/treonina citosólica (Rho quinase) que em reações de fosforilação subsequentes inativam a fosfatase da cadeia leve de miosina com manutenção do estado contraído das fibras de músculo liso dos corpos cavernosos (Chitale, 2001).

No estado de detumescência peniana, as arteríolas e os sinusóides estão tonicamente contraídos, principalmente por ação da neurotransmissão noradrenérgica (Traish *et al.*, 1999). Desta forma apenas uma pequena quantidade de sangue entra nos corpos cavernosos como aporte nutritivo. A drenagem sanguínea, neste estado, acontece normalmente para veias fora do pênis. Quando a atividade noradrenérgica, mantenedora do tônus, é bloqueada, a musculatura lisa das arteríolas e sinusóides relaxa em conjunto com a musculatura lisa do corpo cavernoso permitindo o influxo de sangue arterioso e com subsequente aumento da pressão intracavernosa. Estes fenômenos hemodinâmicos orquestrados levam à expansão máxima dos espaços lacunares que terminam por comprimir os plexo sub-albugíneos, levando à veno-oclusão e aprisionamento sanguíneo (tumescência) característico do estado erétil (Kim *et al.*, 1993).

Por outro lado, a ativação de nervos noradrenérgicos contrai as arteríolas helicinais e os sinusóides trabeculares reduzindo o influxo arterial e a pressão veno-oclusiva aumentando o efluxo sanguíneo e levando o pênis ao estado flácido (detumescência). Estes fenômenos estão associados também à diminuição de liberação dos neurotransmissores relaxantes, especialmente óxido nítrico e à degradação dos segundos mensageiros, especialmente GMPc, por ação da PDE<sub>5</sub> (Lue e Lee, 2000). A inibição desta enzima, i.e. PDE<sub>5</sub>, é o mecanismo de ação que forma a base racional do tratamento da disfunção erétil com o sildenafil e derivados, vardenafil e tadalafil (Boolell *et al.*, 1996; Stief *et al.*, 1998).

Um fator importante a ser considerado no processo erétil e que contribui ao tônus vascular é a presença de canais intercelulares conhecidos como junções “gap” nas membranas do músculo liso do corpo cavernoso (Christ *et al.*, 1999). Estas comunicações permitem a passagem e movimento de íons de relevante fisiologicamente ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) e segundos mensageiros (GMPc, AMPc), os quais governam relaxamento e contração sincicial necessária para ereção e detumescência unificada do pênis (Christ *et al.*, 1999).

#### 1.4.2. Disfunção erétil secundária à diabetes

A disfunção erétil é definida como incapacidade de atingir e manter uma ereção peniana adequada para uma performance sexual satisfatória. Esta incapacidade deve perdurar por mais de três meses para caracterizar a disfunção erétil (National Institutes of Health Consensus - Development Panel on Impotence, 1993).

Estima-se que a disfunção erétil atinja cerca de 150 milhões de homens (McKinlay, 2000). No Brasil, as estimativas apontam que mais de 40% dos brasileiros entre 40 e 70 anos sofram desta condição (Moreira *et al.*, 2001) e que pelo menos um milhão de novos casos surjam por ano nesta mesma faixa etária (Moreira, 2002 a e b).

Apesar dessa condição não ser fatal, não deve ser considerada um distúrbio benigno, uma vez que pode ter um efeito extremamente negativo na relação conjugal do paciente, em sua auto-estima, comprometendo seu bem estar e qualidade de vida (Krane *et al.*, 1989).

Homens diabéticos têm disfunção erétil em idade mais precoce, e a população masculina diabética apresenta uma prevalência desta condição mais alta que a população masculina não diabética, chegando até 75% em algumas estimativas (Hakim e Goldstein, 1996).

A etiologia da disfunção erétil no diabetes é multifatorial. Há uma alta incidência de neuropatia periférica, microangiopatia e insuficiência arterial em indivíduos diabéticos com disfunção erétil quando comparados com aqueles com função erétil preservada. DE maneira geral a patofisiologia da disfunção erétil está associada

com uma diminuição da capacidade do músculo liso do corpo cavernoso em relaxar (devido à disfunção endotelial ou neuropatia das fibras nitrérgicas, p.ex.) e/ou um aumento do tônus contrátil (aumento da produção de prostanóides contracturantes, p.ex) (Lerner, Melman e Christ, 1993; Melman e Gingell, 1999).

Blanco e cols. (1990) relataram uma neuropatia de nervos colinérgicos nos corpos cavernosos de pacientes diabéticos que pode ser parcialmente responsável pela disfunção erétil nesses pacientes (Blanco *et al.*, 1990).

O principal neurotransmissor mediando o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso é o óxido nítrico (Burnett *et al.*, 1992; Rajfer *et al.*, 1992). As duas fontes de NO no corpo cavernoso são as isoformas constitutivas da enzima (NOS<sub>e</sub> e NOS<sub>n</sub>) do endotélio vascular e das fibras NANC (nitrérgicas) tanto em animais como em seres humanos. A transmissão não-adrenérgica não-colinérgica mediada por NO parece ser o fator mais importante com respeito ao relaxamento dos corpos cavernosos (Ignarro *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991; Knispel, Goessl e Beckmann, 1991 e 1992 a e b; Pickard, Powell e Zar, 1991 e 1995; Bush *et al.*, 1992; Holmquist, Hedlund, Andersson, 1992; Rajfer *et al.*, 1992; Bush, Gonzalez e Ignarro, 1992).

Um dos principais fatores que contribuem para a disfunção erétil em pacientes diabéticos é uma diminuição na densidade de fibras contendo NOS<sub>n</sub> e bloqueio do relaxamento endotélio-dependente, disfunção endotelial (Saenz de Tejada *et al.*, 1989; Bivalacqua *et al.*, 2001). Algumas pesquisas têm demonstrado que animais diabéticos com a função erétil prejudicada têm uma diminuição significativa da expressão das proteínas NOS<sub>e</sub> e NOS<sub>n</sub> (Vernet *et al.*, 1995). Estes estudos propõem um provável mecanismo para o desenvolvimento de disfunção erétil em pacientes com diabetes, que é uma diminuição na produção de NO secundário à diminuição da expressão das isoformas constitutivas da óxido nítrico sintase.

O bloqueio do relaxamento neurogênico e endotélio-dependente relatado em pacientes humanos diabéticos (Saenz de Tejada *et al.*, 1989) foi também observado em coelhos diabéticos por aloxana (Azadzoi e Saenz de Tejada, 1992). Posteriormente, Pickard e cols. (1994) demonstraram uma redução na resposta estimulação elétrica transmural em tiras de corpo cavernoso de pacientes diabéticos submetidos à

implantação de prótese. Esse efeito foi correlacionado com baixa produção de NO (medido pela formação de nitrato) e demonstrou-se resposta intacta do músculo a agentes musculotrópicos (Pickard *et al.*, 1994).

Alguns autores relataram que pacientes diabéticos têm níveis circulantes de endotelina-1 (ET-1) aumentados (Lerman *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 1998; Jagroop *et al.*, 1999) e que os níveis absolutos são maiores nos pacientes que tem disfunção erétil do que naqueles que não tem disfunção erétil, apesar de não diferirem dos de pacientes não diabéticos (Francavilla *et al.*, 1997). Outros autores não encontram diferenças nos níveis de endotelina-1 nem no sangue periférico nem no sangue dos corpos cavernosos (Kadioglu *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 2000).

Por outro lado, o *status* diabético induzido pela estreptozotocina em ratos e induzido por aloxana em coelhos resulta em marcada inibição da síntese de PGI<sub>2</sub> (Jeremy *et al.*, 1985; Sullivan *et al.*, 1998). A síntese de PGI<sub>2</sub> é estimulada pela acetilcolina em receptores muscarínicos em ratos e no homem (Jeremy *et al.*, 1986a; Jeremy *et al.*, 1986b) tanto no músculo liso dos corpos cavernosos como nos vasos sinusóides e helicinais.

No modelo de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) uma série de explicações para a diminuição da função erétil no diabetes tem sido demonstrados experimentalmente, entre eles: disfunção de nervos autonômicos (Fishel *et al.*, 2001); diminuição das propriedades condutoras nervosas; alteração na liberação ou ação pós-sináptica de neurotransmissores como o óxido nítrico, p.ex. (Vernet *et al.*, 1995); funções do músculo liso alteradas (Burchardt *et al.*, 2000), disfunção endotelial (Keegan, Cotter e Cameron, 2001), entre outras.

O relaxamento endotélio-dependente do corpo cavernoso humano depende primordialmente de NO, enquanto nas arteríolas de resistência do pênis, helicinais, é primariamente dependente do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) em conjunto com NO. Angulo e colaboradores, do grupo do prof. Saenz de Tejada, demonstraram que em tecidos obtidos de pacientes diabéticos submetidos à implantação de prótese que o relaxamento endotélio dependente induzido por acetilcolina está significativamente reduzida no corpo cavernosos e nas arteríolas de resistências. O

componente do relaxamento induzido pela acetilcolina que é resistente ao bloqueio da NOS e da síntese de prostaglandina, atribuído ao fator hiperpolarizante derivado do endotélio, está também inibido (Angulo *et al.*, 2003). Este mesmo autor relata que o sildenafil melhora o relaxamento endotélio-dependente mediado por NO, mas não o mediado por EDHF, ao contrário do dobesilato de cálcio. Este fenômeno pode explicar a menor eficiência dos inibidores de fosfodiesterase 5 na disfunção erétil diabética.

Bivalacqua e colaboradores (2003) demonstraram que a transfecção do gene da NOSe no corpo cavernoso corrige a resposta erétil mediada por NO em resposta à estimulação elétrica do corpo cavernoso em ratos diabéticos por estreptozotocina. O que corrobora com um déficit deste mediador na disfunção erétil diabética experimental.

## **1.5. Disfunção Endotelial na Senescência**

### **1.5.1 Generalidades**

A senescência, equivalente neste trabalho ao termo envelhecimento, é um processo natural que é acompanhado de novos problemas sociais e sanitários em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Na verdade, o prolongamento da expectativa de vida é um fenômeno geral em quase todo mundo (Folkow e Svanborg, 1993), e pessoas com idade acima de 65 anos constituem cerca de 15 % da população dos países desenvolvidos (Wadsworth, 1990). O envelhecimento normal está associado com uma habilidade diminuída de adaptação a mudanças ambientais (Roth, 1990). A complacência e distensibilidade do sistema cardiovascular estão diminuídas, assim como o débito cardíaco em estação e repouso (Brandfonbrener, Landowne e Shock, 1955; Folkow e Svanborg, 1993). O volume sanguíneo e a massa total de eritrócitos estão diminuídas assim como o volume total de fluidos corporais, o que contribui para a relativa deficiência dos reflexos de regulação cardiovasculares (Messerli *et al.*, 1983; Messerli, 1985).

Ademais, a senescência é usualmente associada com mudanças no sistema cardiovascular, especialmente relacionadas à estrutura e função das artérias (Wei, 1989; Safar, 1990). Isto contribui para a incidência aumentada de distúrbios cardiovasculares

componente do relaxamento induzido pela acetilcolina que é resistente ao bloqueio da NOS e da síntese de prostaglandina, atribuído ao fator hiperpolarizante derivado do endotélio, está também inibido (Angulo *et al.*, 2003). Este mesmo autor relata que o sildenafil melhora o relaxamento endotélio-dependente mediado por NO, mas não o mediado por EDHF, ao contrário do dobesilato de cálcio. Este fenômeno pode explicar a menor eficiência dos inibidores de fosfodiesterase 5 na disfunção erétil diabética.

Bivalacqua e colaboradores (2003) demonstraram que a transfecção do gene da NOSe no corpo cavernoso corrige a resposta erétil mediada por NO em resposta à estimulação elétrica do corpo cavernoso em ratos diabéticos por estreptozotocina. O que corrobora com um déficit deste mediador na disfunção erétil diabética experimental.

## **1.5. Disfunção Endotelial na Senescência**

### **1.5.1 Generalidades**

A senescência, equivalente neste trabalho ao termo envelhecimento, é um processo natural que é acompanhado de novos problemas sociais e sanitários em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Na verdade, o prolongamento da expectativa de vida é um fenômeno geral em quase todo mundo (Folkow e Svanborg, 1993), e pessoas com idade acima de 65 anos constituem cerca de 15 % da população dos países desenvolvidos (Wadsworth, 1990). O envelhecimento normal está associado com uma habilidade diminuída de adaptação a mudanças ambientais (Roth, 1990). A complacência e distensibilidade do sistema cardiovascular estão diminuídas, assim como o débito cardíaco em estação e repouso (Brandfonbrener, Landowne e Shock, 1955; Folkow e Svanborg, 1993). O volume sanguíneo e a massa total de eritrócitos estão diminuídas assim como o volume total de fluidos corporais, o que contribui para a relativa deficiência dos reflexos de regulação cardiovasculares (Messerli *et al.*, 1983; Messerli, 1985).

Ademais, a senescência é usualmente associada com mudanças no sistema cardiovascular, especialmente relacionadas à estrutura e função das artérias (Wei, 1989; Safar, 1990). Isto contribui para a incidência aumentada de distúrbios cardiovasculares



componente do relaxamento induzido pela acetilcolina que é resistente ao bloqueio da NOS e da síntese de prostaglandina, atribuído ao fator hiperpolarizante derivado do endotélio, está também inibido (Angulo *et al.*, 2003). Este mesmo autor relata que o sildenafil melhora o relaxamento endotélio-dependente mediado por NO, mas não o mediado por EDHF, ao contrário do dobesilato de cálcio. Este fenômeno pode explicar a menor eficiência dos inibidores de fosfodiesterase 5 na disfunção erétil diabética.

Bivalacqua e colaboradores (2003) demonstraram que a transfecção do gene da NOS $\epsilon$  no corpo cavernoso corrige a resposta erétil mediada por NO em resposta à estimulação elétrica do corpo cavernoso em ratos diabéticos por estreptozotocina. O que corrobora com um déficit deste mediador na disfunção erétil diabética experimental.

## **1.5. Disfunção Endotelial na Senescência**

### **1.5.1 Generalidades**

A senescência, equivalente neste trabalho ao termo envelhecimento, é um processo natural que é acompanhado de novos problemas sociais e sanitários em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Na verdade, o prolongamento da expectativa de vida é um fenômeno geral em quase todo mundo (Folkow e Svanborg, 1993), e pessoas com idade acima de 65 anos constituem cerca de 15 % da população dos países desenvolvidos (Wadsworth, 1990). O envelhecimento normal está associado com uma habilidade diminuída de adaptação a mudanças ambientais (Roth, 1990). A complacência e distensibilidade do sistema cardiovascular estão diminuídas, assim como o débito cardíaco em estação e repouso (Brandfonbrener, Landowne e Shock, 1955; Folkow e Svanborg, 1993). O volume sanguíneo e a massa total de eritrócitos estão diminuídas assim como o volume total de fluidos corporais, o que contribui para a relativa deficiência dos reflexos de regulação cardiovasculares (Messerli *et al.*, 1983; Messerli, 1985).

Ademais, a senescência é usualmente associada com mudanças, no sistema cardiovascular, especialmente relacionadas à estrutura e função das artérias (Wei, 1989; Safar, 1990). Isto contribui para a incidência aumentada de distúrbios cardiovasculares

cl clinicamente significantes, como hipertensão, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e hipotensão postural (Docherty, 1990). Semelhantemente, o risco de distúrbios cardiovasculares é 2-5 vezes maior em idosos hipertensos do que em normotensos de mesma idade (Smith, 1988), e duas vezes maior quando comparado com pacientes jovens com os mesmos níveis pressóricos (Vokonas, Kannel e Cupples, 1988). Os distúrbios cardiovasculares são responsáveis por 50% da morbidade e mortalidade na senescência (Lonergan e Krevans, 1991).

Nos idosos, a perfusão cerebral está reduzida, como consequência de uma autoregulação pobre associada com aterosclerose cerebral, o que altera tanto funções cerebrais quanto físicas. Ademais, em pacientes com hipertensão de longa data, os limites de autoregulação tendem a ser deslocados para valores maiores (Strandgaard *et al.*, 1983) de tal maneira que mesmo pequenas alterações na pressão sanguínea podem induzir diminuições significativas no fluxo de perfusão cerebral (Folkow e Svanborg, 1993).

O sistema vascular é marcadamente alterado pela senescência. O conteúdo lipídico, de colágeno e minerais da parede vascular aumenta com a senescência (Wadsworth, 1990; Benetos *et al.*, 1993). Este aumento reduz a distensibilidade arterial (Benetos *et al.*, 1993; Abrams, 1988) e aumenta a rigidez arterial principalmente se a aterosclerose estiver presente (Wadsworth, 1990; Abrams, 1988). As modificações nas propriedades viscoelásticas da parede arterial, participam do aumento da pressão arterial que acompanha a senescência (Safar, 1985; Julius, 1988; Nielsen *et al.*, 1992), e também das alterações na resposta a agentes vasoativos. Estas alterações estão provavelmente envolvidas também na diminuição da sensibilidade dos baroreceptores associada à senescência (Julius, 1988). A camada subendotelial fica mais espessa com a senescência, pelo aumento de conteúdo do tecido conectivo (Yin, 1980), e também da camada média das grandes artérias (O'Rourke, 1982) devido a calcificação aumentada, deposição de conteúdo lipídico e protéico, principalmente em torno da membrana elástica interna (Goldberg *et al.*, 1984; Epstein, 1992). Estas mudanças relacionadas à senescência contribuem para o aumento da rigidez vascular (Olivetti *et al.*, 1991). A senescência também produz mudanças morfológicas graduais nas veias e uma diminuição em sua complacência (Bouissou e Maurel, 1991), levando a uma diminuição do retorno venoso (Folkow e Svanborg, 1993). O fluxo sanguíneo intraluminal pode ser

menos laminar, independente da aterosclerose, porque as células endoteliais se tornam mais heterogêneas em forma, tamanho e orientação axial (Yin, 1980; Epstein, 1992).

Outro mecanismo importante que pode participar da deterioração da célula endotelial é a geração de um excesso de radicais livres derivados do oxigênio devido a uma redução das defesas antioxidantes naturais que está associada a senescência (Ames, Shigenaga e Hagen, 1993). A lipoperoxidação e produtos da lipoperoxidação, os quais estão aumentados com a idade, estão associados a certas alterações comuns na senescência (Emerit, Bonnefont e Galli, 1989). Um método indireto de detectar o grau de peroxidação lipídica baseia-se na mensuração das concentrações teciduais ou em líquidos orgânicos de um produto final derivado de hidroperóxidos, como o malondialdeído (MDA) (Janero, 1990). As concentrações plasmáticas de MDA aumentam com a idade (Rodríguez-Martínez e Ruiz-Torres, 1992) e este composto tem a capacidade, nas concentrações encontradas no plasma, de reduzir o relaxamento induzido por acetilcolina na artéria caudal do rato e este efeito é bloqueado pela superóxido dismutase (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1996). Levando em consideração esses achados, pode-se sugerir que um aumento nas concentrações de MDA associado a senescência pode estar envolvido nas alterações funcionais e estruturais observadas no endotélio senescente.

### **1.5.2. Alterações na reatividade vascular na senescência**

A senescência além de produzir mudanças no músculo liso vascular como enrijecimento e aterosclerose prematura (Schleicher, Wagner e Nerlich, 1997) provoca também alterações na função endotelial (Wei, 1992). A disfunção endotelial na realidade desenvolve-se muito antes que mudanças estruturais ou que a aterosclerose vascular aconteçam (Barton, 1997). O endotélio atua como importante regulador do tônus do músculo liso vascular e conseqüentemente da pressão arterial e fluxo de perfusão tecidual (Moncada, Palmer e Higgs, 1991).

Pesquisas distintas demonstram que a senescência reduz relaxamento endotélio-dependente induzido por vasodilatadores que liberam óxido nítrico (NO) do endotélio (Moritoki, Hosoki e Ishida, 1986; Hynes e Duckle, 1987; Hongo *et al.*, 1988). A vasodilatação induzida por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos tanto em vasos de ratos como de seres humanos está também reduzida (Van Brummelen *et al.*, 1981; Tsujimoto, Lee e Hoffman, 1986; Xiao e Lakatta, 1992), enquanto aquelas induzidas por papaverina e nitrovasodilatadores estão essencialmente não modificadas (Dohi *et al.*, 1990; Tomínaga *et al.*, 1994).

Com relação a mudanças provocadas pela senescência nas respostas vasoconstritoras, estudos realizados com segmentos vasculares de ratos e em seres humanos demonstraram uma leve diminuição nas respostas induzidas por catecolaminas, enquanto aquelas produzidas por outros agonistas estão basicamente inalteradas (Fleisch, 1980; Toda e Shimizu, 1987; Hynes e Duckles, 1987; Vanhoutte, 1988; Wanstall e O'Donnell, 1988; Angus e Cocks, 1989; Wadsworth, 1990; Docherty, 1990). Esta pequena redução pode ser parcialmente devida a uma adaptação estrutural com aumento da razão parede-lúmen, que antagoniza o declínio da força. Pesquisas a respeito da homeostase do cálcio em artérias senescentes apontam para alterações nos movimentos do  $\text{Ca}^{2+}$ , tão bem quanto a sensibilidade aumentada a antagonistas do cálcio (Wanstall e O'Donnell, 1988). Estas mudanças nos movimentos de cálcio podem também justificar as alterações vasculares já mencionadas. A atividade da bomba  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é importante para regulação do tônus vascular e a modulação exercida pelo endotélio na atividade da enzima é alterada com idade, principalmente quando associada à hipertensão (Ponte *et al.*, 1996).

De maneira geral a senescência tende a reduzir tanto a resposta vasodilatadora endotélio-dependente como a capacidade das células endoteliais de liberar óxido nítrico. A influência da senescência na resposta endotélio-dependente varia de acordo com a espécie, agente vasodilatador e leito vascular estudado. A resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina e por agonistas colinérgicos muscarínicos, por exemplo, é reduzida com a idade em diferentes preparações vasculares (Gerhard *et al.*, 1996; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998). Este fenômeno acontece em diferentes espécies

(Donoso *et al.*, 1994; Ragazzi *et al.*, 1995) incluindo seres humanos (Celermajer *et al.*, 1994; Taddei *et al.*, 1995; Gerhard *et al.*, 1996). Este efeito, em humanos, depende do estímulo vasorelaxante (Corretti *et al.*, 1995) e pode ser revertido agudamente pela administração de L-arginina (Chauhan *et al.*, 1996). Ademais, a resposta vasodilatadora endotélio-dependente induzida pela bradicinina é paradoxalmente convertida em contração em vasos de ratos senescentes (Mantelli, Amerini e Ledda, 1995). Da mesma forma, o relaxamento endotélio-dependente induzido por catecolaminas é bloqueado (Arribas *et al.*, 1994), assim como a resposta de estímulos dependentes do fator hiperpolarizante derivado do endotélio está reduzida (Fujii *et al.*, 1993; Nakashima e Vanhoutte, 1993). Barton e colaboradores relacionaram uma resposta inalterada para ACh na artéria femoral de ratos senescentes, comparada com aquela obtida em tecidos de ratos jovens, a uma alta atividade da superóxido dismutase encontrada nesta artéria (Barton *et al.*, 1997).

Quando a senescência está associada à hipertensão, o relaxamento endotélio-dependente está ainda mais reduzido. Além disso, dieta com L-arginina, o substrato da NO sintase, diminui a pressão sanguínea em ratos hipertensos, e esta diminuição é atenuada com a idade (Ikeda *et al.*, 1992). Concordando com o achado de que a senescência abole a resposta vasodilatadora renal à infusão de L-arginina em pacientes com hipertensão essencial (Campo *et al.*, 1996). Estes achados corroboram com a existência de um defeito na vasodilatação endotélio-dependente associado a senescência, o qual contribui para o desenvolvimento da hipertensão arterial. A administração de inibidores da NO sintase, com N-nitro-L-arginina metil éster, produz um aumento no tônus basal da aorta de ratos Wistar-Kyoto (WKY) normotensos que é reduzido com a idade, sendo este aumento menor na aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) da mesma idade (Arribas *et al.*, 1994). Estes resultados sugerem a existência de uma redução ou uma perda na liberação basal de NO nos animais hipertensos e senescentes (Marín e Rodriguez-Martinez, 1997; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998). Tschudi e colaboradores (1996), por exemplo, encontraram uma diminuição na liberação de óxido nítrico na aorta de ratos senescentes. Esta disfunção na resposta vasodilatadora endotélio-dependente foi observada em diferentes leitos vasculares incluindo não apenas artérias de condutância, como a aorta (Belmin *et al.*, 1993; Kung e Lüscher, 1995), artéria carótida (Paterno, Faraci e Heistad, 1994) e artérias coronárias

(Donoso *et al.*, 1994), mas também em vasos de resistência, como o leito vascular mesentérico (Atkinson, Tatchum-Talom e Corman, 1994).

A acetilcolina também pode produzir relaxamento pela liberação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. A hiperpolarização das células do músculo liso induzida por este fator diminui o número de canais de  $Ca^{2+}$  no estado aberto e produz relaxamento (Marin, 1995). Em artérias mesentéricas de ratos, a hiperpolarização causada pela ACh e sua contribuição para o relaxamento estão marcadamente danificados em SHR idosos e ratos WKY, o que explica, pelo menos parcialmente, a redução do relaxamento para com ACh com a idade.

A histamina induz relaxamento por meio da liberação de NO, o qual não sofre alterações com a idade em aorta de rato, no entanto se encontra reduzido em artéria mesentérica de rato (Moritoki, Hosoki e Ishida, 1986) e artérias cerebrais de beagle (Shimizu e Toda, 1986). A histamina também induz relaxamento em parte mediado pela liberação endotelial de prostaciclina ( $PGI_2$ ); Sendo esta liberação menor em artérias mesentéricas do beagle jovem que no beagle idoso (Shimizu e Toda, 1986)

Mudanças com a idade no relaxamento endotélio-dependente podem ser influenciadas por mecanismos envolvidos na liberação de NO. Assim, em artérias coronárias de suíno, a noradrenalina (NA) produz relaxamento endotélio-dependente por meio da estimulação do  $\alpha_2$ -adrenoceptor, a qual se encontra reduzida em suínos senescentes (Murohara *et al.*, 1991). O mesmo autor não encontrou bloqueio na vasodilatação endotélio-dependente induzida por outros agentes, tais como a substância P ou bradicinina na senescência. Da mesma forma, Koga e colaboradores (1989) não encontraram bloqueio na resposta relaxante vascular endotélio-dependente induzido pelo ATP na aorta de SHR senescentes (Koga *et al.*, 1989). O mecanismo implicado na liberação de NO causada pela ativação tanto de  $\alpha_2$ -adrenoceptor pela NA, como receptores muscarínicos  $M_2$  pela ACh, envolve proteínas G. Este mecanismo não está envolvido nas respostas para substância P, bradicinina, ATP, ou cálcio ionóforo A23187. Tais fatos indicam que a liberação de NO, na qual proteínas G estão envolvidas, é mais sensível a efeitos deletérios da senescência. Além disso, baixas

concentrações de NA são capazes de induzir contrações em anéis de aorta de SHR e ratos WKY, no entanto altas concentrações produzem relaxamento (Arribas *et al.*, 1994). Neste caso, a diminuição no relaxamento por NA foi devido a disfunção dos  $\beta$ -adrenoceptores endoteliais permitindo síntese e/ou liberação de NO reduzidas. A dessensibilização desses receptores pode se dever aos elevados níveis plasmáticos de catecolaminas na hipertensão e senescência (Vargas *et al.*, 1986; Veith *et al.*, 1986; Krall, 1981). Além do mais a diminuição da expressão ou alterações de proteínas G, provavelmente devido a redução na fluidez da membrana podem estar envolvidos. Vale salientar que alterações de proteínas G na hipertensão e senescência têm sido associadas a danos também na adenilil ciclase (Feldman *et al.*, 1995).

Outro mecanismo que pode participar da diminuição do relaxamento endotélio-dependente associado com o envelhecimento é a geração de excesso de radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio. Isto pode ser devido a uma redução na defesa antioxidante natural que parece estar associada com a senescência. A nível vascular a interação de NO com radicais livres contribui para a regulação do tônus vascular. Assim, peroxidação lipídica e produtos da peroxidação, os quais parecem aumentar com a idade, podem participar do desenvolvimento de doenças vasculares, tanto quanto do processo de envelhecimento. A lipoperoxidação e produtos da peroxidação que estão aumentados na senescência podem ter papel importante nas alterações vasculares associadas a senescência. Pelo menos, um aumento do estresse oxidativo tem sido observado em tecidos e órgãos de animais e seres humanos senescentes e este fenômeno é geralmente associado com disfunção e morte celular (Anglade *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998; Lenaz, 1998; Naoi e Maruyama, 1999; Ermark e Davies, 2002).

Um aumento na produção de oxidantes e do dano oxidativo a macromoléculas em células senescentes incluindo células endoteliais acontece tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Gutteridge *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1999; Lee e wei, 2001). Por exemplo, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio é um fenômeno inicial no processo aterogênico (Cyrus *et al.*, 2001; Pratico, 2001).

A mitocôndria, como a maior fonte de espécies reativas na célula, tem sido associada a elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio durante o envelhecimento celular (Dufour *et al.*, 2000; Toescu *et al.*, 2000; Kokoszka *et al.*, 2001). Aparentemente, o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial está deficiente na senescência, devido a diminuição de atividade da citocromo c oxidase, aumentando o estresse oxidativo e nível de proteínas com resíduos nitrosotiol (Xin *et al.*, 2003).

Por outro lado, vasodilatações endotélio-independentes são também modificadas com a idade (Fleisch, 1980; Toda e Bian, 1987; Hongo *et al.*, 1988; Docherty, 1990; Tsujimoto, Lee e; Mayhan *et al.*, 1990). O relaxamento induzido por isoproterenol, por exemplo, está reduzido durante o envelhecimento na artéria mesentérica do beagle (Shimizu e Toda, 1986), artéria basilar do coelho (Toda e Hayashi, 1979), veias safena (Ikezono *et al.*, 1987) e dorsal da mão (Pan *et al.*, 1986) humanas, artéria e veia pulmonar do rato (O'Donnell e Wanstall, 1986). Este fato poderia ser atribuído à dessensibilização do  $\beta$ -adrenoceptor devido ao aumento dos níveis de catecolaminas endógenas durante o envelhecimento (Krall *et al.*, 1981; Deischer, Mankani e Hoffman, 1989), ou a um aumento do tônus simpático (Veith *et al.*, 1986).

Diferentes mecanismos podem participar da dessensibilização da estimulação  $\beta$ -adrenérgica com a senescência. Estes mecanismos operam a nível dos próprios  $\beta$ -adrenoceptores, proteínas G, subunidade catalítica da adenilil ciclase, ou em níveis distais a esses fenômenos (Kusiak e Pitha, 1983; Sibley e Lefkowitz, 1985; Tsujimoto, Lee e Hoffman, 1986; Levitzki, 1987; Docherty, 1990; Lefkowitz, Hansdorff e Caron, 1990). Todos esses mecanismos proporcionam o mesmo resultado, isto é, uma produção insuficiente de AMPc após a estimulação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Ziegler, Lake e Kopin, 1976; Docherty, 1990).

Alterações relacionadas à idade no relaxamento endotélio-independente causada por outros agentes são diferentes dependendo do leito vascular, espécie e agente usado. Assim, o relaxamento induzido por papaverina na artéria mesentérica de rato e PGI<sub>2</sub> nas artérias mesentéricas do beagle não se alteram com idade (Shimizu e Toda, 1986). No



entanto, o relaxamento induzido pelo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, reduziu com o envelhecimento no leito vascular mesentérico isolado de ratos normotensos e hipertensos (Amerini *et al.*, 1994). O mesmo ocorre com o relaxamento causado por nitroprussiato de sódio neste leito vascular (Amerini *et al.*, 1994) e na aorta de coelho (Karakı *et al.*, 1985).

As células endoteliais contribuem para a regulação do tônus por liberação de fatores contráteis derivados do endotélio. Dentre esses fatores a endotelina é o agente contrátil mais potente, e a senescência diminui a responsividade dos vasos a este agente talvez devido a regulação decrescente ("downregulation") dos receptores correspondentes (Dohi e Luscher, 1990). Koga e colaboradores (1988) observaram em vasos de ratos WKY idosos (12-25 meses) que a ACh gera fatores contráteis derivados do endotélio, mesmo em ausência da hipertensão. Isto significa que a redução do relaxamento endotélio-dependente com o envelhecimento pode não ser unicamente devido a uma redução da liberação e/ou atividade do NO, mas por uma superprodução de fatores contráteis derivados do endotélio ou a uma hipersensibilidade das células do músculo liso a fatores vasoconstritores, mascarando o efeito dos vasodilatadores (Koga *et al.*, 1988; Koga *et al.*, 1989).

Alterações na resposta contrátil induzida por agonistas adrenérgicos, como a noradrenalina, relacionadas com a senescência, tem sido relatadas. Nesses casos a resposta máxima tende a se mostrar reduzida em preparações arterial isoladas de ratos (Tuttle, 1966; Hayashi e Toda, 1978; Fleisch, 1980; Docherty, 1986; Vanhoutte, 1988; Docherty, 1990; Nielsen *et al.*, 1992;). A redução da resposta à noradrenalina pode ser devida uma diminuição da sensibilidade do vaso, que parece ser secundária a uma diminuição da reserva de  $\alpha_1$ -adrenoceptor ou da densidade de  $\alpha_2$ -adrenoceptor pós-juncional. No entanto, alterações tanto no maquinário contrátil como no mecanismo de transdução de sinal pós-receptor não podem ser excluídos. A resposta vasoconstritora mediada por  $\alpha_1$ -adrenoceptores, além da afinidade e densidade desses receptores não são alteradas pela senescência na artéria carótida de ratos (Benetos *et al.*, 1993).

A contração causada por outras drogas, como 5-hidroxitriptamina (5-HT), histamina e angiotensina II, são pouco alteradas com a senescência. Na verdade, tanto a contração a 5-HT estão aumentadas nas artérias coronárias de ratos senescentes (Nyborg, 1991). Este efeito está associado com aumento da afinidade ao receptor 5-HT<sub>2</sub> e diminuição da reserva deste receptor (Nyborg, 1991). Redução ou alteração não significativa foi observada nas respostas vasoconstritoras à angiotensina II nas artérias mesentéricas de ratos senescentes (Konishi *et al.*, 1997; Moreau *et al.*, 1998).

A senescência não modifica significativamente a resposta máxima contrátil induzida por soluções com alta concentração de cloreto de potássio (KCl), sugerindo que o maquinário contrátil não altera significativamente sua atividade com a idade. Por outro lado, um aumento na resposta ao KCl nas artérias mesentéricas de ratos Wistar-Kyoto foi relatado (Lang *et al.*, 1995), assim como respostas vasoconstritoras diminuídas ao KCl nas artérias mesentéricas e aorta de ratos espontaneamente hipertensos (Lang *et al.*, 1995; Ponte *et al.*, 1996).

Alguns vasoconstritores agem através de mecanismos intracelulares que envolvem a GTPase RhoA, e produzem um componente contrátil tônico que independente de aumentos significativos na concentração de cálcio intracelular (Somlyo e Somlyo, 2002). A transcrição da RhoA quinase está aumentada na artéria basilar e na aorta de ratos senescentes, tanto no endotélio quanto no músculo liso vascular (Miao *et al.*, 2001). Esta GTPase tem um papel regulatório chave, além do tônus, de várias funções celulares como adesão, motilidade celular, crescimento e proliferação celular. Portanto, um aumento anormal na expressão da RhoA vascular na progressão da senescência pode ter efeitos deletérios na vasoreatividade e remodelamento vascular.

Além disso, Marijic e cols. demonstraram, por análise de Western blot, que o número de canais de potássio, de alta condutância, ativados por cálcio (maxi-K ou BK<sub>ca</sub>) está diminuído em torno de 50% nas artérias coronárias de ratos idosos e por técnicas eletrofisiológicas que a densidade da corrente mediada por esses canais está diminuída em cerca de 65% em ratos senescentes (25-30 meses) quando comparados com jovens (3 meses). Este mesmo fenômeno foi demonstrado em artérias coronárias de

humanos, nos quais a densidade do canal diminuiu em aproximadamente 45% (indivíduos de 61 a 70 anos) quando comparados com indivíduos mais jovens (19 a 56 anos) (Toro *et al.*, 2002).

Portanto, a senescência parece estar associada com diminuição na disponibilidade/atividade do NO que em conjunto com a redução na densidade/atividade do canal BK<sub>ca</sub>. Este mecanismo, nas artérias coronárias por exemplo, pode significar uma dramática redução na capacidade vasorelaxante desses vasos na senescência. Esse fenômeno se agrava quando se considera as evidências de perda de outras substâncias vasodilatadoras (p.ex. prostaciclina) e aumento da influência de vasoconstritores.

Por outro lado, algumas alterações relatadas na resposta contrátil dos vasos na senescência podem ser devidas a distúrbios na função das células endoteliais. A remoção do endotélio aumenta a resposta contrátil a vários agonistas, como noradrenalina e 5-HT (Angus e Cocks, 1989) e portanto, a disfunção endotelial pode ter consequências semelhantes. A resposta contrátil a agonistas muscarínicos secundária à liberação de produtos endoteliais derivados da ciclooxigenase está aumentada com a senescência em ratos normotensos e hipertensos (Koga *et al.*, 1988, 1989). A potente vasoconstrição induzida pela endotelina está reduzida na aorta (Barton *et al.*, 1997), não alterada na artéria femoral (Barton, 1997) ou aumentada nas arteríolas mesentéricas (Moreau *et al.*, 1998) de ratos senescentes.

Por outro lado, a produção de prostaciclina em cultura de células endoteliais da aorta está diminuída com senescência (Nakajima *et al.*, 1997).

Várias evidências indicam que a senescência e a disfunção do endotélio cursam paralelamente. Em alguns desses estudos, homens >35-40 anos e mulheres > 50 anos apresentavam vasodilatação induzida por aumento de fluxo diminuída em relação a controles jovens indicando uma perda da função endotelial, apesar do início do processo acontecer mais tardiamente em mulheres (Celermajer *et al.*, 1994; Jensen-Urstad e Johansson, 2001).

A resposta a acetilcolina na circulação coronariana também está diminuída com o aumento da idade. Este fenômeno acontece em todas as seções (proximal, média e distal) da artéria descendente anterior esquerda e das artérias circumflexas esquerdas, com início da disfunção endotelial detectado em média aos 30 anos de idade (Yasue *et al.*, 1990; Zeiher *et al.*, 1993). Além do mais a acetilcolina contraiu a maioria dos segmentos no grupo de pacientes mais idosos, incluindo aqueles com angiografia normal (Yasue *et al.*, 1990).

Pesquisas utilizando a medida do fluxo de vasos de resistência do antebraço de humanos também mostraram que a resposta vasodilatadora a acetilcolina em indivíduos normotensos é menor a medida que a idade aumenta. Tanto a resposta vasodilatadora máxima a acetilcolina (Taddei *et al.*, 2001) como a inclinação da curva dose-resposta ao análogo metacolina (Gerhard *et al.*, 1996) estão diminuídas na quarta década de vida (30-39 anos) quando comparadas com indivíduos na terceira década (20-29 anos). Essas respostas vasodilatadoras continuam a diminuir entre aproximadamente 15 a 50% após os 60 anos (Gerhard *et al.*, 1996; Taddei *et al.*, 2001). A administração de vitamina C, um removedor de radicais livres, foi capaz de reverter parcialmente a capacidade dos vasos de responder à acetilcolina nos idosos mas não nos jovens (Taddei *et al.*, 2001), corroborando para um aumento do estresse oxidativo como fator subjacente diminuindo a disponibilidade/atividade dos fatores relaxantes derivados do endotélio.

Experimentalmente, o relaxamento a acetilcolina está dramaticamente bloqueado em anéis de aorta de ratos senescentes e pré-contraídos com noradrenalina (Tschudi *et al.*, 1996). Ademais, anéis de aorta e da artéria carótida pré-contraídos com fenilefrina, e então incubados com inibidor da NOS (metiléster de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina), desenvolvem um incremento na contração que é maior em animais jovens comparados com animais senescentes (Hamilton, 2001). O que sustenta uma diminuição na síntese, disponibilidade ou atividade do NO na senescência. Uma diminuição da disponibilidade de NO nas artérias de ratos Wistar Kyoto senescentes é reforçada pelo fato de que os níveis de superóxido estão concomitantemente aumentadas (Hamilton *et al.*, 2001). Esse ânion reage rapidamente com NO gerando peroxinitrito e inativando NO. Por outro lado, medidas diretas de NO *in situ* demonstraram que tanto a taxa de liberação de NO e o pico da concentração de NO estão drasticamente diminuídas em aortas de ratos de

meia idade (18-19 meses) e senescentes (32-33 meses) (Tschudi *et al.*, 1996). Esses resultados apontam para mecanismos mistos, incluindo diminuição da síntese e da disponibilidade do NO.

No modelo de artérias mesentéricas pressurizadas e pré-contraídas com fenilefrina em meio contendo guanetidina, a resposta vasodilatadora induzida por campo elétrico transmural está diminuída em ratos senescentes (26 meses) (Sullivan e Davidson, 2001). Esse relaxamento é dependente de NO endotelial (Buga e Ignarro, 1992) e inibido significativamente por inibidor da síntese de NO (Sullivan e Davidson, 2001). Ainda nas artérias mesentéricas de ratos, foi demonstrado que a produção de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) está aumentada com a senescência secundariamente a uma expressão aumentada de prostaglandina H sintetase-2 (Stewart *et al.*, 2000).

A senescência também diminui substancialmente os relaxamentos induzidos por agentes que incrementam os níveis de AMPc intracelular (p.ex., forskolina e IBMX) nas aorta e artérias mesentéricas (Gaballa *et al.*, 2000). Esse dado parece apontar para uma falha também na via de transdução de sinal intracelular para o AMPc no próprio músculo liso. No entanto, Hinschen e cols. (2001), demonstraram que na aorta e artérias mesentéricas de ratos a resposta ao nitrovasodilatador, nitroprussiato de sódio, em concentrações acima de 10 nM não variaram com a idade. Contudo, a resposta vasodilatadora obtida com a concentração menor (3 nM) foi levemente reduzida em animais senescentes (Hinschen *et al.*, 2001). Neste sentido, Gaballa e cols. (2000) demonstraram que a resposta ao trinitrato de glicerila (NTG) está significativamente diminuída em anéis de aorta de ratos Fisher 344 senescentes (23 meses).

Por outro lado, em seres humanos não foi demonstrada nenhuma alteração relacionada com a idade na resposta ao nitrovasodilatador SNP ou NTG em diferentes leitos vasculares (Gerhard *et al.*, 1996; Taddei *et al.*, 2001; Celermajer *et al.*, 1994; Yasue *et al.*, 1990).

Além do mais, muitos órgãos como pulmões, pele, articulações e ossos perdem sua elasticidade. Estas alterações estão aceleradas em pacientes diabéticos, que sofrem de elasticidade pulmonar diminuída, e particularmente de enrijecimento arterial e aterosclerose prematura. A observação de que a matriz extracelular dos tecidos afetados em pacientes diabéticos, consistindo de colágeno de longa meia-vida, exhibe glicosilação-não-enzimática aumentada (Kennedy e Baynes, 1984), proveu as bases para a correlação entre hiperglicemia e complicações diabéticas (Vogt, Scheicher, Wieland, 1982; Lyons e Kennedy, 1985; Brownlee, Cerami e Vlassara, 1988).

Na senescência, também acontece um incremento, da glicosilação de proteínas do tecido conectivo, e.g., na aorta ou tendões (Scheilecher e Wieland, 1986), colágeno na pele de humanos (Dunn *et al.*, 1991; Dyer *et al.*, 1993) e em proteínas da retina humana (Dunn *et al.*, 1989) sugerindo que este processo está relacionado com o desenvolvimento de distúrbios, e.g., catarata, vasculopatias, associados à senescência. Ademais, a reação de glicação pode prosseguir ainda mais *in vivo* para iniciar uma complexa série de reações oxidativas, de clivagens e rearranjos que levam ao acúmulo de produtos fluorescentes, amarronzados, protease e ácido resistentes chamados de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) que estão também implicados nos distúrbios associados à senescência (Pongor *et al.*, 1984; Monnier, Kohn e Cerami, 1984; Chang *et al.*, 1985; Sell e Monier, 1989; Ledl e Schleicher, 1990; Bucala e Cerami, 1992; Makita *et al.*, 1992). Além do mais, esses compostos podem sofrer glicoxidação na presença de oxigênio, processo este dependente da participação de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (Smith e Thornalley, 1992). Uma vez que estas reações são irreversíveis, têm-se sugerido que seus produtos, como a carboximetil-lisina e a pentosidina, por exemplo, possam ser usados como biomarcadores do estresse oxidativo acumulado ao qual o tecido foi exposto (Schleicher, Wagner e Nerlich, 1997). Por exemplo, tanto a pentosidina quanto a carboximetil-lisina, se acumulam naturalmente em proteínas teciduais na pele, pulmões, coração, rins, intestino, discos intervertebrais, retina e particularmente nas artérias na senescência (Schleicher, Wagner e Nerlich, 1997) e em taxas mais aceleradas na diabetes (Dunn *et al.*, 1989, Dunn *et al.*, 1991, Dyer *et al.*, 1993; Sell *et al.*, 1993). Altos níveis desses produtos também foram encontrados em células espumosas e em placas ateroscleróticas (Schleicher, Wagner e Nerlich, 1997) indicando uma possível papel desses compostos no desenvolvimento

destas lesões. Um aumento os níveis teciduais desses produtos, ajustado pela idade, está correlacionado com a severidade da retinopatia e nefropatia na diabetes (Sell *et al.*, 1992; MacCance *et al.*, 1993) e com processo degenerativos associados à senescência (Sell e Monnier, 1989; Schleicher, Wagner e Nerlich, 1997) sugerindo que as reações de glicoxidação e o estresse oxidativo, podem ser mecanismos importantes nesses processos.

Por outro lado, Challah e colaboradores (1997) demonstraram um aumento no número de células endoteliais circulantes, provavelmente relacionado com um “turnover” de células endoteliais associado à senescência. Estes mesmos autores encontraram na aorta de ratos com 30 meses de idade uma expressão diminuída de RNA mensageiro para a isoformas constitutiva e induzida da enzima óxido nítrico sintase (NOSe e NOSi), diminuição da concentração de GMPc na parede arterial e diminuição na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma e pulmões.

Woodman e colaboradores (2002), demonstraram uma diminuição na expressão da NOSe e da SOD-1 associada à senescência na artérias do músculo soleus de ratos. Estas artérias estão envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético durante exercício (Williams e Segal, 1993). A capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo para o soleus e gastrocnêmio durante o exercício está bloqueado em ratos senescentes (Irion, Vasthare e Tuma, 1987).

Outras alterações estruturais foram demonstradas que podem contribuir para os distúrbios de natureza vascular associados a senescência. O diâmetro luminal da carótida e da aorta de ratos e seres humanos, por exemplo, aumenta progressivamente e regularmente com a idade, de maneira independente dos níveis de pressão arterial (Cox, 1977; Toda *et al.*, 1980; Michel *et al.*, 1994). Portanto, a senescência modifica o estresse hemodinâmico e tanto a função como o fenótipo do endotélio e do músculo liso vascular e estas alterações em conjunto determinam a diminuição da função vascular na senescência.

## 1.6. Glutation - GSH

O Glutation ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) é um tripeptídeo endógeno apresentando atividades de antioxidante, antitoxina e cofator enzimático. O GSH está presente em animais, plantas, e microorganismos, e sendo hidrossolúvel é encontrado principalmente no citosol das células e em outras fases aquosas do sistema vivo (Meister, 1994; Kehrez, 1994; Lomaestro e Malone, 1995). Normalmente, a concentração intracelular do glutacion chega a níveis milimolares, ocorrendo em concentrações intracelulares de 0,5 a 10 mM. Em contraste, as concentrações extracelulares de GSH são normalmente de 3 a 4 ordens de magnitude abaixo. O Glutation existe em dois estados: o glutacion reduzido (GSH) e a forma oxidada (GSSG). Essas formas são interconversíveis (ciclo redox) por ação das enzimas GSSG redutase, transformando GSSG em GSH e da GSSG peroxidase formando GSSG a partir de GSH. O GSH está presente principalmente dentro da célula na forma reduzida. Para manter o estado redox da célula, o GSSG gerado durante stress oxidativo deve ser reduzido através da ação da GSSG redutase, que utiliza NADPH como cofator. Em condições normais, a redutase GSSG é bastante efetiva para manter a maioria do GSH celular em seu estado reduzido (mais de 98% GSH) (Wang e Ballatori, 1998). Porém, em casos de estresse oxidativo severo ou quando a atividade das GSSG redutase está diminuída, a capacidade da célula para reduzir GSSG pode ser afetada, conduzindo a ao acúmulo de GSSG dentro do citosol. A relação de GSSG/GSH é um indicador sensível de stress oxidativo. (Meister, 1994). Na célula saudável, a forma oxidada (GSSH), raramente excede 10 % do glutacion total da célula. No meio intracelular o GSH parece ser um indicador sensível da saúde global da célula e a depleção de GSH pode ativar apoptose celular (Slater, Stefan e Nobel, 1995; Duke, Ojcius e Young, 1996).

A síntese de glutacion ocorre dentro da célula em duas etapas. Cada etapa utiliza um mol de ATP para cada mol de produto. Na primeira etapa, são combinadas cisteína e glutamato (com ação da enzima  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase) e nesta etapa a disponibilidade de cisteína é um fator limitante da reação. A cisteína é originada do aminoácido essencial metionina, da degradação de proteínas da dieta ou do "turnover" das proteínas endógenas. A enzima  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase por sua vez é inibida por concentrações elevadas de GSH, funcionando como um mecanismo de controle



## 1.6. Glutation - GSH

O Glutation ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) é um tripeptídeo endógeno apresentando atividades de antioxidante, antitoxina e cofator enzimático. O GSH está presente em animais, plantas, e microorganismos, e sendo hidrossolúvel é encontrado principalmente no citosol das células e em outras fases aquosas do sistema vivo (Meister, 1994; Kehrez, 1994; Lomaestro e Malone, 1995). Normalmente, a concentração intracelular do glutatión chega a níveis milimolares, ocorrendo em concentrações intracelulares de 0,5 a 10 mM. Em contraste, as concentrações extracelulares de GSH são normalmente de 3 a 4 ordens de magnitude abaixo. O Glutation existe em dois estados: o glutatión reduzido (GSH) e a forma oxidada (GSSG). Essas formas são interconvertíveis (ciclo redox) por ação das enzimas GSSG redutase, transformando GSSG em GSH e da GSSG peroxidase formando GSSG a partir de GSH. O GSH está presente principalmente dentro da célula na forma reduzida. Para manter o estado redox da célula, o GSSG gerado durante stress oxidativo deve ser reduzido através da ação da GSSG redutase, que utiliza NADPH como cofator. Em condições normais, a redutase GSSG é bastante efetiva para manter a maioria do GSH celular em seu estado reduzido (mais de 98% GSH) (Wang e Ballatori, 1998). Porém, em casos de estresse oxidativo severo ou quando a atividade das GSSG redutase está diminuída, a capacidade da célula para reduzir GSSG pode ser afetada, conduzindo a ao acúmulo de GSSG dentro do citosol. A relação de GSSG/GSH é um indicador sensível de stress oxidativo. (Meister, 1994). Na célula saudável, a forma oxidada (GSSH), raramente excede 10 % do glutatión total da célula. No meio intracelular o GSH parece ser um indicador sensível da saúde global da célula e a depleção de GSH pode ativar apoptose celular (Slater, Stefan e Nobel, 1995; Duke, Ojcius e Young, 1996).

A síntese de glutatión ocorre dentro da célula em duas etapas. Cada etapa utiliza um mol de ATP para cada mol de produto. Na primeira etapa, são combinadas cisteína e glutamato (com ação da enzima  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase) e nesta etapa a disponibilidade de cisteína é um fator limitante da reação. A cisteína é originada do aminoácido essencial metionina, da degradação de proteínas da dieta ou do "turnover" das proteínas endógenas. A enzima  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase por sua vez é inibida por concentrações elevadas de GSH, funcionando como um mecanismo de controle

negativo da síntese. Na segunda etapa ocorre a adição da gama-glutamilcisteína e glicina gerando GSH. Esse passo é catalisado pela GSH sintetase (Wang e Ballatori, 1998).

A degradação metabólica do GSH, por sua vez, acontece no espaço extracelular. O GSH, por ação das GSH S-transferases, é conjugado no meio intracelular com formação de conjugados S-cisteína, os quais são transportados para o espaço extracelular na superfície apical celular. Nesse ponto, sofrem a ação da  $\gamma$ -glutamil transpeptidase ( $\gamma$ -GT) e de dipeptidases, formando na reação  $\gamma$ -glutamil e glicina, respectivamente (Meister, 1988 ; Hinchman *et al.*, 1991).

O alto potencial redox faz do GSH um antioxidante potente por si só e um cofator conveniente para reações enzimáticas que requerem elétrons emparelhados prontamente disponíveis (Deleve e Kaplovitz, 1991). O poder redutor também é a chave das ações múltiplas do GSH a nível molecular, celular e tecidual, agindo como uma antitoxina sistêmica. A molécula de glutation reduzida consiste em três aminoácidos - ácido glutâmico, cisteína e glicina covalentemente unidas. O grupamento sulfidril (-SH) do resíduo de cisteína confere à molécula seu caráter redutor (Meister, 1994).

O glutation tem também a função de “estocar” cisteína, uma vez que este aminoácido se autoxida naturalmente de maneira rápida, em cistina, a qual é um composto dissulfeto citotóxico (Olney *et al.*, 1990). A toxicidade dessa reação de auto-oxidação faz com que a maioria das cisteínas não protéicas seja armazenada como GSH (Deleve e Kaplowitz, 1991). O GSH realiza um papel principal de detoxificação de muitos metabólitos através da conjugação espontânea ou catalisada pela GSH S-transferase (Boyland e Chasseaud, 1969; Jakoby, 1978; Mannervik, 1985; Coles e Ketterer, 1990; Hinchman e Ballatori, 1994).

O GSH exerce uma variedade de funções fisiológicas e metabólicas importantes em todas as células de mamíferos, inclusive o detoxificação de radicais livres, metais e outras combinações electrofílicas (Ballatori, 1994; Deleve e Kaplowitz, 1991; Meister e Tate, 1976; Meister e Anderson, 1983). O GSH forma complexos metálicos por reações não enzimáticas apresentando assim um papel importante no

transporte, armazenamento e metabolismo de metais (Ballatori, 1994).

Por outro lado, o ácido ascórbico e GSH estão entre as substâncias redutoras mais ativas em tecidos vivos (Meister, 1994; Winkler *et al.*, 1994). Ambas substâncias sofrem ciclo redox *in vivo* e parecem ter uma interrelação significativa neste ciclo. Por exemplo, os efeitos tóxicos da deficiência de GSH podem ser prevenidos administrando-se ascorbato (Meister, 1994). Reciprocamente, GSH parece ser requerido para a regeneração de ácido ascórbico de sua forma oxidada, dihidroascorbato. O mecanismo para a conversão posterior envolve uma redução de dois-elétron do dihidroascorbato provavelmente por GSH, com a formação de intermediário do ácido GSH-ascórbico conjugado (Meister, 1994; Winkler *et al.*, 1994).

Um mecanismo de detoxificação importante envolve a ligação do GSH a substâncias químicas electrofílicas e a exportação do S-conjugado do GSH resultante da célula. GSH forma tioéter conjugados com leucotrienos, prostaglandinas, hepoxilina, óxido nítrico, hidroxialcenos, ácido ascórbico, dopa, dopamina e ácido maléico e forma tioéster com cisteína, coenzima A, proteínas, e outros tióis celulares. A ligação de GSH para estes compostos endógenos possui vários papéis importantes: limitar e regular a reatividade das substâncias químicas; facilitar o transporte da membrana e eliminação por células do organismo; e em alguns casos, conduzir a formação de mediadores biológicos essenciais (Ignarro, 1990).

Neste sentido, alguns autores postularam que NO é estabilizado por uma molécula que preserva sua atividade biológica. Espécies de tiol reduzidas são candidatas para este papel, como elas reagem prontamente na presença de NO biologicamente ativo sendo o S-nitrosotiol mais estável e possivelmente mais potente, que NO *per se* (Ignarro *et al.*, 1981; Mendelsohn *et al.*, 1990). Há evidências que parte da atividade do NO seja devida a S-nitrosotióis gerados da reação do NO com tióis intracelulares, tais como SH-cisteína ou GSH (Ignarro, 1990; Myers *et al.*, 1990). S-nitrosotióis apresentam a mesma ação do NO; com efeitos mais potentes e mais duradouros, como vasodilação e inibição da agregação plaquetária via aumento de GMPc (Ignarro *et al.*, 1981; Mellion *et al.*, 1983). Estas observações sugerem que grupos de S-nitrosotióis possam servir como intermediários no metabolismo celular ou bioativação do NO e que a formação deles pode representar um mecanismo regulador celular importante (Stamler *et al.*, 1992).

Neste sentido, a S-nitrosoglutationa (GS-NO) foi encontrada endogenamente em neutrófilos e nas vias aéreas de seres humanos em concentrações micromolares (Gaston *et al.*, 1993; Clancy *et al.*, 1994). A GS-NO pode gerar NO após redução por um elétron, e vários investigadores tem sugerido que o papel fisiológico do NO pode ser mediado por GS-NO ou S-nitrosotióis de baixo peso molecular semelhantes à GS-NO (Mendelsohn *et al.*, 1990; Armstrong e Aduela, 1973). Além disso, os S-nitrosotióis foram propostos como intermediários biologicamente ativos no metabolismo de nitrato orgânicos (Ignarro *et al.*, 1981; Mellion *et al.*, 1983; Loscalzo, 1985).

Ademais, foi demonstrado que o GSH é necessário para a síntese e liberação de NO (Cooke *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1991; Hecker *et al.*, 1992; Ghigo *et al.*, 1993). O GSH aumenta a síntese e liberação de NO em culturas de células endoteliais e espécies de tióis reduzidos reagem produzindo S-nitrosotióis biologicamente ativo que são mais estáveis e mais potentes que NO *per si*. (Cooke *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1991; Hecker *et al.*, 1992). A incubação de GSH em anéis de aorta de coelhos e ratos aumenta os níveis de tióis intracelulares e aumenta a vasodilatação endotélio-dependente (Cooke *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1991; Hecker *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1998). Alguns autores também demonstraram que o captopril aumenta o relaxamento vascular endotélio-dependente e que este efeito está relacionado ao seu grupamento tiol, uma vez que o enaprilato, outro inibidor da enzima conversora de angiotensina, que não possui grupo tiol não apresentou nenhum efeito (Lawson *et al.*, 1991; Goldschmidt e Tallarida, 1991).

A síntese de NO é prejudicada quando há depleção do GSH nas células endoteliais da veia umbilical humana, sugerindo que a síntese de NO requer a presença de GSH e que o GSH pode ter papéis diferentes na síntese de NO e nos seus efeitos, tais como: agir como um cofator redutor na produção de NO em conjunto com NADPH; prevenir a inativação da NO sintase através de radicais intermediários ou do próprio NO e favorecer a conversão de NO para GS-NO que é relativamente mais estável que NO (Ghigo *et al.*, 1993).

Por outro lado, o dano oxidativo é um fator que contribui no desenvolvimento e complicações do diabetes. (Wohaleb e Godin, 1987; Baynes, 1991; Giugliano, Ceriello e Paolisso, 1996; Tesfamariam, 1994). Por exemplo, alguns estudos

relataram diminuição nos níveis de glutathion (GSH) intracelular e sérico e que a reposição de glutathion protegia ratos da neuropatia e nefropatia diabéticas (Dincer *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 2002). O GSH, aplicado por infusão intravenosa, melhorou também as respostas endotélio-dependentes na circulação coronariana de pacientes diabéticos (Kugiyama *et al.*, 1998).

A concentração de glutathion plasmática também diminui com o envelhecimento em humanos (Samiec *et al.*, 1998). Pelo fato da glutathion ser um importante cofator para enzimas antiperoxidativas que protegem a parede vascular, uma diminuição nos níveis plasmáticos com o avanço da idade poderia representar também um fator de risco para o desenvolvimento da disfunção vascular associada a senescência

Além do mais, o GSH pode funcionar como uma coenzima em várias reações catalisadas por enzima, inclusive a reação da glioxalase (Meister e Anderson, 1983), enzima chave na detoxificação de aldeídos tóxicos geradores de AGEs que são fatores subjacentes importantes na gênese das complicações vasculares da diabetes e senescência.

### 1.7. Ácido Lipóico

Em 1937, um componente do extrato de batata, denominado “fator de crescimento da batata”, foi identificado como sendo necessário para o crescimento de *Lactobacillus* (Snell *et al.*, 1937). Trabalhos subsequentes culminaram com isolamento e purificação do composto ativo em 1951 (Reed *et al.*, 1951). O composto foi identificado como ácido  $\alpha$ -lipóico (AL; sinonímia- 1,2-dithiolano-3-ácido pentanóico, ácido tióctico), contendo oito carbonos com grupamento ditiol e um centro quiral.

AL é sintetizado em vários organismos vivos desde a bactéria ao homem. Em humanos, é sintetizado no fígado e outros tecidos, onde funciona como um cofator em complexos multienzimáticos de desidrogenase, tais como a piruvato desidrogenase. A piruvato desidrogenase está localizada na mitocôndria onde cataliza a descarboxilação oxidativa de piruvato a acetil-CoA, um passo crítico no metabolismo oxidativo da glicose. Assim, AL exerce um papel essencial nas vias específicas da mitocôndria que

geram energia através da glicose (Fujiwara *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 1995). Neste processo, o AL atua como um cofator. Se liga a grupamentos acyl e transferem estes de uma parte do complexo enzimático para outra. Neste processo, o ácido lipóico é reduzido a ácido dihidrolipóico (DHLA), o qual é subsequentemente reoxidado pela lipoamida desidrogenase (Lip-DH) com a formação de NADH. Dessa forma, o ácido lipóico e o DHLA atuam como uma associação redox, carregando elétrons do substrato da desidrogenase para o  $\text{NAD}^+$ .

O ácido  $\alpha$ -lipóico é capaz de atuar como antioxidante em em meio aquoso e lípido, tanto na forma oxidada como na reduzida. Apresenta também a vantagem de ser bem absorvido por via oral. Devido essas vantagens e sua baixa toxicidade, o ácido alfa-lipóico representa um potencial agente terapêutico nas condições clínicas associadas com danos ocasionados por radicais livres. Packer, Witt e Tristschler (1995), apresentam o ácido alfa-lipóico como um antioxidante ideal pela sua capacidade e especificidade de sequestrar radicais livres, pela atividade quelante de metal, pela interação com outros antioxidantes, e pelos efeitos na expressão gênica. O ácido alfa-lipóico é capaz de sequestrar radicais hidroxil, ácido hipocloro e singlet oxigênio, porém não peróxido de hidrogênio, peroxil, e superóxido (Suzuki *et al.*, 1991; Scott, 1994; Paswswater, 1995).

O ácido lipóico se liga a proteínas e, conseqüentemente, não pode ser encontrado na sua forma livre na circulação (Hermann *et al.*, 1996). No entanto, depois da aplicação terapêutica, a forma livre pode ser encontrada na circulação (Teichert e Preiss, 1995).

Na polineuropatia diabética, o ácido lipóico livre pode penetrar no tecido nervoso e prevenir danos oxidativos relacionados à glicose (Gerreke *et al.*, 1997).

Modelos experimentais utilizando ratos diabéticos por estreptozotocina demonstraram que o ácido lipóico retarda nestes animais o início da polineuropatia (Cameron *et al.*, 1993; Vertommen *et al.*, 1994; Nagamatsu *et al.*, 1995). Achados clínicos mostraram que o ácido lipóico tem efeitos benéficos na polineuripatia após período de 3 semanas da administração. Estes efeitos consistem na redução da dor e parestesia (Ziegler *et al.*, 1995).

Nossa dieta diária contém ácido lipóico, especialmente em alimentos derivados de tecidos com alta atividade metabólica (Herbert e Guest, 1975; Mattulat e Baltes, 1992). A maior parte do ácido lipóico se origina de complexos multienzimáticos. Enzimas proteolíticas não degradam efetivamente a ligação peptídica entre ácido lipóico e lisina. Portanto, tem sido sugerido que, depois da digestão o ácido lipóico é absorvido como lipoilisina (Mattulat, 1992). Ademais, o ácido lipóico pode ser obtido por síntese *de novo* através de ácidos graxos e cisteína (Carreau, 1979; Spoto *et al.*, 1982). Em quaisquer dos casos, oriundo da dieta ou biossíntese, somente pequenas quantidades de ácido lipóico livre alcançam a circulação. Após uma administração oral, o ácido lipóico livre é obtido relativamente em altas concentrações. A dose terapêutica excede muito à ingestão de ácido lipóico da dieta e em humanos superior a 1200 mg IV (Ziegler *et al.*, 1995).

A meia vida plasmática é de aproximadamente de 30 min. O valor do clearance plasmático foi o mesmo encontrado no fluxo plasmático do fígado (cerca de 11-17ml/min/ kg). A biodisponibilidade absoluta foi calculada estar entre 20% e 38% dependendo do isômero e da formulação (Gerreke Ph. B. *et al.*, 1997).

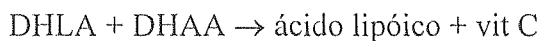
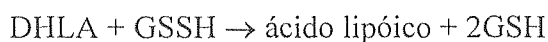
Nenhum efeito nocivo foi encontrado mesmo depois da administração de 1g de ácido lipóico. A injeção (i.v.) de 1200mg de ácido lipóico induziram reações adversas tais como náuseas ou vômitos em 28 de 86 pacientes diabéticos (Ziegler *et al.*, 1995).

O ácido lipóico pode ser reduzido para o ditiol DHLA. Esta forma reduzida contribui fortemente para atividade antioxidante do ácido lipóico *in vivo*. Mais importante é a redução enzimática do ácido lipóico. Na mitocôndria, a desidrogenase do ácido lipóico, LipDH, pode também realizar a reação reversa da 2-oxo desidrogenase ácida. Esta cataliza a redução de ácido lipóico livre com gasto de NADH. No citosol, GSH redutase catalisa a redução com gasto de NADPH.

DHLA é um forte redutor, é capaz de reduzir grupos dissulfeto, tão bem quanto o ácido lipóico. Após a administração do ácido lipóico racêmico, R-DHLA e ácido S-lipóico irão coexistir no mesmo compartimento celular. A redução não-enzimática de um isômero pela forma reduzida de outros pode ocorrer.

Quelação de metal consiste em uma propriedade de um composto que pode resultar tanto em atividade antioxidante como pró-oxidante. A atividade antioxidante é obtida quando um complexo é formado no qual o metal é protegido e todos os sítios de coordenação para O<sub>2</sub> são ocupados. Além disso, a atividade antioxidante é obtida quando a densidade eletrônica é retirada do metal para o quelante, dessa forma os elétrons não poderão ser transferidos para o O<sub>2</sub>. Foi demonstrado que o ácido lipóico forma complexos com Mn<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup> (Sigel, 1982; Sigel e Prijs, 1978).

O ácido lipóico, depois de sua redução para o DHLA, é capaz de contribuir para a regeneração não-enzimática de GSH e vitamina C, que são moléculas endógenas que fazem parte da regeneração de antioxidantes oxidados.



A ocorrência destas reações têm sido confirmadas pela medição da formação de GSH (Bast e Haenen, 1988) e de vitamina C (Haenen e Bast, 1989) na presença de DHLA.

No camundongo, os níveis totais de GSH foram aumentados nas células de tecidos do fígado, rim e pulmão depois da administração de ácido lipóico (Busse *et al.*, 1992). Em contraste, o ácido lipóico não afetou os níveis de GSH ou GSSH no nervo ciático de ratos saudáveis (Nagamatsu *et al.*, 1995). Em animais submetidos a estresse oxidativo, o ácido lipóico previniu a depleção de GSH em todos os experimentos reportados (Maitra *et al.*, 1995; Nagamatsu *et al.*, 1995).

A neuropatia diabética experimental induzida pela estreptozotocina apresenta-se com um déficit no fluxo sanguíneo de 50% e promove hipóxia (Kihara *et al.*, 1995; Cameron *et al.*, 1991; Cameron *et al.*, 1994; Stevens *et al.*, 1994). Além do mais, a isquemia induzida pela hiperglicemia e a peroxidação lipídica auto-oxidativa têm sido postuladas como causas da neuropatia (Low *et al.*, 1989). Similarmente, o nervo periférico diabético está mais sujeito a sofrer degeneração isquêmica da fibra do que os nervos normais (Nukada, 1992).



O ácido lipóico corrige de maneira dose-dependente o déficit na condução e perfusão nervosa, e na glutatona reduzida (Nagamatsu *et al.*, 1995), além de diminuir a peroxidação lipídica (Nagamatsu *et al.*, 1995).

De acordo com o Professor Lester Packer (Universidade da Califórnia, Berkeley), AL tem um potencial redox de aproximadamente  $-325\text{mV}$ , ao mesmo tempo que o valor para a vitamina C é de aproximadamente  $290\text{mV}$ . A Glutaciona, o outro principal antioxidante endógeno, tem um potencial de  $-250\text{mV}$ , sendo oxidada e reduzida mais rapidamente, AL, portanto, é considerado o antioxidante mais potente (Packer *et al.*, 1995).

AL tem sido considerado um potente candidato terapêutico para aumentar o metabolismo energético e diminuir o estresse oxidativo. AL pode parcialmente reverter o declínio na função da mitocôndria e aumento no estresse oxidativo associado com o envelhecimento.

Radicais livres são moléculas altamente reativas aos produtos oriundos de todas as células como os resultantes do metabolismo normal, ou de estados patológicos ou do processo de envelhecimento. A produção excessiva de radicais livres ou sua neutralização inadequada por antioxidantes, proporciona danos nas proteínas, lipídios e no DNA. Devido seu essencial papel no metabolismo celular, as mitocôndrias são as principais produtoras de radicais livres dentro da célula. De acordo com o Professor Bruce Ames (Universidade da Califórnia, Berkeley), um indivíduo produz aproximadamente 1 quilograma de radicais de oxigênio por ano, a consequência disso é aproximadamente 100000 “ataques” oxidativos ao DNA mitocondrial por célula cada ano. O efeito cumulativo destes ataques ao DNA mitocondrial proporciona um dano funcional acelerado (Packer *et al.*, 1995).

O grau de danos provocados por radicais livres está diretamente relacionado à idade (Michikawa *et al.*, 1999). Este fato se torna evidente através de observações nas quais ratos jovens têm aproximadamente 25000 DNA oxidativos danificados, ao mesmo tempo em que ratos velhos têm mais de 75000 DNA oxidativos danificados. Os radicais livres produzidos pela mitocôndria são do mesmo tipo que aqueles produzidos na

O ácido lipóico corrige de maneira dose-dependente o déficit na condução e perfusão nervosa, e na glutathiona reduzida (Nagamatsu *et al.*, 1995), além de diminuir a peroxidação lipídica (Nagamatsu *et al.*, 1995).

De acordo com o Professor Lester Packer (Universidade da Califórnia, Berkeley), AL tem um potencial redox de aproximadamente  $-325\text{mV}$ , ao mesmo tempo que o valor para a vitamina C é de aproximadamente  $290\text{mV}$ . A Glutathiona, o outro principal antioxidante endógeno, tem um potencial de  $-250\text{mV}$ , sendo oxidada e reduzida mais rapidamente, AL, portanto, é considerado o antioxidante mais potente (Packer *et al.*, 1995).

AL tem sido considerado um potente candidato terapêutico para aumentar o metabolismo energético e diminuir o estresse oxidativo. AL pode parcialmente reverter o declínio na função da mitocôndria e aumento no estresse oxidativo associado com o envelhecimento.

Radicais livres são moléculas altamente reativas aos produtos oriundos de todas as células como os resultantes do metabolismo normal, ou de estados patológicos ou do processo de envelhecimento. A produção excessiva de radicais livres ou sua neutralização inadequada por antioxidantes, proporciona danos nas proteínas, lipídios e no DNA. Devido seu essencial papel no metabolismo celular, as mitocôndrias são as principais produtoras de radicais livres dentro da célula. De acordo com o Professor Bruce Ames (Universidade da Califórnia, Berkeley), um indivíduo produz aproximadamente 1 quilograma de radicais de oxigênio por ano, a consequência disso é aproximadamente 100000 “ataques” oxidativos ao DNA mitocondrial por célula cada ano. O efeito cumulativo destes ataques ao DNA mitocondrial proporciona um dano funcional acelerado (Packer *et al.*, 1995).

O grau de danos provocados por radicais livres está diretamente relacionado à idade (Michikawa *et al.*, 1999). Este fato se torna evidente através de observações nas quais ratos jovens têm aproximadamente 25000 DNA oxidativos danificados, ao mesmo tempo em que ratos velhos têm mais de 75000 DNA oxidativos danificados. Os radicais livres produzidos pela mitocôndria são do mesmo tipo que aqueles produzidos na

O ácido lipóico corrige de maneira dose-dependente o déficit na condução e perfusão nervosa, e na glutathiona reduzida (Nagamatsu *et al.*, 1995), além de diminuir a peroxidação lipídica (Nagamatsu *et al.*, 1995).

De acordo com o Professor Lester Packer (Universidade da Califórnia, Berkeley), AL tem um potencial redox de aproximadamente  $-325\text{mV}$ , ao mesmo tempo que o valor para a vitamina C é de aproximadamente  $290\text{mV}$ . A Glutathiona, o outro principal antioxidante endógeno, tem um potencial de  $-250\text{mV}$ , sendo oxidada e reduzida mais rapidamente, AL, portanto, é considerado o antioxidante mais potente (Packer *et al.*, 1995).

AL tem sido considerado um potente candidato terapêutico para aumentar o metabolismo energético e diminuir o estresse oxidativo. AL pode parcialmente reverter o declínio na função da mitocôndria e aumento no estresse oxidativo associado com o envelhecimento.

Radicais livres são moléculas altamente reativas aos produtos oriundos de todas as células como os resultantes do metabolismo normal, ou de estados patológicos ou do processo de envelhecimento. A produção excessiva de radicais livres ou sua neutralização inadequada por antioxidantes, proporciona danos nas proteínas, lipídios e no DNA. Devido seu essencial papel no metabolismo celular, as mitocôndrias são as principais produtoras de radicais livres dentro da célula. De acordo com o Professor Bruce Ames (Universidade da Califórnia, Berkeley), um indivíduo produz aproximadamente 1 quilograma de radicais de oxigênio por ano, a consequência disso é aproximadamente 100000 “ataques” oxidativos ao DNA mitocondrial por célula cada ano. O efeito cumulativo destes ataques ao DNA mitocondrial proporciona um dano funcional acelerado (Packer *et al.*, 1995).

O grau de danos provocados por radicais livres está diretamente relacionado à idade (Michikawa *et al.*, 1999). Este fato se torna evidente através de observações nas quais ratos jovens têm aproximadamente 25000 DNA oxidativos danificados, ao mesmo tempo em que ratos velhos têm mais de 75000 DNA oxidativos danificados. Os radicais livres produzidos pela mitocôndria são do mesmo tipo que aqueles produzidos na

radiação ionizante, fazendo com que o Professor Ames se refira às mitocôndrias como “mini-Chernobyls”.

Hagen, Lykkesfeldt, Ames e colaboradores relataram que a suplementação, pôr duas semanas, com AL (0,5%) na dieta de ratos idosos reverteu o dano associado ao envelhecimento no conteúdo e biosíntese de ascorbato (vitamina C) em hepatócitos (Lykkesfeldt *et al.*, 1998). O mesmo grupo demonstrou que AL reverteu o declínio associado ao envelhecimento no consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial em hepatócitos e aumentou o potencial de membrana mitocondrial em ratos (Hagen *et al.*, 1999). O tratamento com AL também reverteu o declínio no conteúdo de glutatona e a lipoperoxidação associados ao envelhecimento. Os benefícios no metabolismo da mitocôndria e no status antioxidante de ratos idosos mediados pela suplementação de AL foi refletido por uma significativa melhora na atividade motora.

O papel do incremento do estresse oxidativo nos processos promovendo arterosclerose está relativamente bem estabelecido (Diaz *et al.*, 1997; Greenberg e Spom, 1996; Schmidt *et al.*, 1994) Várias linhas de pesquisa sugerem fortemente que a resistência insulínica e a diabetes mellitus estão também associadas com o aumento do estresse oxidativo e produção de radicais livres (Giugliano *et al.*, 1995; Paolisso *et al.*, 1994; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1997). A produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, assim como a diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes têm sido sugeridas como presentes no desenvolvimento da diabetes tipo I e tipo II em pacientes (Wolff *et al.*, 1991; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1988). Muitas das vias bioquímicas (e. g. glicação de proteínas, via dos polióis, autoxidação da glicose) estão associadas com a hiperglicemia e podem também resultar em aumento da produção de radicais livres.

Estudos clínicos utilizando doses de 600 mg de ácido  $\alpha$ -lipóico 1x, 2x, ou 3x pôr dia mostraram redução nos níveis de lipoperóxidos no plasma (Borcea *et al.*, 1999), redução nos sintomas da neuropatia (Ruhnau *et al.*, 1999), e um aumento na sensibilidade à insulina na diabetes tipo-II (Jacob *et al.*, 1995). Uma dose de 600mg/dia em uma pessoa de 60-70kg é aproximadamente 10mg/kg de peso vivo, a qual é similar à dose usada em ratos. Investigações adicionais têm utilizado diferentes doses de AL, de

10 a 100mg/kg de peso vivo para seus estudos experimentais com animais diabéticos, nos quais não foram reportados efeitos tóxicos (Maritim *et al.*, 2003).

Tem sido reportado que o tratamento com ácido  $\alpha$ -lipóico reduz o desenvolvimento de complicações diabéticas tais quais a retinopatia (Obrosova *et al.*, 2000), formação de catarata (Obrosova *et al.*, 1998; Maitra *et al.*, 1995; Borenshtein *et al.*, 2001), neuropatia (Ziegler e Gries, 1997; Ford *et al.*, 2001; Kishi *et al.*, 1999), complicações vasculares (Kocak *et al.*, 2000; Heitzer *et al.*, 2001) e nefropatia (Morcos *et al.*, 2001; Kishi *et al.*, 1999; Arivazhagan *et al.*, 2000). Em adição as suas propriedades antioxidantes, existe a evidência de que o ácido  $\alpha$ -lipóico pode prevenir a destruição das células  $\beta$  que promove a diabetes tipo I (Packer, 1998), aumento da captação de glicose na diabetes tipo II (Evans e Goldfine, 2000; Jacob *et al.*, 1996; Jacob *et al.*, 1995; Khamaisi *et al.*, 1999; Estrada *et al.*, 1996) e prevenir a glicação de algumas proteínas, como albumina (Suzuki *et al.*, 1992; Kawabata e Packer, 1994). No entanto, Maritim e colaboradores (2003) demonstraram que tanto o total de hemoglobina glicada como o de HbA<sub>1C</sub>, os quais estão elevados em ratos diabéticos, não foram significativamente reduzidos após 14 dias de tratamento com ácido  $\alpha$ -lipóico.

Não existem relatos de efeitos deletérios com o tratamento com ácido  $\alpha$ -lipóico, o qual tem uma DL<sub>50</sub> de aproximadamente 400-500mg/kg em ratos.

A incubação com ácido  $\alpha$ -lipóico tem demonstrado proteger as células endoteliais contra o estresse oxidativo induzido por alta concentração de glicose (Du *et al.*, 1999) e, em modelos diabéticos, o ácido  $\alpha$ -lipóico tem demonstrados efeitos benéficos na função vascular (Stevens *et al.*, 2000) e endotelial (Keegan *et al.*, 1999).

O ácido  $\alpha$ -lipóico e sua forma reduzida, ácido diidrolipóico (DHLA), reagem com espécies reativas de oxigênio tais como radicais de superóxido, radicais hidroxil, ácido hipocloroso, radicais peroxil e oxigênio (Packer *et al.*, 1995).

Heitzer e colaboradores (2001) demonstraram que doses terapêuticas de AL atenuam a disfunção endotelial em pacientes diabéticos pôr aumento da vasodilatação mediada pôr óxido nítrico (NO) produzido no endotélio. No entanto AL não obteve

efeitos significantes na vasodilatação endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio. Além disso, os efeitos benéficos de AL foram bloqueados pelo inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), L-NMMA, indicando que na presença de AL a atividade da via L-arginina-NO está aumentada (Heitzel *et al.*, 2001).

As mitocôndrias são as organelas celulares que fornecem ATP para o metabolismo e ajuda a manter a homeostase do cálcio dentro da célula. Apesar da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ser um sistema muito eficiente, a natureza de alternar um elétron pôr reações de oxidação e redução predispõe a cada eletron carrear reações laterais com moléculas de oxigênio.

A diminuição da resultante mitocondrial pode causar produção de energia inadequada e/ou a perdida homeostase do cálcio. Tais mudanças podem resultar em apoptose celular não “autorizada” promover um declínio metabólico geral evidente no envelhecimento.

Arivazhagan e colaboradores (2001) mostraram que há um aumento dos níveis de lipoperoxidação e glutaciona oxidada e uma diminuição no conteúdo de glutaciona reduzida, ácido ascórbico, e  $\alpha$ -tocoferol na mitocôndria de fígado e rim de ratos idosos quando estes comparados a ratos jovens. Um aumento idade-dependente na produção de radicais livres na mitocôndria inevitavelmente eleva o dano oxidativo na própria, assim como dentro da célula (Ozawa, 1997; Wei, 1998). Em adição, o declínio no NADPH suprime a redução de glutaciona oxidada pela glutaciona redutase promovendo assim a formação de hidroperóxido e lipoperóxido (Bandyopadhyay *et al.*, 1999).

Condições de estresse oxidativo elevado promovem a perda dos grupamentos tiol da proteína (GSH) em proteínas chave e adversamente afeta o transporte do substrato necessário para a função mitocondrial.

O ácido  $\alpha$ -lipóico melhora a função mitocondrial através de uma série de mecanismos. A administração de ácido lipóico estimula a captação de glicose dentro das células insulino-dependente e independentes (Streeper *et al.*, 1997) e aumenta o metabolismo oxidativo e não-oxidativo da glicose. O ácido lipóico também tem

demonstrado aumentar a atividade de síntese de ATP (Zimmer *et al.*, 1991), a qual em combinação com o aumento da utilização da glicose provavelmente aumentaria o metabolismo celular total.

Estudo sugere que os níveis de ácidos lipóico estão diminuídos na diabetes e que a neuropatia ocorrente nesta patologia resulta deste déficit (Maher, 2000)

O tratamento de ratos Zucker, resistentes à insulina, com ácido lipóico aumentou o metabolismo da glicose tanto oxidativo como não oxidativo, e reduziu a resistência insulínica (Jacob *et al.*, 1996). O ácido lipóico também previniu o desenvolvimento da hipertensão, o aumento da produção de ânion superóxido na aorta, e a resistência insulínica em ratos alimentados com glicose (Midaoui *et al.*, 2002). Conseqüentemente, uma significativa correlação entre o nível da pressão sanguínea e o grau de produção basal de superóxido mitocondrial no coração foi observado neste estudo.

Rudich e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento com ácido lipóico protege contra o dano no transporte de glicose, estimulado pela insulina, induzido pelo estresse oxidativo em adipócitos. Outros estudos demonstram que o ácido lipóico reduz o estresse oxidativo mesmo em pacientes diabéticos com um pobre controle glicêmico (Borcea *et al.*, 1999).

Em adição, Midaoui e colaboradores (2003) sugerem que os efeitos antihipertensivos e hipoinsulinêmicos do ácido lipóico podem estar relacionados com a redução do estresse oxidativo, como mostrado pela diminuição na produção de superóxido mitocondrial do coração em ratos alimentados cronicamente com glicose.

A administração de ácido lipóico a ratos Zucker obesos aumenta a captação de glicose estimulada pela insulina no músculo (Streeper *et al.*, 1997). Além disso, Maddux e colaboradores (2001) mostraram que o ácido lipóico protege as células musculares do estresse oxidativo induzido pela resistência insulínica.

Três vias têm sido propostas para explicar os mecanismos pelos quais a hiperglicemia promove complicações cardiovasculares: através da ativação de isoformas da proteína cinase C (Koya e King, 1998), através da via da aldose redutase (Lee *et al.*,

demonstrado aumentar a atividade de síntese de ATP (Zimmer *et al.*, 1991), a qual em combinação com o aumento da utilização da glicose provavelmente aumentaria o metabolismo celular total.

Estudo sugere que os níveis de ácidos lipóico estão diminuídos na diabetes e que a neuropatia ocorrente nesta patologia resulta deste déficit (Maher, 2000)

O tratamento de ratos Zucker, resistentes à insulina, com ácido lipóico aumentou o metabolismo da glicose tanto oxidativo como não oxidativo, e reduziu a resistência insulínica (Jacob *et al.*, 1996). O ácido lipóico também previniu o desenvolvimento da hipertensão, o aumento da produção de ânion superóxido na aorta, e a resistência insulínica em ratos alimentados com glicose (Midaoui *et al.*, 2002). Conseqüentemente, uma significativa correlação entre o nível da pressão sanguínea e o grau de produção basal de superóxido mitocondrial no coração foi observado neste estudo.

Rudich e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento com ácido lipóico protege contra o dano no transporte de glicose, estimulado pela insulina, induzido pelo estresse oxidativo em adipócitos. Outros estudos demonstram que o ácido lipóico reduz o estresse oxidativo mesmo em pacientes diabéticos com um pobre controle glicêmico (Borcea *et al.*, 1999).

Em adição, Midaoui e colaboradores (2003) sugerem que os efeitos antihipertensivos e hipoinsulinêmicos do ácido lipóico podem estar relacionados com a redução do estresse oxidativo, como mostrado pela diminuição na produção de superóxido mitocondrial do coração em ratos alimentados cronicamente com glicose.

A administração de ácido lipóico a ratos Zucker obesos aumenta a captação de glicose estimulada pela insulina no músculo (Streeper *et al.*, 1997). Além disso, Maddux e colaboradores (2001) mostraram que o ácido lipóico protege as células musculares do estresse oxidativo induzido pela resistência insulínica.

Três vias têm sido propostas para explicar os mecanismos pelos quais a hiperglicemia promove complicações cardiovasculares: através da ativação de isoformas da proteína cinase C (Koya e King, 1998), através da via da aldose redutase (Lee *et al.*,



1995) como também através do aumento da formação de AGE (Brownlee, 1995). Essas três vias têm recentemente sido postuladas como consequência de um mecanismo comum constituído pela superprodução de superóxido mitocondrial induzido pela hiperglicemia.

Na nefropatia diabética, o aumento do estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia tem sido documentado em todos os três componentes do córtex renal, i.e., glomérulo (Horie *et al.*, 1997; Reddi e Bollineni, 1997), túbulo-interstício (Dobashi *et al.*, 1991), e vasculatura (Schnackenberg e Wilcox, 2001), e tem sido implicada na expansão mesangial da matriz extracelular (Cooper, 2001; Melhem *et al.*, 2002) e outros eventos iniciais e tardios da nefropatia diabética, i. e., taxa de filtração glomerular aumentada (Lal *et al.*, 2000), excreção de albumina urinária e proteinúria (Cooper, 2001; Melhem *et al.*, 2002; Melhem *et al.*, 2001), glomeruloesclerose (Cooper, 2001; Trachtman *et al.*, 1995) e fibrose tubular intersticial (Trachtman *et al.*, 1995). Estudos em modelos animais de diabetes revelaram que algumas destas anormalidades funcionais e morfológicas podem ser prevenidas por antioxidantes. (Cooper *et al.*, 2001; Melhem *et al.*, 2002; Lal *et al.*, 2000; Melhem *et al.*, 2001; Trachtman *et al.*, 1995).

Obrosova e colaboradores (2003) demonstraram que o ácido lipóico previniu parcialmente ou completamente as mudanças induzidas pelo diabetes na fisiologia renal. O o ácido  $\alpha$ -lipóico causou uma diminuição dramática de 5x na concentração de F<sub>2</sub>-isoprostano (produto do ácido araquidônico, marcador de lipoperoxidação) no córtex renal, e previniu parcialmente a acumulação de malondialdeído (MDA, marcador de lipoperoxidação), reverteu a depleção de GSH e ácido ascórbico (AA) induzida pela diabetes e aumentou as taxas de GSSH/GSH e de DHAA/AA. Estudos prévios dos efeitos do ácido  $\alpha$ -lipóico nas concentrações de MDA e GSH no córtex renal, também confirmam estes achados (Melhem *et al.*, 2002; Trachtman *et al.*, 1995). O efeito antioxidante do ácido  $\alpha$ -lipóico é também manifestado pela de diminuição (2.8 X) na atividade extramitocondrial da NADH-oxidase e por uma supregulação das enzimas da defesa antioxidante, i.e., SOD, GSSG redutase, e GSH transferase. O efeito na NADH-oxidase provavelmente está relacionado ao importante papel do ácido  $\alpha$ -lipóico na sinalização redox (Roy *et al.*, 1997; Sen, 1998).

No coração de ratos diabéticos, altas doses de ácido  $\alpha$ -lipóico primeiramente normalizaram a captação e utilização de glicose, e conseqüentemente normalizaram a captação de oxigênio, níveis de ATP miocárdial, e o rendimento cardíaco, ao mesmo tempo que com um dose baixa de ácido  $\alpha$ -lipóico houve a normalização da produção de lactato e piruvato (Strodter *et al.*, 1995). Em outro estudo a administração de ácido  $\alpha$ -lipóico previniu a diabetes em 70% dos animais induzidos. Acreditou-se que este efeito foi secundário ao efeito exercido pelo DHLA na supressão da liberação de NO por macrófagos envolvidos na promoção da inflamação celular (Faust *et al.*, 1994).

A administração de uma dose aguda de ácido  $\alpha$ -lipóico (1000mg IV) a pacientes com diabetes tipo II causou um aumento da disponibilidade de glicose estimulada pela insulina em 50% dos pacientes (Jacob, 1995).

Na Alemanha, AL tem sido utilizado pôr 30 anos no tratamento da neuropatia diabética e cirrose hepática (Packer *et al.*, 1995; Halliwell, 1995; Ziegler *et al.*, 1999).

De acordo com Haugard e Haugard (1970) AL estimula a utilização de glicose no músculos hemidiafragmático de rato *in vitro*. Mais recentemente estudos têm identificado que a administração de AL a ratos obesos Zucker (*fa/fa*) aumenta a captação de glicose estimulada pela insulina no músculo (Jacob *et al.*, 1996; Henriksen *et al.*, 1997; Streeper *et al.*, 1997). Em adição, em ratos diabéticos e não-diabéticos em jejum, AL causou hipoglicemia aguda pôr diminuição da produção hepática (Khamaisi *et al.*, 1999). Este efeito na produção hepática da glicose poderia ser atribuído a um efeito do AL diretamente no fígado ou no tecido adiposo, onde a liberação de ácidos graxos livres regula a produção hepática da glicose (Randle *et al.*, 1988).

### 1.8. Rutina

Flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos que são largamente distribuídos no reino vegetal. Atualmente mais de 4000 variedades de flavonóides são conhecidas. Muito tem baixa toxicidade em mamíferos e alguns são utilizados na prática médica para manutenção da integridade capilar (Cesarone *et al.*, 1992). Os flavonóides exibem várias ações biológicas como antiinflamatória, anti-hepatotóxica e anti-

ulcerativa (Bors *et al.*, 1990, Formica e Regelson *et al.*, 1995). Também inibem atividade enzimática como as da aldose redutase, ciclooxigenase, enzima conversora de angiotensina e xantina oxidase, por exemplo, (Rajnarayana *et al.*, 2001). São potentes antioxidantes e “scavengers” de radicais livres. Muitos têm ação antialérgica e antiviral e alguns promovem proteção contra doenças cardiovasculares.

Pertencem a este grupo de compostos fenólicos oriundos de plantas cujo isolamento e identificação de propriedades biológicas foi primeiramente descrita por Szent-Gyorgyi em 1936, o que lhe valeu o prêmio Nobel de medicina de 1937 (Formica e Regelson, 1995).

Os flavonóides foram primeiramente identificados como vitamina P, os quais em conjunto com a vitamina C possuem importante capacidade de manutenção da integridade da parede capilar e resistência (Havsteen, 1983; Gabor, 1988).

Os flavonóides são classificados em: flavanas (p.ex., catequinas e meciadonol), flavanonas (p.ex., taxifolin, narigenina e naringina), flavona (p.ex. luteolin e apigenina) e flavonóis (p.ex. quercetina, miricetina, fisetina, kaempferol, galangina, rutina e quercetrina) (Formica e Regelson, 1995).

A maioria dos flavonóides entra na dieta humana como glicosídeos, com rutina e quercetrina como os mais comuns (Bokkenheuser e Winter, 1988). A natureza hidrofílica dos glicosídeos seu peso molecular relativamente alto (p.ex. rutina, 610,5 daltons) faz com que a absorção no intestino delgado seja baixa (Brown, 1980).

Ademais, flavonóides do grupo dos  $\beta$ -glicosídeos, incluindo a rutina (quercetina-rutosídeo), resistem a ação das hidrolases intestinais e conseqüentemente passam em grande parte inalterados até intestino grosso. A microflora residente do intestino grosso produz glicosidases capazes de liberar a aglicona do seu açúcar e assim é absorvida em maior quantidade (Formica e Regelson, 1995). Esse processo foi verificado em humanos e em estudos com animais (Kühnau, 1976; Gugler *et al.*, 1975; Murota e Terao 2003).

O potencial dos flavonóides, suplementados na dieta, tem sido estudada na prevenção do estresse oxidativo relacionado a doenças crônicas tais como doença arterial coronariana e diabetes (Hertog *et al.*, 1993; Skibola e Smith, 2000; Murota e Terao, 2003). A maioria dos flavonóides se apresenta como glicosídeos nos quais um ou mais grupamentos de açúcar estão ligadas a grupos fenólicos por pontes glicosídicas (Herrmann, 1976). Numerosos estudos *in vitro* têm revelado diversas ações biológicas da quercetina, incluindo indução de apoptose, antimutagênese, inibição da proteína quinase-C (PKC), inibição da lipoxigenase, inibição da liberação de histamina, atividade semelhante a superóxido dismutase (SOD), modulação do ciclo celular, inibição da angiogênese e inibição da enzima conversora de angiotensina-II (Formica e Regelson, 1995).

O anel catecol (o-dihidroxil), que possui dois grupos hidroxila em posições vizinhas, é muito superior que outras disposições na capacidade redutora e, portanto os flavanóis, incluindo rutina que contém este anel podem exercer poderosa atividade removedora de espécies reativas (Bors *et al.*, 1990; Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996). Desta maneira tem se demonstrado que flavonóides contendo um grupo catecol (3- e 4-OH) no anel B (rutina and monohidroxietyl rutosídeo) ou um anel-A e C com três grupos -OH (3-, 5- and 7-OH) são potentes removedores de espécies reativas de oxigênio (p.ex., superóxido) e de nitrogênio (p.ex., peroxinitrito) (Heijnen *et al.*, 2001; van Acker *et al.*, 1996).

A atividade antioxidante destes compostos também é explicada por sua capacidade de quelar metais de transição, como o ferro, por exemplo, que tem um papel crucial na geração de espécies altamente reativas através de reações de Fenton (Brown *et al.*, 1998).

Paganga e Rice-Evans (1997) e Aziz *et al.* (1998) em estudos farmacocinéticos, demonstraram a presença de rutina no plasma de seres humanos na forma de glicosídeo. O pico de concentração ( $C_{\text{máx}}$ ), após administração oral de 100 mg, foi de 196 ng/mL (no tempo de aprox. 1 hora após administração) e após 48 h ainda havia níveis detectáveis. No entanto, Manach e cols. (1998) e Moon e cols. (2000) demonstraram que não eram as formas glicosídicas da quercetina, rutina incluída, mas seus metabólitos

se acumulam na circulação em concentrações que oscilam entre 100 nM/L e 10 µM/L após ingestão de uma dieta rica nos glicosídeos.

Ishii, Furuta e Kasuya (2001) utilizando HPLC determinaram a presença de quercetina no plasma de humanos e urina utilizando a fase de extração sólida e detecção ultravioleta. A administração de rutina (200 mg/Kg) a voluntários sadios permite detectar níveis de quercetina na urina e plasma superiores a sete ng/mL no plasma e 35 ng/mL na urina.

Moon e cols. 2001, isolou o metabólito quercetin 3-O-b-D-glucuronide (Q3GA) no plasma de rato após administração oral e demonstrou que o mesmo possui considerável atividade removedora de espécies reativas por conservar o núcleo catecol.

A toxicidade da rutina foi avaliada através da suplementação dietética de ratos Wistar nas concentrações de 0; 0,2; 1 e 5% durante 13 semanas. Nenhuma mortalidade ou sinal clínico adverso foi observado durante o período experimental em nenhum dos grupos. O grupo de animais que recebeu rutina na concentração de 5% apresentou redução significativa nos triglicerídeos séricos. Os exames histopatológicos dos principais órgãos não revelaram alterações digna de nota (Hasumura *et al.*, 2004).

Vários autores demonstraram um efeito vasodilatador para quercetina, kaempferol e rutina, entre outros flavanóides, o qual foi relacionado a vários mecanismos, entre eles: diminuição do influxo de cálcio transmembrana (Ko *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 1993a), e efeitos inibitórios nas fosfodisterases do AMPc e GMPc (Beretz *et al.*, 1979) ou na proteína quinase C (Duarte *et al.*, 1993a, 1993b). Ademais, Herrera e cols. Demonstraram que a rutina é capaz de inibir contrações tônicas induzidas por ativadores da PKC, como o PMA (miristato de forbol).

Utilizando anéis de aorta torácica isolada de rato e pré-contraídos com noradrenalina, Nishida e Satoh (2004) demonstraram que a rutina até uma concentração de 100 µM apresenta uma fraca atividade vasorelaxante.

Por outro lado, Ajay, Gilani e Mustafa (2003) demonstraram que a quercetina e rutina possuíam potente atividade vasorelaxante em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídas com fenilefrina ou solução despolarizante ( $K^+$  80 mM) com maior inibição das resposta induzidas por fenilefrina. Esta atividade vasorelaxante foi correlacionada com aumento da liberação do óxido nítrico e prostaciclina, além da inibição do influxo de cálcio e liberação de cálcio intracelular.

Os flavonóides protegem LDL da oxidação e inibem a aterogênese (Furhman e Aviran, 2002). Uma vez que a gênese e perpetuação da vasculite diabética que culmina com aterosclerose é um processo reconhecidamente inflamatório, a prevenção da angiopatia diabética deve considerar este fenômeno (Fuster, Badimin e Badimon, 1992). Neste sentido, Morikawa e colaboradores (2003) demonstraram que a quercetina tem ação antiinflamatória na dose de 10 mg/Kg quando administrada uma hora antes do desafio com carragenina no modelo de bolsa de ar subcutânea em ratos. O volume de exsudato, a quantidade de proteína total e células no exsudato foi significativamente reduzida no grupo tratado com quercetina. As concentrações de  $PGE_2$ ,  $TNF-\alpha$ , e do RNAm para cicloxigenase-2 também estavam diminuídas nestes ratos. O exame histopatológico estava compatível com a diminuição do processo inflamatório no grupo tratado com quercetina. Todos estes efeitos foram similares em ratos tratados com isoquercitrina ou rutina o que sugere que o substituinte açúcar não interfere no efeito anti-inflamatório destes flavonóides. Ademais, Selloum e colaboradores demonstraram que a administração oral de rutina (100 mg/Kg) reduz o edema de pata induzido por fMLP (fMet-Leu-Phe). A migração de neutrófilos em câmaras de migração *in vitro* também é inibida de maneira dose-dependente quando se usa fMet-Leu-Phe como agente quimiotático (Selloum *et al.*, 2001).

Zhao e cols (2003) demonstraram que a rutina remove oxidantes derivados do peroxinitrito. O maior parte do peroxinitrito (ONOO-/ONOOH) formado em sistemas biológicos é oriundo da reação entre óxido nítrico e superóxido. A decomposição do peroxinitrito produz (30-35%) radical carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), os quais são intermediários com atividade oxidante forte e grandes responsáveis pela toxicidade do peroxinitrito. A rutina, neste estudo, foi demonstrada ser um eficiente removedor destes agentes oxidantes.

A atividade antioxidante e citoprotetora da rutina e quercetina foram demonstradas em modelos de lipoperoxidação. A atividade de scavenger de superóxido foi demonstrada e mostrou ser superior a do ácido ascórbico. Estes agentes também demonstraram possuir atividade quelante de metais produzindo complexos estáveis com metais de transição como  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ . Os flavonóides também protegeram macrófagos isolados dos danos induzidos por asbestos e este efeito citoprotetor tem alta correlação com capacidade de remover superóxido (Potapovich e Kostyuk, 2003).

A rutina e quercetina inibem a glicação de proteínas de músculo esqueléticos e renais *in vitro*, inibindo completamente a formação de frutoselisina, um marcador de estágio inicial de glicação. A formação de produtos de glicação avançada também é inibida com a incubação prévia de rutina (Nagasawa *et al.*, 2003a).

Além do mais, em animais diabéticos por estreptozotocina, a rutina foi capaz de inibir a glicação de proteínas no músculo esquelético, rim e plasma e este efeito foi correlacionado também com diminuição do estresse oxidativo nestes animais. A concentração de N(ε)-frutoselisina, um marcador precoce de glicação, no músculo e rim, está significativamente aumentada no diabetes e é diminuída de maneira significativa pelo tratamento dos ratos com rutina. Produtos de glicação avançada (AGEs) em proteínas do soro e rim também foram reduzidas em ratos tratados com rutina. A suplementação dietética com rutina também inibiu, de maneira menos potente, a atividade da aldose redutase nestes animais (Nagasawa *et al.*, 2003b).

Oh e colaboradores (2003) demonstraram *in vitro* que a rutina possui atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina com concentração efetiva para inibir 50 % da atividade enzimática de 278  $\mu\text{g/mL}$ .

Por outro lado, a quercetina, miricetina e kaempferol inibiram a formação de ácido úrico da xantina pela xantina oxidase, enquanto a rutina não teve efeito à geração de radicais ânions superóxidos por esse sistema foi determinado tanto pela redução do citocromo C quanto pela luminescência da folasina. A degradação de superóxido foi observada apenas pela miricetina e em pequena extensão pela rutina. Todos os flavonóides testados inibiram a formação de superóxido nos neutrófilos estimulados por

fMet-Leu-Phe. A rutina inibiu a deflagração *burst* oxidativo dos neutrófilos da mesma forma que wortmannin e LY294002, dois inibidores da fosfoinositídeo-3-quinase. Além disso, a rutina inibiu a atividade dessa enzima, enquanto os três outros flavonóides não apresentaram efeito (Selloum *et al.*, 2001).

A rutina é um antioxidante bioflavonóide e apresenta atividade inibitória da glicação não enzimática de maneira semelhante a aminoguanidina (Odetti *et al.*, 1990). Similarmente, Nagasawa e cols. (2003b) demonstraram que as proteínas séricas e renais de ratos diabéticos têm grandes quantidades de frutose lisina, um marcador precoce do processo de glicosilação. A suplementação oral de G-rutina reduziu o aumento do conteúdo de frutose lisina nas proteínas renais em ratos diabéticos em 20%. A G-rutina ainda suprimiu o acúmulo de AGEs nas proteínas séricas e renais em ratos diabéticos. A rutina dietética também inibiu significativamente a atividade da aldose redutase nos rins, mas não no fígado.

Os flavonóides tem vários grupos hidroxil-fenólicos em suas estruturas e tem sido mostrada sua inibição da modificação oxidativa do LDL (Cook e Samman, 1996).

Gryglewski e cols. (1987) demonstraram a atividade antitrombótica e trombolítica da quercetina e rutina as quais envolvem uma ação inibitória sobre a lipoxigenase e a cicloxigenase.

Além do mais, Vessal, Hemmati e Vasei (2003), relataram o efeito hipoglicemiante significativo da quercetina em ratos diabéticos por estreptozotocina sem afetar os níveis glicêmicos de animais normoglicêmicos além de melhorar a tolerância à glicose em testes específicos. Ademais diminuiu os níveis de colesterol e triglicérides significativamente. Estes dados corroboram com os achados prévios de Nuraliev e Avezov (1992) em animais diabéticos por aloxana, nos quais a quercetina além de efeito hipoglicemiante diminuiu os níveis de colesterol e LDL.

### **1.9. Inositóis: Ação da Insulina e Resistência Insulínica**

A família de esteroisômeros de inositóis incluem mio-, cis-, epi-, alo-, neo-, escilo-inositol e os isômeros ópticos D e L-quiros-inositóis.



O mio-inositol é o mais largamente abundante e distribuído na natureza. Este composto é biossintetizado a partir da glicose (Daughaday, Larner e Hartnett, 1955), sendo que a enzima chave que converte frutose-6-fosfato a mio-inositol foi clonada mais recentemente (Dean-Johnson e Henry, 1989). *D*-quiro-inositol é produto da epimerização da hidroxila #3 do mio-inositol (figura x). Este composto tem sido encontrado em plantas e insetos. Um composto abundante em plantas é o pinitol, o 3-*o*-metil éter extraído do pinheiro (Anderson, 1953).

A presença de pequenas quantidades de *D*-quiro-inositol em tecidos humanos e animais foi relatada, incluindo tecido de granulação de ratos (Williamson *et al.*, 1986), placenta humana, urina humana e soro de pacientes urêmicos (Niwa *et al.*, 1983) em relação a quantidades muito maiores de *D*-quiroinositol. Também foi identificado quiro-inositol em conjunto com mio-inositol numa fração lipídica mista de glicosilfosfatidilinositol obtida de fígado de rato e células de linhagem H35 de hepatoma humano, sem no entanto, se obter a configuração absoluta do quiroinositol (Mato *et al.*, 1987). Subsequentemente, dois fosfoglicanos de inositol, mediadores putativos da ação da insulina, foram purificados do fígado de rato. Um deles ativa a enzima piruvato desidrogenase e é composto por *D*-quiroinositol e galactosamina, enquanto o outro tem a capacidade de inibir as enzimas adenilil ciclase e quinase dependente de AMPc e é composta por mio-inositol e glucosamina (Larner *et al.*, 1988). A caracterização parcial destes mediadores, sugerem similaridades com os glicosilfosfatidilinositóis (GPIs). Os IPG-A foram postulados ser originados de moléculas de ancoramento do tipo GPI, os quais servem para fixar, na face externa da membrana, através de ligações covalentes, proteínas e o resíduo fosfoetanolamina do componente glicano do GPI. A ação sequencial de uma protease e uma fosfolipase libera o IPG-A (Romero *et al.*, 1988).

Um sistema de sinalização intracelular da insulina envolvendo a intermediação de moléculas conhecidas como mediadores putativos da insulina tem sido proposto operar em conjunto com a cascata de tirosina quinase (Larner *et al.*, 1990). Por este mecanismo de ação hormonal, a insulina regula a clivagem de um glicolípido ou

precursor proteinado para gerar diacilglicerol e inositolglicano que seriam putativos segundos mensageiros. A estrutura química precisa destes mediadores putativos não foi ainda esclarecida. No entanto, duas famílias distintas de mediadores têm sido identificadas baseados em dois inositóis e dois componentes hexosamina. Os inositolglicanos do tipo A (IPG-A), assim denominado pela sua atividade inibitória sobre a proteína quinase dependente de AMP<sub>c</sub>, contém mio-inositol e glucosamina. Os do tipo P (IPG-P), contém *D*-quiro-inositol e galactosamina e ativam a enzima piruvato desidrogenase fosfatase e a glicogênio sintetase, duas enzimas chaves limitantes do metabolismo oxidativo e não oxidativo, respectivamente, da glicose. Este glicoinositol cuja estrutura completa e síntese química foi recentemente publicada (Larner *et al.*, 2003) produz uma resposta semelhante à insulina *in vivo*, diminuindo rapidamente concentração de glicose plasmática a níveis de euglicemia quando administrado intravenosamente a ratos diabéticos sem produzir hipoglicemia (Huang *et al.*, 1993; Fonteles *et al.*, 1996; Larner *et al.*, 2003). Este composto também aumenta a sensibilidade de células do hepatoma H4IIE à ação da insulina no sentido de incorporar a [<sup>14</sup>C]-glicose em glicogênio. Também ativa *in vitro*, quando quelado ao Mn<sup>2+</sup>, a fosfatase da piruvato desidrogenase, a qual desfosforila e ativa a piruvato desidrogenase, assim como a fosfoproteína fosfatase PP1 e PP2C que por sua vez desfosforilam e ativam a glicogênio sintetase (Huang *et al.*, 1999; Larner, 2001). Portanto, estes compostos mimetizam algumas das ações intracelulares da insulina para regular o metabolismo da glicose. Estes compostos agem em adição ao clássico sistema tirosina quinase através do “bypass” do receptor de insulina, ativando IRS2 após fosforilação da tirosina por ação de tirosina quinases intracelulares (Müller *et al.*, 1998).

IPG-A em doses micromolares estimula a lipogênese, captação da 2-deoxiglicose, translocação de GLUT-4, inibe a lipólise e inibe a atividade da proteína quinase A em adipócitos pré-tratados com glicose ou glicosamina para dessensibilizá-los à ação da insulina ou em adipócitos normais. Todas as ações foram dose-dependentes. Ademais este composto estimulou a glicogênese e ativação da glicogênio sintetase no diafragma de rato de maneira dose-dependente. Interessantemente, este composto também sensibilizou a ação da insulina neste modelo (Muller *et al.*, 1997). Um dissacarídeo sintético, 3-O-metil-*D*-quiro-inositol galactosamina estimulou a síntese de

testosterona em células tecais de mulheres com ovário micro-  
dose-dependente e de maneira tão efetiva quanto a insulina (N

Por outro lado, a injeção intravenosa destes mediadores pu-  
aguda e dose-dependente, redução de 30-40% da hiperglicemia de ratos  
diabéticos após injeção de doses menores que as usuais ,i.e. 45 mg,  
estreptozotocina. Este efeito foi obtido com doses nanomolares dos compostos e te-  
duração entre 120-180 minutos quando os níveis glicêmicos alcançaram valores iguais  
aos iniciais. O nível de insulina destes animais não foi alterado de maneira significativa  
Estes compostos também aumentam a gliconeogênese em diafragmas de ratos normais  
após injeção intraperitoneal e para este efeito o mediador putativo inositol glicano  
contendo *D*-quiro-inositol foi 50-100 vezes mais potente que o mediador contendo mio-  
inositol (Huang *et al.*, 1993).

A infusão do mediador putativo isolado a partir de fígado bovino normaliza os  
níveis glicêmicos de ratos diabéticos após injeção de estreptozotocina numa dose  
equivalente à de insulina, 2 nanomolar, sem no entanto induzir hipoglicemia (Fonteles,  
Huang e Larner, 1996). Este mediador consiste quimicamente de 3-*O*-metil-*D*-quiro-  
inositol e galactosamina quelada a manganês. Este mesmo mediador foi demonstrado  
mimetizar alguns efeitos da insulina em células ovarianas e promover um “bypass” de  
um defeito genético na biossíntese ou liberação do mediador demonstrada em  
homogenato de adipócitos da cepa de ratos insulino-resistentes Goto-Kakizaki. O  
mecanismo de ação deste mediador envolve a ativação de dois membros da família de  
fosfatases dependentes de  $Mg^{2+}$ , a piruvato desidrogenase fosfatase e fosfatase 2C  
(específica para glicogênio sintetase no fígado), levando a uma sensibilização destas  
enzimas ao magnésio. Esta ativação conjunta provê um mecanismo para a ativação de  
enzimas limitantes do metabolismo oxidativo (piruvato desidrogenase fosfatase) ou não-  
oxidativo (glicogênio sintetase) da glicose.

Em estudos posteriores, o efeito independente do 3-*O*-metil-*D*-quiro-inositol, *D*-  
quiro-inositol, manganês e de seus efeitos quando administrados quelados com  
manganês foram avaliados em ratos diabéticos por estreptozotocina. Demonstrou-se que  
os efeitos hipoglicemiantes destes componentes eram potenciados quando os mesmos

eram quelados (Fonteles, Almeida e Larner, 2000). Um mecanismo possível para explicar este fenômeno, é que o 3-*O*-metil-*D*-quiro-inositol ou *D*-quiro-inositol sozinhos ou em associação com manganês possam ser incorporados em um precursor que é subsequentemente clivado para formar o mediador ativo. Uma explicação alternativa é que o 3-*O*-metil-*D*-quiro-inositol ou *D*-quiro-inositol quelados com manganês podem agir como análogos menos potentes do mediador fosfatidilinositolglicano agindo na membrana celular para iniciar a cascata de fosforilação associada a tirosina quinase. Este último mecanismo foi demonstrado com fosfatidilinositolglicanos de tripanossomos e *Leishmania* em macrófagos (Tachado *et al.*, 1997), e também com inosítois sintéticos e derivados biológicos atuando na fosforilação de resíduos tirosina da caveolina em adipócitos e no diafragma (Muller *et al.*, 1998). A incorporação de 3-*O*-metil-*D*-quiro-inositol triciado no precursor lipídico não é tão efetiva quanto a incorporação do *D*-quiro-inositol marcado radiotivamente, sugerindo que a desmetilação é um pré-requisito para a incorporação. Estudos em pacientes humanos demonstraram que após a administração de 3-*O*-metil-*D*-quiro-inositol, a concentração plasmática de *D*-quiro-inositol aumenta, mostrando que a desmetilação é um processo que acontece ativamente *in vivo* (Ostlund *et al.*, 1996).

O significado funcional destes compostos ainda é objeto de intensa investigação. No entanto, algumas descobertas são reveladoras. A excreção de mio-inositol na urina é acentuada em pacientes com diabetes do tipo 2 quando comparada com controles não diabéticos (Daughaday e Larner, 1954) que é acompanhada por uma diminuição na excreção de *D*-chiro-inositol (Kennington *et al.*, 1990). Um padrão similar também foi observado em macacos Rhesus, nos quais o aumento da excreção de mio-inositol e a diminuição da excreção de *D*-quiro-inositol foi observada de maneira progressiva a partir de animais normais, para obesos não-diabéticos e diabéticos do tipo 2 (Kennington *et al.*, 1990). Este padrão de excreção também foi observado em ratos Goto-Kakizaki, uma cepa desenvolvida no Japão por cruzamentos seletivos para resistência insulínica (Suzuki *et al.*, 1991).

A diminuição da excreção de *D*-quiro-inositol na urina foi posteriormente demonstrada ser mais estritamente relacionada à resistência insulínica do que à diabetes do tipo 2 em macacos Rhesus. Tanto a sensibilidade à insulina, como a taxa de

desaparecimento de glicose, ativação da glicogênio sintetase e inativação do músculo esquelético e tecido adiposo correlacionaram-se com a excreção de D-chiroinositol (Ortmeyer *et al.*, 1993). A taxa de excreção urinária de D-chiroinositol se relaciona de maneira linear a diminuição da sensibilidade à insulina (resistência insulínica aumentada). Correlações similares foram obtidas em pacientes humanos comparados com controles com intolerância à glicose e pacientes com diabetes do tipo 2 (Suzuki *et al.*, 1994). Taxas alteradas da excreção urinária de mio-inositol e D-chiroinositol na urina tem sido propostas como um índice mais sensível de resistência insulínica em pacientes humanos (Larner e Craig, 1996). Por outro lado, a administração de D-chiroinositol a ratos com diabetes do tipo 2 induzida por estreptozotocina (Ortmeyer *et al.*, 1993), macacos Rhesus (Ortmeyer *et al.*, 1995) e humanos (Larner *et al.*, 1998; Larner, 2002) efetivamente diminuiu a hiperglicemia, trigliceridemia e melhorou a utilização da glicose. Em mulheres com síndrome do ovário micropolicístico, a administração oral de D-chiroinositol por 6 a 8 semanas efetivamente aliviou significativamente muitos dos sinais clínicos comuns da doença, incluindo taxa de ovulação, níveis de testosterona sérica, concentrações de globulina ligadora dos hormônios sexuais, intolerância a glicose, hiperinsulinemia e pressão arterial sistólica e diastólica elevadas (Nestler *et al.*, 1999). A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou testes clínicos de fase II multicêntricos em pacientes com diabetes do tipo 2 e mulheres com síndrome do ovário micropolicístico que já estão em andamento nos Estados Unidos da América.

desaparecimento de glicose, ativação da glicogênio sintetase e inativação da fosforilase do músculo esquelético e tecido adiposo correlacionaram-se com a excreção urinária de D-chiroinositol (Ortmeyer *et al.*, 1993). A taxa de excreção urinária de D-quirositol se relaciona de maneira linear a diminuição da sensibilidade à insulina (resistência insulínica aumentada). Correlações similares foram obtidas em pacientes humanos comparados com controles com intolerância à glicose e pacientes com diabetes do tipo 2 (Suzuki *et al.*, 1994). Taxas alteradas da excreção urinária de mio-inositol e D-quirositol na urina tem sido propostas como um índice mais sensível de resistência insulínica em pacientes humanos (Larner e Craig, 1996). Por outro lado, a administração de D-quirositol a ratos com diabetes do tipo 2 induzida por estreptozotocina (Ortmeyer *et al.*, 1993), macacos Rhesus (Ortmeyer *et al.*, 1995) e humanos (Larner *et al.*, 1998; Larner, 2002) efetivamente diminuiu a hiperglicemia, trigliceridemia e melhorou a utilização da glicose. Em mulheres com síndrome do ovário micropolicístico, a administração oral de D-quirositol por 6 a 8 semanas efetivamente aliviou significativamente muitos dos sinais clínicos comuns da doença, incluindo taxa de ovulação, níveis de testosterona sérica, concentrações de globulina ligadora dos hormônios sexuais, intolerância a glicose, hiperinsulinemia e pressão arterial sistólica e diastólica elevadas (Nestler *et al.*, 1999). A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou testes clínicos de fase II multicêntricos em pacientes com diabetes do tipo 2 e mulheres com síndrome do ovário micropolicístico que já estão em andamento nos Estados Unidos da América.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o potencial dos antioxidantes (glutathiona reduzida, ácido lipóico e rutina) e de componentes principais dos mediadores putativos da ação da insulina (mio-inositol, D-qui-ro-inositol e pinitol) na prevenção ou reversão direta da disfunção endotelial da diabetes ou senescência;

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar em ratos com diabetes induzida por injeção de aloxana ou senescentes (>24 meses) se a administração oral de antioxidantes naturais (GSH, ácido lipóico, catequina ou rutina) ou dos inosítóis, mio-inositol, D-qui-ro-inositol ou pinitol duas vezes ao dia por um período de 4 semanas poderia prevenir ou atenuar a disfunção endotelial observada nestes animais;
- ✓ Investigar se a incubação dos tecidos *in vitro* com estes agentes por 1 hora poderia reverter a disfunção endotelial;
- ✓ Estudar a variação da resposta de corpos cavernosos de coelhos diabéticos a estímulos relaxantes de natureza endotelial ou neuronal (nitrérgica) na ausência e presença destes compostos.
- ✓ Estudar o mecanismo de ação das drogas testadas e mostradas efetivas na prevenção ou reversão da disfunção endotelial e nitrérgica em ratos ou coelhos com diabetes por injeção de aloxana.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Os animais foram obtidos do biotério do Instituto de Biomedicina (IBIMED) e mantidos sob ciclo de claro-escuro de 12 horas com livre acesso à ração (Purina Rat Chow®) e água. Todos os protocolos experimentais seguiram estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório e estão de acordo com a normas do colégio brasileiro de experimentação animal.

Os seguintes grupos de animais foram utilizados:

a) Ratos Senescentes: Ratos Wistar machos com idade entre 24-30 meses ( $26 \pm 2$ ), pesando entre 400 e 500 g, foram utilizados para avaliar os efeitos da senescência na reatividade vascular e as respostas comparadas com aquelas obtidas em tecidos de ratos jovens machos (3-4 meses;  $3,6 \pm 0,7$ ), com peso entre 200-250g;

b) Ratos Diabéticos: Ratos Wistar machos com 1 ano foram injetados com aloxana (45 mg/Kg) segundo Sannomiya et al., (1997) pela veia peniana. Imediatamente após a injeção estes animais foram mantidos em gaiolas (4 animais por caixa) com livre acesso à ração e com sacarose 10 % acrescida à água de beber. Após 48 horas a glicose foi retirada. No terceiro dia após a indução os animais foram colocados em jejum por 12 horas e no dia seguinte uma amostra de sangue foi retirada do plexo infraorbital e a glicemia e perfil lipídico determinados. Animais com glicemia igual ou acima de 200 mg/dL (11 mM) foram incluídos nos estudos. As respostas vasculares foram comparadas com animais de mesma idade (6 meses) e sexo, os quais sofreram injeção de salina na veia peniana e após 96 horas foram diagnosticados pelas amostras de sangue coletadas no plexo infra-orbital como euglicêmicos ( $< 100$  mg/dL).

c) Coelhos da raça Nova Zelândia, normais e diabéticos pela aloxana (150 mg/Kg, i.p), pesando entre 2,0-2,5Kg, foram utilizados neste estudo para coleta de aorta e corpo cavernoso.



### 3.2 Drogas e reagentes

Todas as drogas utilizadas neste trabalho, i.e., acetilcolina (ACh), ácido lipóico (AL), ácido deoxicólico, guanetidina, indometacina, atropina, tetrodotoxina (TTX), metiléster de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME), 7-nitroindazol (7-NI), 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), apamina, caribdotoxina, glibenclamida, aloxana (ALX), superóxido dismutase (SOD-1), xantina (XA), xantina oxidase (XO), azul de nitrotetrazólio (NBT) foram obtidas da Sigma/Aldrich (Saint Louis, MO, USA) e diluídas apenas no dia de uso e estocadas a -20° C quando necessário. A acetilcolina foi diluída em solução 0,01 N de ácido acético em salina, estocada a -20° C e usada em isopor contendo gelo. A SOD-1 e XO foram diluídas apenas no dia de uso, mantidas em isopor com gelo e usadas em menos de 1 hora após diluição. O mesmo procedimento, em relação à estocagem e uso foi adotado para as demais drogas. A indometacina foi diluída em solução tampão de bicarbonato a 3%. O azul de nitrotetrazólio foi diluído em tampão fosfato (PBS) com pH ajustado para 7,8 a 25° C.

O nitroprussiato de sódio (SNP) foi obtido da (Merck, Darmstadt, Alemanha), diluído apenas no dia do uso, protegido da luz com uso de frascos âmbar envoltos em papel alumínio, utilizados em isopor com gelo e o volume residual descartado ao fim do experimento.

A rutina foi obtida da empresa Procariri incubada no parque de desenvolvimento tecnológico (PADETEC) no campus do pici, UFC, Fortaleza, Ceará.

Os inositóis, metil-D-quirositol (pinitol, Me-DCI) e D-quirositol foram gentilmente cedidos pelo prof. Joseph Larner da Universidade da Virginia, Charlottesville, USA.

Os reagentes utilizados eram de pureza analítica e obtidos das empresas Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Labsynth (Diadema, SP, Brasil).

### 3.3 Protocolos Experimentais

O relaxamento dependente do endotélio, induzido por acetilcolina, e o relaxamento independente do endotélio, induzido por nitroprussiato de sódio foram comparados em tecidos obtidos de animais idosos (>2anos) *versus* animais jovens (3-4 meses) e diabéticos *versus* euglicêmicos. Um primeiro conjunto de experimentos, utilizado para avaliar o potencial preventivo dos compostos, consistiu da administração oral por gavagem dos mesmos de acordo com o seguinte protocolo:

- (I) Ratos jovens- tratados com salina (1 mL/Kg/12h; v.o) durante 4 semanas;
- (II) Ratos senescentes- tratados com salina (1 mL/Kg/12h; v.o) durante 4 semanas;
- (III) Ratos senescentes- tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h; v.o) durante 4 semanas;
- (IV) Ratos senescentes- tratados com rutina (50 mg/Kg/12h; v.o) durante 4 semanas;
- (V) Ratos euglicêmicos- tratados com salina (1 mL/Kg/12h; v.o) durante 4 semanas;
- (VI) Ratos diabéticos por aloxana- tratados com salina (1 mL/Kg/12 h; v.o) durante 4 semanas;
- (VII) Ratos diabéticos por aloxana- tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12 h; v.o) durante 4 semanas;
- (VIII) Ratos diabéticos por aloxana- tratados com rutina (50 mg/Kg/12h; v.o.) durante 4 semanas após o diagnóstico da diabetes;
- (IX) Ratos diabéticos por aloxana- tratados com mio-inositol (20 mg/Kg/12h; v.o.) durante 4 semanas após o diagnóstico da diabetes;
- (X) Ratos diabéticos por aloxana- tratados com D-qui-ro-inositol (20 mg/Kg/12h; v.o.) durante 4 semanas após o diagnóstico da diabetes;
- (XI) Ratos diabéticos por aloxana- tratados com pinitol (20 mg/Kg/12h; v.o.) durante 4 semanas após o diagnóstico da diabetes;

Após os tratamentos amostra de sangue venosa foi coletada, sob anestesia etérea, pelo plexo infra-orbital para dosagem de glicose e análise do perfil lipídico. Antes das coletas dos tecidos, os animais foram anestesiados e a pressão arterial foi medida por registro direto através de uma cânula inserida na artéria carótida e acoplada a um transdutor de pressão (Statham P23, Gould, Oxnard, CA, USA) de registro em fisiógrafo (Narco Biosystems, modelo DMP-4B, Houston, TX, USA).

Os animais foram então sacrificados e seus tecidos coletados e montados de acordo com métodos específicos detalhados mais abaixo. Nesses grupos de animais as respostas endotélio-dependente e endotélio-independente foram comparadas entre os grupos distintos e seus respectivos controle. O grau de disfunção endotelial, expresso em termos percentuais, foi calculado pela seguinte fórmula:

$$DE (\%) = 100 - (R_{\text{máx}} \text{ Fator de Risco} \times 100), \text{ onde:}$$

**DE**=disfunção endotelial, **R<sub>máx</sub>**= resposta relaxante máxima, obtida na mesma faixa de dose, ao agente vasodilatador endotélio dependente, **fator de risco**=distúrbio que leva à disfunção endotelial (p.ex. senescência ou diabetes), **controle**= grupo de mesma idade e sexo que não apresentam fatores de risco para disfunção endotelial (p.ex. jovens euglicêmicos e normotensos).

Em um segundo grupo de experimentos, para verificar se as drogas possuíam ação direta nos tecidos, os animais foram divididos nos mesmos grupos anteriores mas não receberam tratamento por via oral, seus tecidos foram incubados (em experimentos em banhos de superfusão) ou infundidos (em experimentos de perfusão) com as drogas testes *in vitro* durante 1 hora e logo após as curvas dose-resposta para os agonistas endotélio-dependente e endotélio-independente foram realizadas. Nestes experimentos as seguintes doses foram usadas: 1  $\mu\text{M}$  de glutathiona reduzida (GSH), 1  $\mu\text{M}$  de ácido  $\alpha$ -lipóico, 1  $\mu\text{M}$  de pinitol, 1  $\mu\text{M}$  de d-quirositol, 1  $\mu\text{M}$  de catequina ou 1  $\mu\text{M}$  de rutina.

Em um terceiro conjunto de experimentos coelhos foram injetados com aloxana (150 mg/Kg; i.p) e após 4 semanas de diabetes foram sacrificados e rins, aorta torácica e corpos cavernosos isolados para análise da disfunção endotelial e nitrérgica. Neste caso, os tecidos também foram incubados com as mesmas drogas e nas mesmas doses descritas acima 1 hora antes de se realizar os estímulos endotélio-dependente (acetilcolina) ou endotélio-independente (SNP ou solução de nitrato de sódio com pH ajustado para 2 para obter-se óxido nítrico em solução). Testou-se ainda no corpo cavernosos de coelhos o efeito das drogas na resposta nitrérgica evocada por campo elétrico transmural.

Em um quarto conjunto de experimentos, a resposta potencializadora de tônus induzida por L-NAME (100 $\mu$ M) aplicado no platô da resposta vasoconstritora submáxima da fenilefrina (0,1  $\mu$ M) foi comparada em animais jovens e senescentes. Neste mesmo conjunto de experimentos, a resposta potencializadora da SOD-1 no relaxamento induzido por NO (nitrito de sódio em pH 2,0; NO-1  $\mu$ M) foi comparada com a resposta dos inositóis pinitol e D-quirositol (1 a 10  $\mu$ M).

Os métodos utilizados para cada tecido, independente da fonte, são descritos mais detalhadamente a seguir:

### 3.3.1 Anéis de Aorta

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a aorta tóraca foi rapidamente excisada. Segmentos de 5 mm foram montados horizontalmente em banhos de 5 mL de capacidade em solução de Krebs-Henseleit. A solução de Krebs utilizada apresentava a seguinte composição (mM): NaCl 120 ; KCl 4,7 ; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 1,43; NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17 e glicose 11. Os registros das alterações de tensão foram obtidos por intermédio de um transdutor de força acoplado a um polígrafo. Após um período de equilíbrio de 1 hora com lavagens a cada 15 minutos o anel vascular foi contraído com fenilefrina (FEN). No platô da contração (correspondente a aproximadamente 60% da resposta máxima) induzida pela FEN foi construída uma curva concentração resposta à acetilcolina ( $10^{-12}$  a  $10^{-5}$ M). A curva de relaxamento, que depende do endotélio, foi comparada em tecidos obtidos de animais idosos (>2 anos), diabéticos por aloxana ou espontaneamente hipertensos (1 ano) e seus respectivos controles de mesma idade e sexo. Todos os experimentos foram realizados na presença de indometacina no banho. Alguns experimentos foram realizados com anéis de aorta desendotelizados por fricção mecânica usando-se uma pinça inoxidável. Um grupo de experimentos com aortas de ratos diabéticos tratados com rutina foram realizados em anéis pré-contraídos com potássio 60 mM. Outros dois grupos foram realizados com anéis de ratos diabéticos tratados com rutina na presença de L-NAME ou da mistura caribdotoxina-apamina (0,1  $\mu$ M). A catequina, uma flavana com atividade antioxidante extracelular foi usada para comparação nestes experimentos.

### 3.3.2 Leito Vascular Mesentérico:

Ratos Wistar, com peso entre 400-500g, foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg; i.p) e após abertura da cavidade abdominal a artéria mesentérica superior foi perfundida por intermédio de uma cânula de polietileno (PE 40) inserida na artéria em sua origem na aorta abdominal com 10 mL de solução de Krebs modificada (mesma composição descrita anteriormente) contendo heparina (500 UI/mL). O intestino foi separado do mesentério rente à borda intestinal e o mesentério removido do rato foi imediatamente perfundido em um sistema de perfusão aberto (“water jacketed”) mantido a 37° C. O mesentério foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit com pH ajustado para 7,4 e oxigenado com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) num fluxo constante de 4 mL/min usando-se uma bomba peristáltica Watson-Marlow (Falmouth, Cornwall, England). A pressão de perfusão foi constantemente monitorada por um manômetro ou em alguns experimentos por intermédio de um transdutor de pressão acoplado a um polígrafo (Narco Biosystems, Houston, TX, USA). Após um período de 30 min de estabilização foi adicionada fenilefrina (1 a 5 µM) à solução de perfusão até que uma pressão de perfusão constante fosse atingida (100-120 mmHg). Curvas dose-resposta dos vasodilatadores, i.e., acetilcolina (Ach; 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-3</sup> M) e nitroprussiato de sódio (SNP; 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-3</sup> M) foram injetadas em bolus em volumes (100 µl) que não afetavam a pressão de perfusão.

Nos experimentos em que a atividade direta dos compostos estivesse sendo avaliada, após as primeiras curvas de Ach ou SNP, o leito mesentérico foi perfundido por 30 min com a mesma solução adicionada das drogas a serem testadas, i.e., 1 µM de glutathiona reduzida (GSH), 1µM de ácido α-lipóico, 1µM de pinitol, 1µM de d-quirositol, 1µM de catequina ou 1 µM de rutina, em experimentos separados.

Para avaliar o mecanismo de potenciação da resposta endotélio-dependente, após 1 hora de infusão com rutina nos tecidos obtidos de ratos diabéticos, os seguintes protocolos foram utilizados. Em um primeiro conjunto de experimentos o inibidor das isoformas da óxido nítrico sintetase L-NAME foi infundido após prévia infusão de rutina e antes da realização das curvas dos agonistas. Em um segundo conjunto experimental os tecidos foram pré-tratados com ODQ (10 µM) após infusão de rutina e antes das curvas dos agonistas. Em outro conjunto experimental os tecidos foram pré-

contraídos com  $K^+$  (60 mM) para bloquear a ação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Resende, Ballejo e Salgado, 1998; Busse et al., 2002). Alguns experimentos foram realizados em leitos mesentéricos desendotelizados por infusão de deoxicolato de sódio (1 mg/mL durante 1 minuto) para comparar a resposta aos agonistas após a infusão de rutina. Todos os experimentos foram realizados com solução nutritora contendo indometacina (10  $\mu$ M) para evitar a participação de prostanóides.

### 3.3.3 Corpo cavernoso

Coelhos Nova Zelândia foram sacrificados por injeção de pentobarbital sódico pela veia marginal e os pênis dos mesmos foram removidos e colocados em placas de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit e dissecados com bisturi para remoção do corpo cavernoso. Os corpos cavernosos foram isolados e montados em banhos de 5 mL em Krebs-Henseleit mantido a 37° C, pH 7,4 e oxigenado com mistura carbogênica. Os tecidos foram mantidos sob tensão de 1 g e permaneceram em repouso por 1 h com lavagens sucessivas de 15 em 15 min. As alterações na tensão foram registradas utilizando-se um transdutor de força isométrico conectado a um polígrafo de 4 canais (Narco Biosystems, Houston, Texas, USA). Após o período de equilíbrio, o corpo cavernoso foi contraído com 10  $\mu$ M de fenilefrina e as respostas a estimulação de campo elétrico (ECE; 0,5ms, 20 V, 2-16 Hz), acetilcolina (Ach ; 1  $\mu$ M),  $NaNO_2$  (NO; 1-100  $\mu$ M) e nitroprussiato (SNP; 1  $\mu$ M) obtida em experimentos isolados na ausência e presença de 1 $\mu$ M glutatona reduzida, 1 $\mu$ M ácido lipóico, 1 $\mu$ M de catequina, 1 $\mu$ M rutina, 1 $\mu$ M de d-quirositol ou 1 $\mu$ M de pinitol. A indometacina (10  $\mu$ M) e guanetidina (10  $\mu$ M) foram adicionadas à solução de Krebs-Henseleit para diminuir a atividade mecânica basal do tecido.

Em um conjunto isolado de experimentos os efeitos da rutina nas respostas do EFS ou acetilcolina foram comparadas na presença do inibidor da óxido nítrico sintetase, L-nitro-metil-éster de arginina (L-NAME; 100  $\mu$ M), do inibidor da isoforma neuronal (por ser captado ativamente pelo neurônio) da óxido nítrico sintetase, 7-nitro-indazol (7-NI; 100  $\mu$ M), do inibidor da guanilato ciclase sóluvel, ODQ (100  $\mu$ M), do bloqueador muscarínico atropina (10  $\mu$ M), do bloqueador de canais de sódio neuronais, tetrodotoxina (TTX, 1 $\mu$ M), dos inibidores dos canais de potássio cálcio-dependentes de

alta, intermediária e baixa condutância, caribdotoxina e apamina (0,1  $\mu\text{M}$ ) ou do inibidor de canais de potássio ATP-dependentes (glibenclamida - 100  $\mu\text{M}$ ).

### 3.3.4 Perfusão de Rim de Coelho em Sistema Aberto.

Coelhos Califórnia foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg; i.m) e uretana (1,2 g/Kg; i.p) e traqueostomizados para ventilação artificial utilizando-se bomba Palmer (Palmer Instruments, London, UK). A seguir, após incisão na linha alba, a cavidade abdominal foi exposta e o rim esquerdo removido após canulação da artéria renal. Imediatamente foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit com pH ajustado para 7,4 e oxigenado com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ), num fluxo constante de 4 mL/min, usando-se uma bomba peristáltica Watson-Marlow (Falmouth, Cornwall, England).

A pressão de perfusão foi constantemente monitorada por intermédio de um manômetro ou em alguns poucos experimentos através de um transdutor de pressão conectado a um polígrafo (Narco Biosystems, Houston, TX, USA) acoplado ao sistema de perfusão. Após um período de 30 min de estabilização foi adicionada fenilefrina (1 a 5  $\mu\text{M}$ ) à solução de perfusão até que uma pressão de perfusão constante fosse atingida (100-120 mmHg). Curvas dose-resposta dos vasodilatadores, i.e., acetilcolina (Ach;  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M) e nitroprussiato de sódio (SNP;  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M) foram injetadas em bolus em volumes (100  $\mu\text{l}$ ) que não afetavam a pressão de perfusão.

Nestes experimentos apenas a atividade direta dos compostos foi avaliada. Após as primeiras curvas de Ach ou SNP, o leito renal foi perfundido por 30 min com a mesma solução adicionada das drogas a serem testadas, i.e., 1  $\mu\text{M}$  de glutathione reduzida (GSH), 1  $\mu\text{M}$  de ácido  $\alpha$ -lipóico, 1  $\mu\text{M}$  de pinitol, 1  $\mu\text{M}$  de d-quirositol, 1  $\mu\text{M}$  de catequina ou 1  $\mu\text{M}$  de rutina, em experimentos separados.

Para avaliar o mecanismo de potenciação da resposta endotélio-dependente após 1 hora de infusão com rutina, alguns inibidores foram utilizados. Em um primeiro conjunto de experimentos o inibidor das isoformas da óxido nítrico sintetase L-NAME foi infundido após o protocolo de infusão da rutina e antes da realização das curvas dos

agonistas. Em um segundo conjunto experimental os tecidos foram pré-tratados com ODQ (10  $\mu$ M) após infusão de rutina e antes das curvas dos agonistas. Em outro conjunto experimental o leito vascular renal foi pré-contraído com  $K^+$  60 mM para bloquear a ação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Resende, Ballejo e Salgado, 1998; Busse et al., 2002). Alguns experimentos foram realizados em leitos renais desendotelizados por infusão de deoxicolato de sódio (1 mg/mL durante 1 minuto) para comparar a resposta aos agonistas após a infusão de rutina. Todos os experimentos foram realizados com solução nutritora contendo indometacina para evitar a participação de prostanóides.



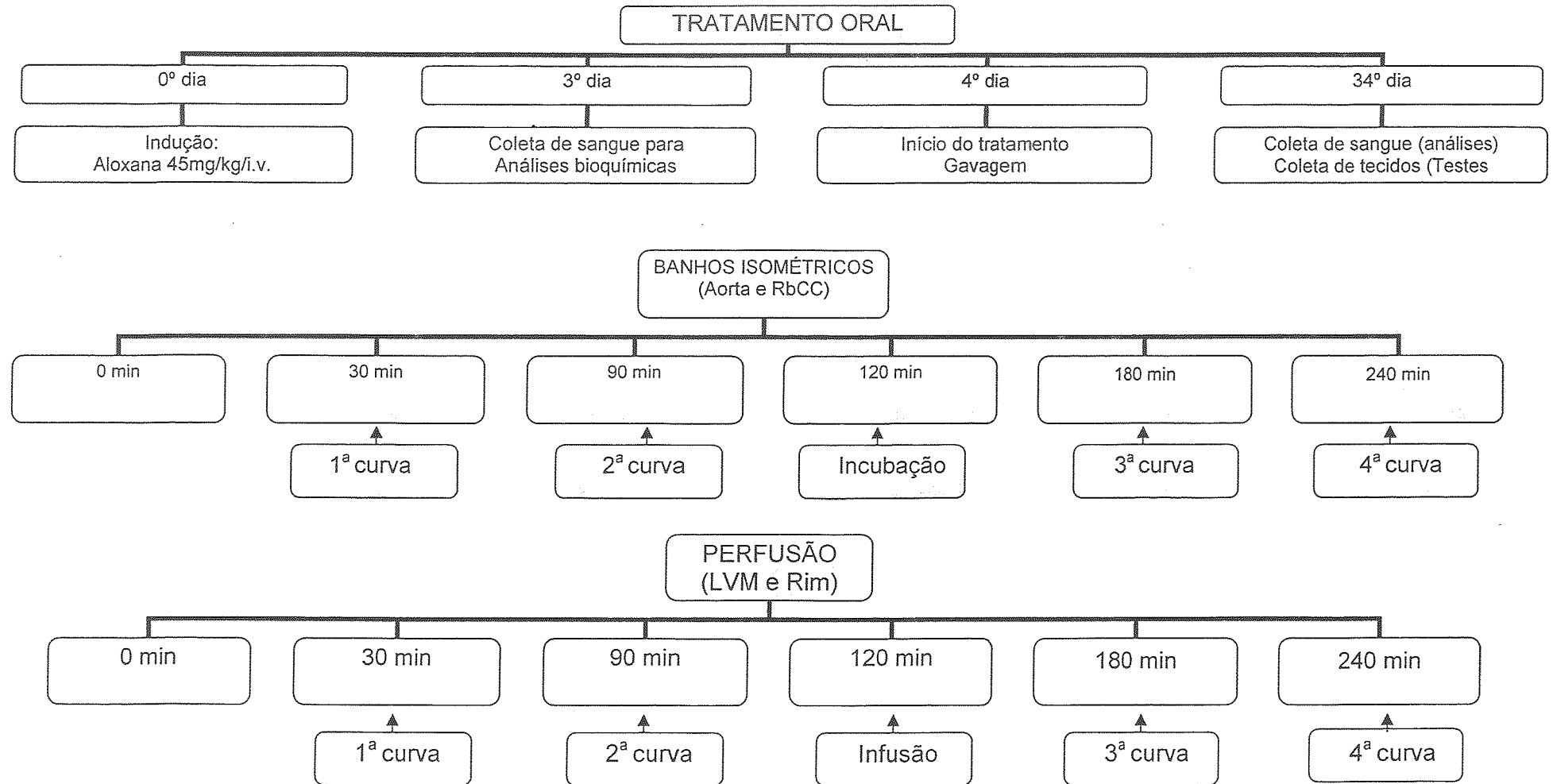


Figura 1. Esquema mostrando os protocolos de tratamento oral nos experimentos de prevenção da disfunção endotelial com os protocolos dos testes farmacológicos utilizados *a posteriori*, no final dos tratamentos ou nos experimentos de reversão da disfunção estabelecida. RbCC= corpo cavernoso de coelho (do inglês *rabbit corpus cavernosum*).

### 3.4. Métodos Bioquímicos para análise dos perfis glicêmicos, lipídicos

Todos os animais, tanto dos experimentos preventivos quanto dos experimentos de reversão direta da disfunção endotelial, tiveram sangue coletado para análise da glicemia e no caso dos animais tratados por via oral por 1 mês também para determinação do perfil lipídico.

As amostras de sangue foram coletadas por punção no plexo infraorbital utilizando-se tubos de microhematócrito em tubos de coleta de soro com gel separador (Vacuette do Brasil, São Paulo, SP). Após processamento em centrífuga a 3000 rpm por 5 minutos as amostras foram utilizadas para dosagem de glicose e colesterol total e fracionado.

Para a determinação do perfil lipídico, foram utilizados kits para triglicerídios, colesterol total e HDL (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil). As amostras foram processadas por métodos enzimáticos, seguindo a orientação do fabricante utilizando-se um analisador automático multicanal Selectra II (Wiener Lab, Holanda). Os níveis de LDL foram determinados utilizando-se a equação de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972).

### 3.5. Detecção de superóxido

A detecção da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT-do inglês *nitroblue tetrazolium*) foi realizada segundo o método descrito por Hartog et al., 2003. O princípio do método é o seguinte: o NBT pode ser reduzido pelo  $O_2^{\bullet -}$  através de reações de transferência de 1 elétron. A redução do NBT a diformazan é processada em dois passos, gerando um intermediário estável parcialmente reduzido, monoformazan ( $NBT^+$ ). A formação deste intermediário pode ser monitorada espectrofotometricamente utilizando-se filtro de 550 a 560 nm:  $E_m = 1,5 \times 10^4 \text{ [mol/L]}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Tarpey e Fridovich, 2001). Os radicais superóxido foram gerados pela reação de xantina (1 mM) e xantina oxidase (10 mU/mL) em uma solução de tampão fosfato (pH 7,8 a 25° C). Os radicais  $O_2^-$  foram detectados pela reação com o sal de tetrazólio, azul de nitrotetrazólio (NBT; 50  $\mu\text{M}$ ). A taxa de redução do NBT foi monitorada espectrofotometricamente na faixa de 560 nm usando-se um Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England). A enzima SOD-1, reage com  $O_2^-$  diminuindo a taxa de redução do NBT e foi usada como controle positivo. O volume de reação foi fixo em 2 mL. Os inositóis, D-quiró-inositol e

pinitol foram adicionados ao tubos de ensaio imediatamente antes da adição dos reagentes nas concentrações de 0,01 a 1  $\mu$ M e a SOD1 nas concentrações de 0,03 a 3 u/mL.

### 3.6. Análise dos dados e estatística:

Os dados da função vascular e do músculo liso do corpo cavernoso obtidos *in vitro* foram expressos com porcentagem das contrações prévias induzidas por fenilefrina e assim como os valores brutos dos parâmetros bioquímicos, foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Cada animal foi considerado uma unidade experimental e os dados obtidos com tecidos obtidos de um único animal foram agrupados como medida única (ex.: dados obtidos em duplicata ou triplicata foram agrupados como média), de maneira que o n representa o número de animais utilizados e não o número de tecidos. Os dados brutos obtidos *in vitro* e *in vivo* (força em g, pressão em mmHg e fluxo em mL/min; valores dos perfis bioquímicos) foram analisados para diferenças estatísticas através da análise de variância ANOVA por intermédio do programa de computador GraphPad Prism 3.00 para windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Os gráficos e os cálculos de CE<sub>50</sub> e PD<sub>2</sub> também foram realizados utilizando-se o programa de computador GRAPHPAD PRISM. Para avaliar a diferença entre médias de dois grupos foram utilizados os testes t de Student pareado (dentro do grupo) e não pareado (entre grupos).



## 4. Resultados

### 4.1. Administração das drogas teste *in vivo*: avaliação do potencial preventivo.

#### 4.1.1. Ratos diabéticos ou senescentes tratados por via oral com antioxidantes naturais (rutina, GSH e ácido lipóico)

A indução de diabetes por injeção intravenosa de aloxana (50 mg/Kg) caracterizou-se por hiperglicemia sustentada associada a leve hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (ver tabela 2). O ganho de peso percentual no período de quatro semanas de tratamento nos animais diabéticos (Db) também foi significativamente menor comparado com os ratos euglicêmicos (eugli) ( $27,5 \pm 3,8$  % eugli vs.  $7,9 \pm 1,3$ % Db,  $p < 0,05$ ). Nos animais diabéticos tratados com rutina o ganho de peso foi restaurado completamente ( $7,9 \pm 1,3$ % Db vs.  $37,8 \pm 4,7$ % Db +rutina,  $p < 0,05$ ) e apenas parcialmente nos tratados com ácido lipóico ( $13 \pm 2,6$ %) (tabela 2).

A pressão arterial média dos animais diabéticos sofreu um significativo incremento ( $91 \pm 4,3$ mmHg – eugli vs.  $125 \pm 8,7$  mmHg- Db,  $p < 0,05$ ). Esse incremento foi abolido nos animais tratados com rutina ou ácido lipóico (tabela 2).

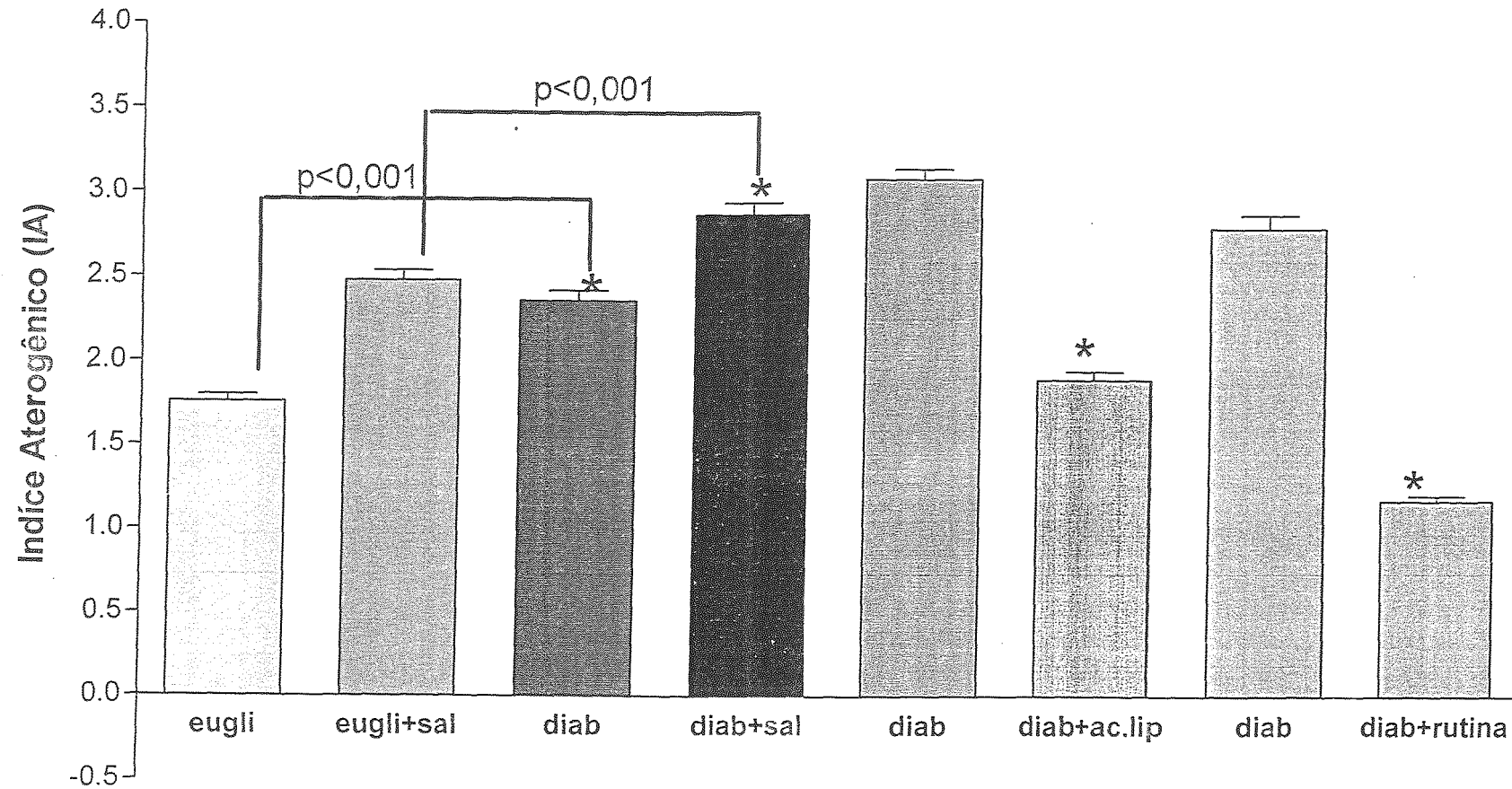
A glicemia dos animais tratados com rutina foi significativamente menor que a dos animais controles diabéticos obtidos no fim do tratamento com salina ( $435,2 \pm 35,6$  mg/dL- Db vs.  $331 \pm 16,9$  mg/dL Db+rutina,  $p < 0,05$ ) e também dos valores iniciais deste grupo antes do tratamento ( $439 \pm 47,8$  mg/dL Db+rutina vs.  $331 \pm 16,9$  mg/dL Db-pós-rutina,  $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

O índice aterogênico medido nos animais diabéticos controles foi significativamente maior que seus respectivos controles euglicêmicos tanto antes como após o tratamento com salina ( $1,76 \pm 0,04$ -eugli vs.  $2,36 \pm 0,06$ -Db,  $p < 0,05$ ). Tanto o tratamento com ácido lipóico ( $3,08 \pm 0,06$ -Db pré'-ác. lipóico vs.  $1,89 \pm 0,05$  Db+ác. lipóico,  $p < 0,05$ ) como o tratamento com rutina ( $2,79 \pm 0,08$  vs.  $1,17 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ) diminuiu o índice aterogênico de seus respectivos controles antes do tratamento (Figura 2).

**Tabela 2.** Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos), pressão arterial média, peso corporal e glicemia de ratos euglicêmicos ou diabéticos por aloxana antes e após 4 semanas de tratamento com rutina, salina ou ácido lipóico.

Grupos (I to III)	n	Peso corporal (g)	PAM (mmHg)	Glicose sérica (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
(I) euglicêmico	7	247±15,6		89,6± 9	77,3± 5,8	63±8,3	28±2,5	12,6±2,5	36,7±8,6
(I) euglicêmico salina	7	315 ± 21*	91 ± 4,3	77,3±6,6	73±12,7	82±12	21±1,9	17±1,6	35±4,6
(II) diabético	12	214 ± 12,3		392±31,7	88,7±7,9	132±29,7	26,4±2	26,5±5,9	35,8±5,0
(II) diabético+ salina	12	231 ± 15,4	125±8,7#	435,2±35,6	79,4±4,3	107±8	20,5±1,7	21,4±2,2	37,5±2,6
(III) diabético	11	216,3±21,4		439±47,8	100,5±10,4	159,5±28,4	24,6±3	31,9±5,7	44±5,9
(III) diabético+ rutina	11	298±18*	116,4±7,8	331±16,9*	70,8±5,4	138,7±18,4	24,5±3,7	27,7±3,7	18,6±6,1
(III) diabético	7	234,6±21		397±17,4	119,8±24,6	146,5±26	26,3±6,7	29,3±4,8	44,2±5,4
(III) diabético+ ácido lipóico	7	265±15,9	104±5,9&	384,3±6,6	113,6±27,3	82,1±8,6	52,3±3	16,4±4,7	44,9±5,7

Os dados são expressos como média ± EPM. \*  $p < 0,05$ , teste t de Student pareado bicaudal, comparado com grupo controle respectivo, i.e., com os valores obtidos antes do início dos respectivos tratamentos. #  $p < 0,05$ , teste t de Student não-pareado bicaudal, comparado com grupo euglicêmico. &  $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado vs. Diabético + salina. PAM= pressão arterial média; TG= triglicerídeos; HDL= lipoproteína de alta densidade; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa e LDL= lipoproteína de baixa densidade.



**Figura 2.** Variação do índice aterogênico (IA), calculado pela seguinte fórmula  $IA = (LDL + VLDL) / HDL$  nos grupos de ratos euglicêmicos tratados com salina ou nos ratos diabéticos por aloxana tratados com salina, ácido lipóico ou rutina. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 7 animais. \* $p < 0,05$ , teste t de Student pareado vs respectivo controle antes do tratamento.

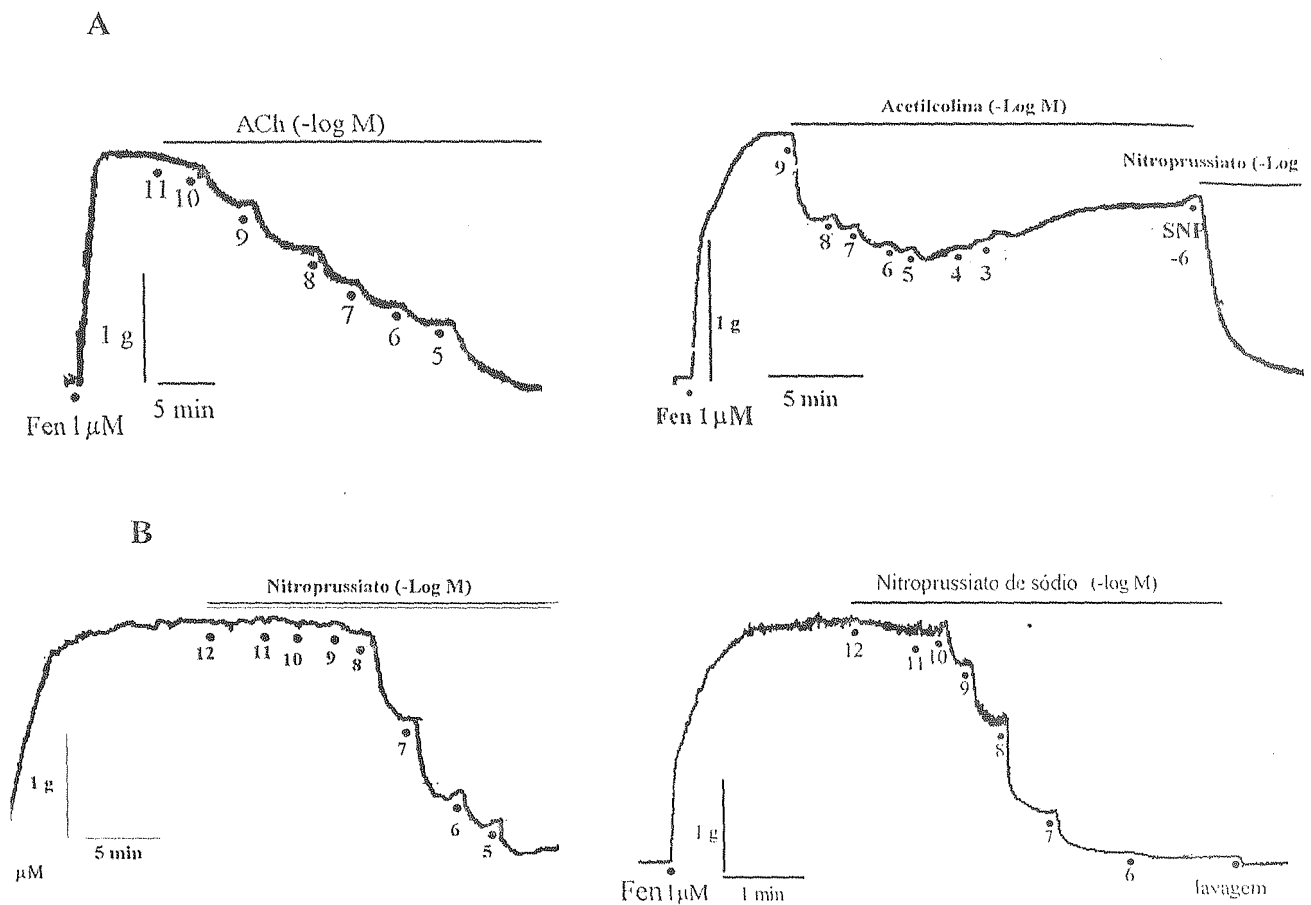
A disfunção endotelial medida (ver fórmula na seção de materiais e métodos) em anéis de aorta torácica de ratos diabéticos foi de  $51,9 \pm 4,6$  % quando comparadas com ratos euglicêmicos de mesma idade e sexo (Figura 3). Após tratamento com ácido lipóico este valor diminuiu para  $44,7 \pm 3,7$  % e para  $14,1 \pm 2,4$  % ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com rotina (Figuras 4). As respostas máximas relaxantes para acetilcolina, expressas como percentual da contração prévia, foram de  $94,4 \pm 4,6$  % nos animais euglicêmicos e de  $45,4 \pm 2,5$  % ( $p < 0,05$  vs. eugli) nos animais diabéticos não tratados. A resposta máxima à acetilcolina foi de  $52,2 \pm 3,1$  % nos tecidos obtidos de ratos diabéticos tratados com ácido lipóico e de  $81,1 \pm 3,6$  % ( $p < 0,05$  vs. -Db) nos tecidos de animais tratados com rotina. A inibição percentual da disfunção endotelial nos ratos tratados com ácido lipóico foi de  $13,9 \pm 2,5$  % e de  $72,9 \pm 5,6$  % nos tratados com rotina quando comparados com a disfunção observada nos ratos diabéticos não tratados (Tabela 3 e Figura 4 e 6).

O relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio não foi significativamente afetado nem em termos de resposta máxima nem em termos de sensibilidade dos tecidos. A resposta máxima relaxante foi de 100% em todos os tecidos (Tabela 3 e Figura 7).

No leito arteriolar mesentérico perfundido a pressão constante a disfunção endotelial observada nos ratos diabéticos foi de  $44,6 \pm 5,8$  % quando comparada com ratos euglicêmicos de mesma idade e sexo. O grupo de animais tratados com ácido lipóico apresentou disfunção endotelial de  $24,8 \pm 3,7$  % ( $p < 0,05$  vs. Db) e o grupo tratado com rotina apresentou disfunção na ordem de  $21,4 \pm 2,8$  % ( $p < 0,05$  vs. Db). Neste tecido, a inibição percentual da disfunção endotelial foi de  $44,4 \pm 3,1$  % nos ratos tratados com ácido lipóico e de  $52 \pm 4,3$  % nos ratos tratados com rotina.

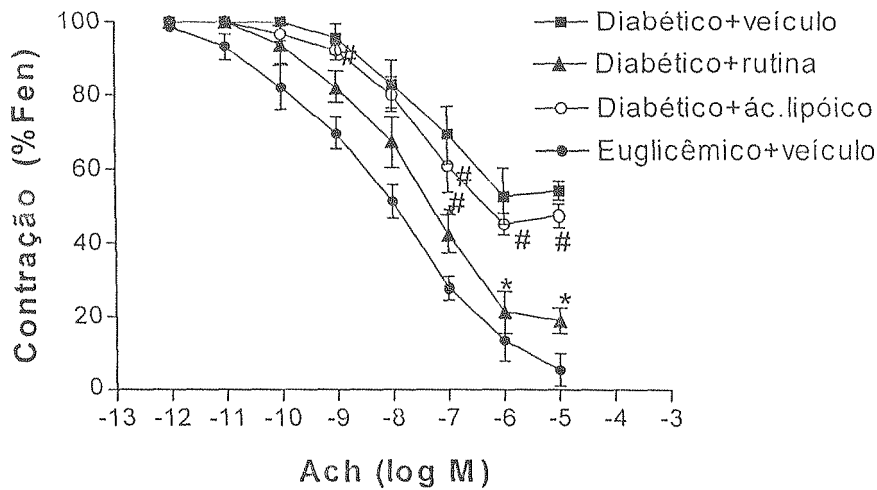
Os valores de relaxamento máximo para acetilcolina foram de  $100 \pm 0$  % nos animais euglicêmicos e de  $55,4 \pm 3,9$  % ( $p < 0,05$  vs. eugli) nos tecidos de ratos diabéticos, enquanto que nos animais tratados com ácido lipóico foi de  $75,2 \pm 3,1$  % ( $p < 0,05$  vs. Db) e de  $78,6 \pm 6,4$  % ( $p < 0,05$  vs. Db) nos tecidos de ratos diabéticos tratados com rotina (Tabela 4 e Figura 5).

O relaxamento endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio também não foi afetado neste tecido em nenhum dos grupos (Tabela 4 e Figura 5).

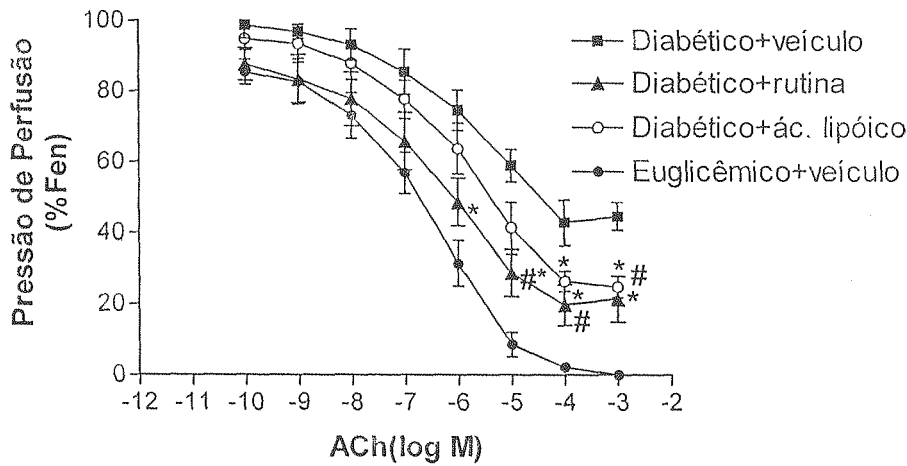


**Figura 3.** Registro fisiográfico representativo do efeito relaxante endotélio-dependente induzido pela acetilcolina (ACh) em anéis de aorta torácica de ratos euglicêmicos ou diabéticos (A) e (B), respectivamente, demonstrando ausência de disfunção endotelial nestes últimos. No final da curva de ACh (em B) foi adicionado nitroprussiato de sódio (1 μM) para verificar a integridade da musculatura lisa. A resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio contido foi similar em (C), tecidos de ratos euglicêmicos e (D) tecidos obtidos de ratos diabéticos. Os dois grupos foram tratados por 1 mês com salina (1 mL/Kg; 12/12h, p.o).

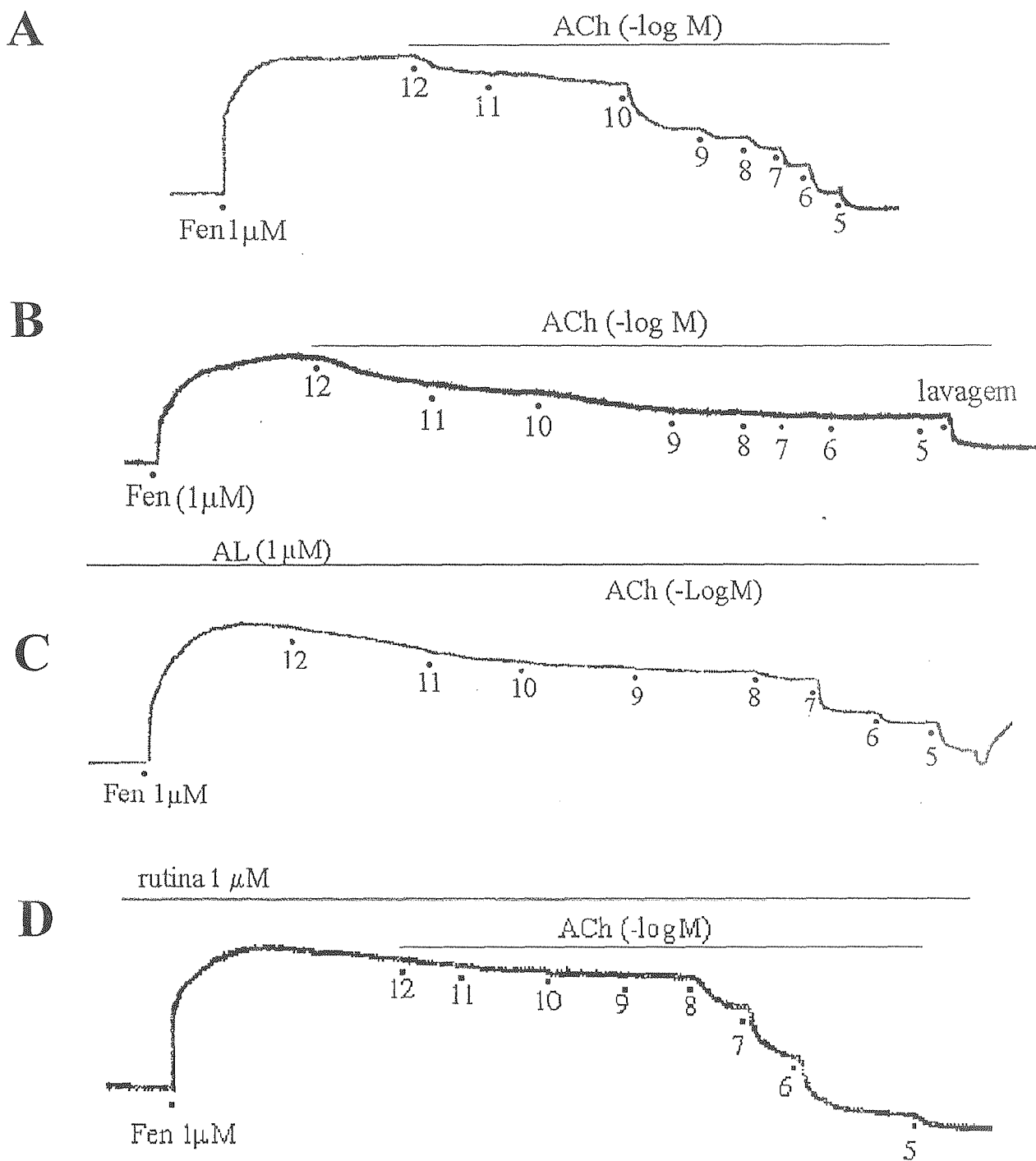




**Figura 4.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Diabético+salina. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. euglicêmico+salina.

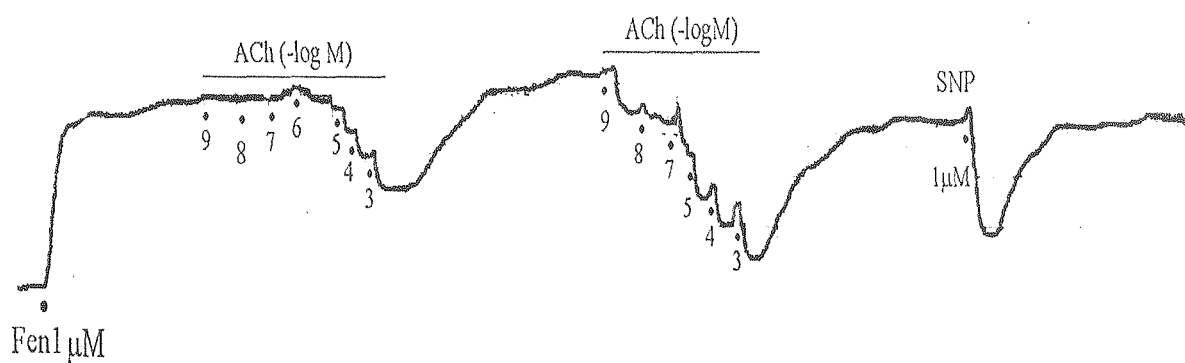


**Figura 5.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Diabético+salina. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. euglicêmico+salina.

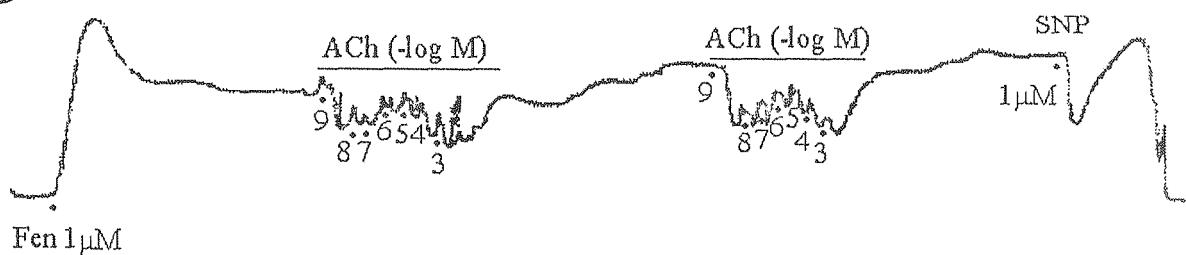


**Figura 6.** Registro fisiográfico representativo da resposta endotélio-dependente para acetilcolina em aortas obtidas de ratos euglicêmicos tratados com salina (1 mL/Kg/12h; v.o por 4 semanas) (A), diabéticos tratados com salina (1 mL/Kg/12h- v.o durante 4 semanas) (B), diabéticos tratados com ácido lipóico (AL; 20 mg/Kg/12h; v.o - 4 semanas) (C) ou diabéticos tratados com rutina (50 mg/Kg/12h; v.o-4 semanas) (D).

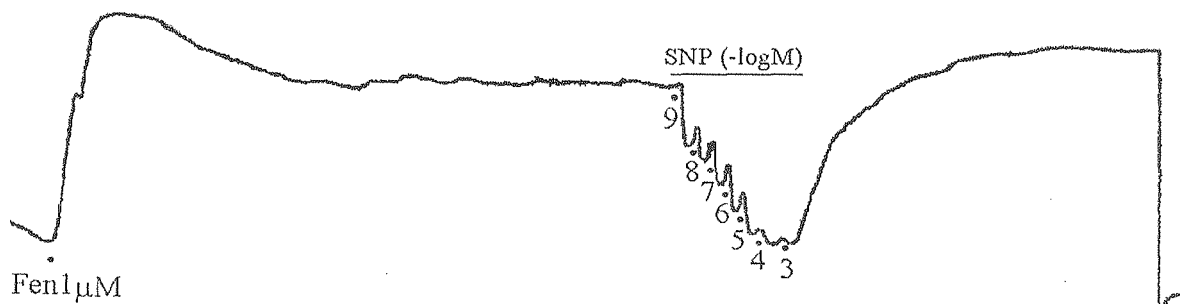
A



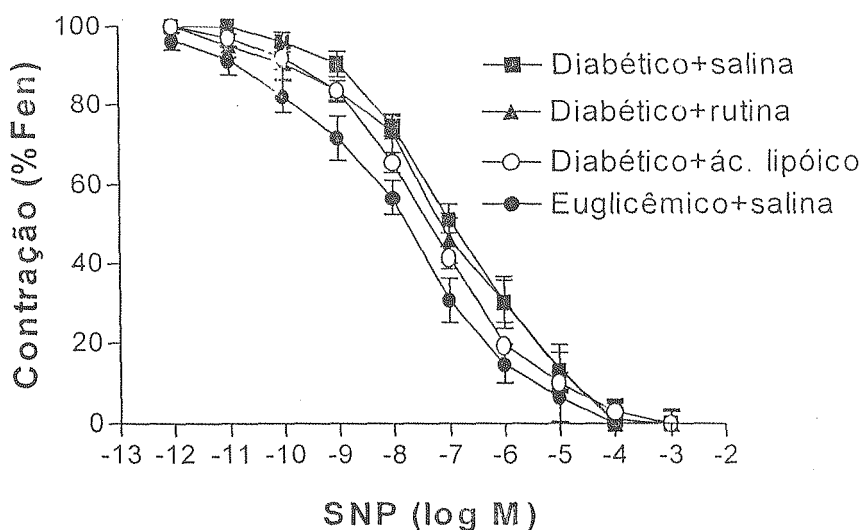
B



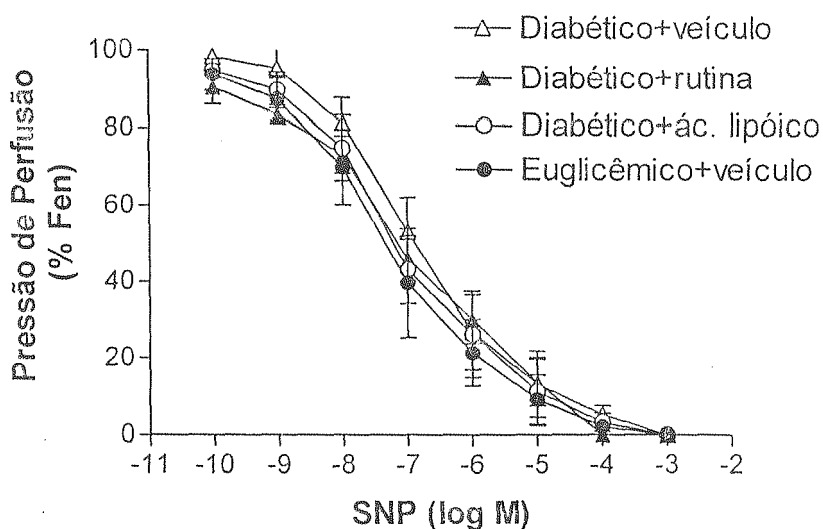
C



**Figura 7.** Registro fisiográfico representativo da resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico obtido de ratos euglicêmicos tratados com salina (1 mL/Kg/12h-v.o durante 4 semanas) (A), diabéticos tratados com salina (1 mL/Kg/12h-durante 4 semanas) (B) ou diabéticos tratados com rutina (50 mg/Kg/12h; v.o-por 4 semanas).



**Figura 8.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais.



**Figura 9.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais.

**Tabela 3.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + salina			
ACh	45,4 ± 2,5*	7,5 [7,9-7,1]	12
SNP	100	6,8 [7,0-6,7]	12
Euglicêmico + salina			
ACh	94,4 ± 4,6	8,0 [8,3-7,6]	7
SNP	100	7,7 [8,0-7,5]	7
Diabético + ác. lipóico			
ACh	52,2±3,1	7,6 [8,0-7,2]	7
SNP	100	7,3 [7,4-7,2]	7
Diabético + rutina			
ACh	81,1±3,6#	7,6 [9,7-5,9]	11
SNP	100	6,7 [7,2-6,6]	11

\*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina. #p<0,05, teste t de Student não pareado vs diabético+salina. 95% IC=intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 4.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos por aloxana tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.

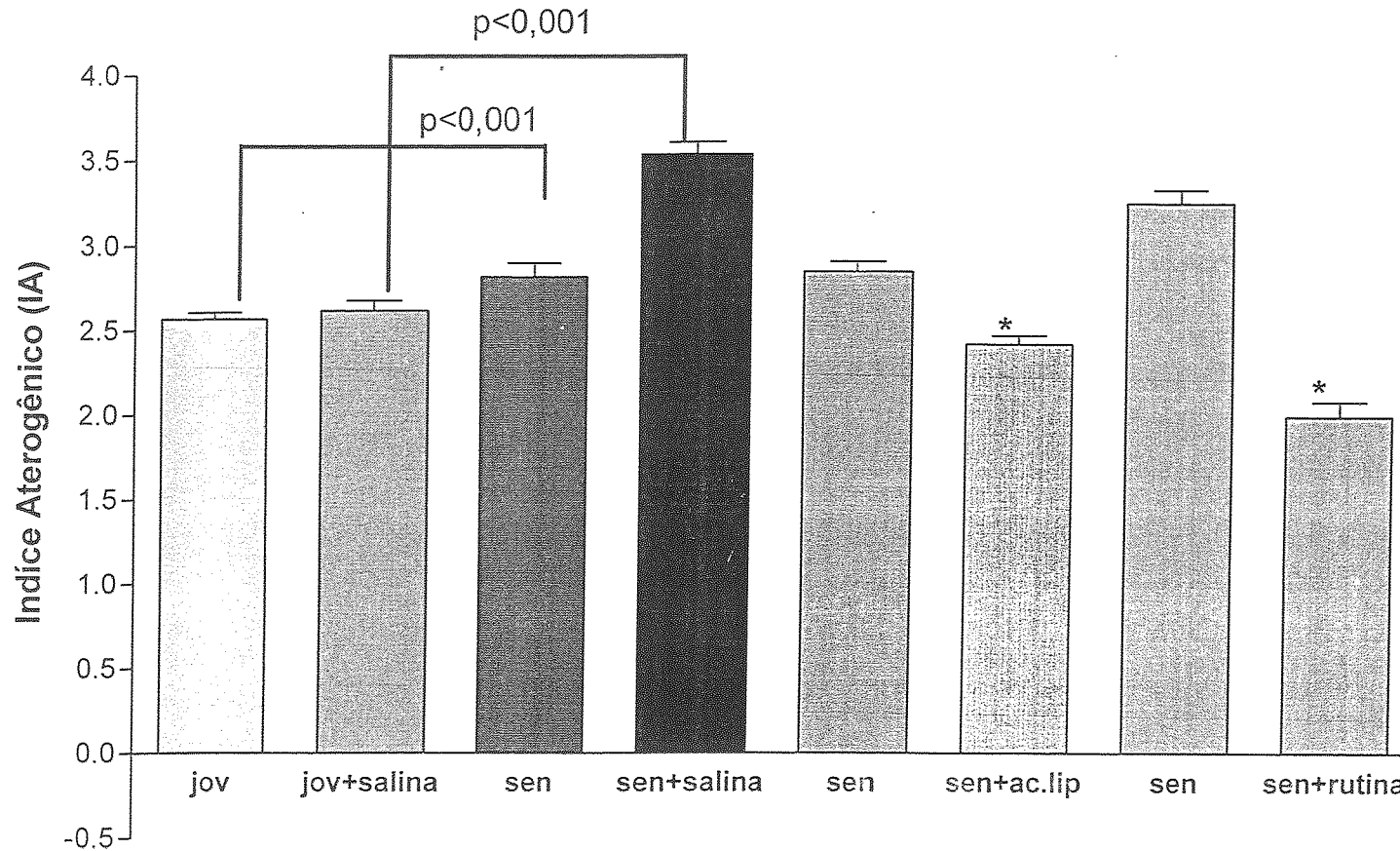
Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95% IC]	n
Diabéticos + salina			
ACh	55,4 ± 3,9*	5,7 [6,3-5,2]	12
SNP	100	6,8 [7,0-6,7]	12
Euglicêmico + salina			
ACh	100	6,4 [6,6-6,2]	7
SNP	100	7,3 [7,5-7,0]	7
Diabético + ác.lipóico			
ACh	75,2 ± 3,1#	5,8 [6,1-5,5]	7
SNP	100	6,9 [7,2-6,7]	7
Diabético + rutina			
ACh	78,6 ± 6,4#	6,3 [6,6-5,9]	11
SNP	100	7,1 [7,5-6,7]	11

\*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina. #p<0,05, teste t de Student não pareado vs diabético+salina.

**Tabela 5.** Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídes), pressão arterial média, peso corporal e glicemia de ratos jovens ou senescentes antes e após 4 semanas de tratamento com rutina, salina ou ácido lipóico.

Grupos (I to IV)	n	Peso corporal (g)	PAM (mmHg)	Glicose sérica (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
(I) ratos jovens	6	253,7±16,7		84,6±4,7	92,8±2,6	59,7±7,6	26±3	11,9±1,3	54,9±15,2
(I) ratos jovens + salina	6	280,6±13,4	87,9±5,2	82,3±4,4	89,9±2,3	66,4±3,8	24,8±2,9	13,3±1,4	51,8±13,1
(II) ratos senescentes	6	432,5±24,2		108,6±3,7*	63,8±17,4	60,6±6,7	16,7±4,1	12,1±2,1	35±3,7
(II) ratos senescentes + salina	6	487,6±21,3	124,3±14,7*	109,7±3,5	64,9±15	64,4±7	14,3±3,2	12,9±2,1	37,7±2,1
(III) ratos senescentes	6	445,7±19,4		116,9±4	106,7±18,7	122,4±4,5*	25,1±3,7	24,5±2,9	57,1±4,9
(III) ratos senescentes + rutina	6	493,5±27,3	108±7,2	118,6±4,3	99,6±16,9	86,7±13,1#	33,3±2,9	17,3±2,6	49±13,6
(III) ratos senescentes	6	426,7±18,7		135±13,9	80,5±4,9	73,8±6,7	20,9±2,7	14,8±2,6	44,8±4,8
(III) ratos senescentes + ac. lipóico	6	457,5±23,8	112±5,4	97,9±7,1#	78,3±6,7	71,3±8,7	22,9±3,4	14,3±2,4	41,1±5,5

\* p<0,05, teste t de Student não pareado bicaudal, comparado com ratos jovens. # p<0,05, teste t de Student pareado bicaudal, comparado com respectivo controle antes do tratamento. PAM= pressão arterial média; TG= triglicerídes; HDL= lipoproteína de alta densidade; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa e LDL= lipoproteína de baixa densidade.



**Figura 10.** Variação do índice aterogênico (IA), calculado pela seguinte fórmula  $IA = (LDL + VLDL) / HDL$  nos grupos de ratos jovens (3-4 meses de vida) tratados durante 4 semanas com salina ou nos ratos senescentes (>24 meses de vida) tratados com salina (1 mL/Kg/12h; p.o), ácido lipóico (20 mg/Kg/12h; p.o) ou rutina (50 mg/Kg/12h; p.o). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*p<0,05, teste t de Student pareado vs respectivo controle antes do tratamento

Por outro lado o perfil dos animais senescentes revelou uma pequena elevação na pressão arterial média ( $87,9 \pm 5,2$  mmHg-jovem vs.  $124,3 \pm 14,7$  mmHg-senescente,  $p < 0,05$ ) acompanhada de uma elevação nos valores glicêmicos ( $84,6 \pm 4,7$  mg/dL vs.  $108,6 \pm 3,7$  mg/dL). Em apenas um dos grupos (senescentes controle antes do tratamento com rotina) havia uma hipertrigliceridemia significativa ( $122,4 \pm 4,5$  mg/dL -Db pré-rutina vs.  $59,7 \pm 7,6$  jovens mg/dL  $p < 0,05$ .) Esta hipertrigliceridemia foi restaurada a níveis de normalidade pelo tratamento com rotina ( $122,4 \pm 4,5$  vs.  $86,7 \pm 13,1$ ,  $p < 0,05$ ) (Tabela 5).

Nesse grupo de animais o índice aterogênico também foi significativamente maior que controles jovens de mesmo sexo ( $2,62 \pm 0,04$  vs  $3,54 \pm 0,07$  ( $p < 0,05$ )). O tratamento oral com ácido lipóico foi capaz de reverter o índice aterogênico de  $2,85 \pm 0,05$  para  $2,42 \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ ) e com o tratamento com rotina de  $3,25 \pm 0,08$  para  $1,99 \pm 0,09$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).

A resposta máxima vasodilatadora à acetilcolina foi de  $89,4 \pm 2,9\%$  nos ratos jovens tratados com salina e de  $40,2 \pm 4,8\%$  nos animais senescentes. Os animais tratados com ácido lipóico apresentaram uma resposta vasodilatadora máxima em resposta à acetilcolina de  $63,5 \pm 4,9\%$  ( $p < 0,05$  vs. senescentes) e  $77,3 \pm 6,4\%$  nos ratos tratados ( $p < 0,05$  vs. senescentes) com rotina (Tabela 6 e Figura 10 e 12). A disfunção endotelial calculada nestes animais foi de  $55 \pm 5,2\%$  comparada com  $29 \pm 3,4\%$  ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com ácido lipóico e  $13,5 \pm 1,3\%$  ( $p < 0,05$ ) nos ratos tratados com rotina. A inibição percentual da disfunção endotelial dos animais senescentes após tratamento com ácido lipóico foi de  $47,4 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,05$ ) e nos animais tratados com rotina foi de  $75,4 \pm 4,9\%$  ( $p < 0,05$ ).

Nesses animais a resposta ao nitrovasodilatador, nitroprussiato de sódio, também ficou inalterada entre os grupos (Tabela 6 e figura 13).

A diminuição máxima da pressão de perfusão do leito arteriolar mesentérico induzida por acetilcolina nos animais senescentes foi de  $46,6 \pm 2,3\%$  comparada com  $100 \pm 0\%$  ( $p < 0,05$ ) obtidas em tecidos de ratos jovens. O grupo de animais tratados com

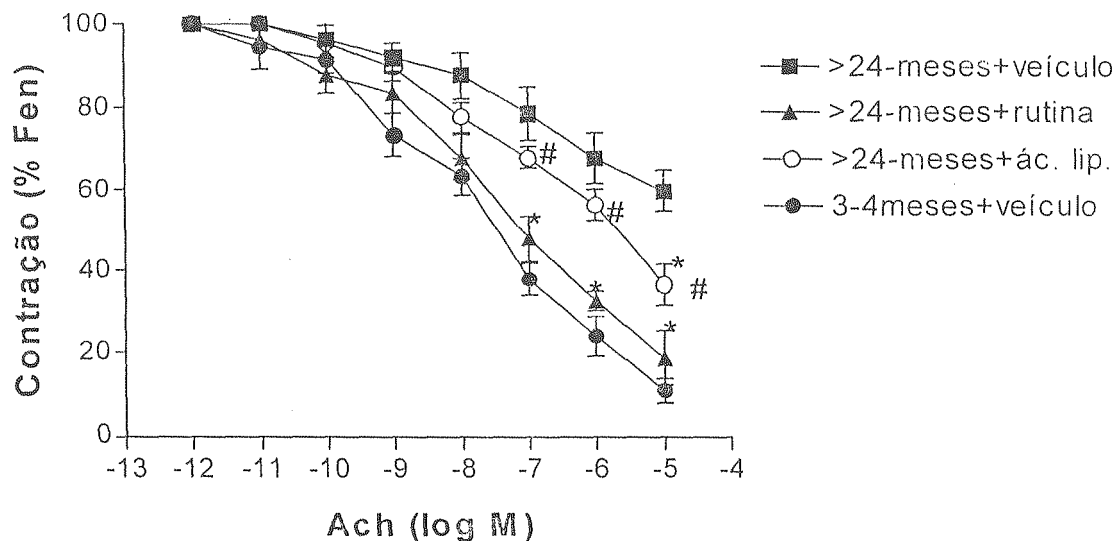


ácido lipóico apresentou resposta máxima de  $72,1 \pm 4,2\%$  ( $p < 0,05$  vs. senescentes) e  $93,9 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,05$  vs. senescentes) nos animais tratados com rutina (Tabela 7 e Figura 11). Os animais senescentes apresentaram uma disfunção endotelial de  $53,4 \pm 4,2\%$  comparada com  $27,9 \pm 3,7\%$  nos animais tratados com ácido lipóico e  $6,1 \pm 1,3\%$  nos tecidos obtidos de ratos senescentes tratados com rutina. A inibição percentual da disfunção endotelial no grupo de animais tratados com ácido lipóico foi de  $47,8 \pm 5,4\%$  e de  $88,6 \pm 6,7\%$  nos animais tratados com rutina.

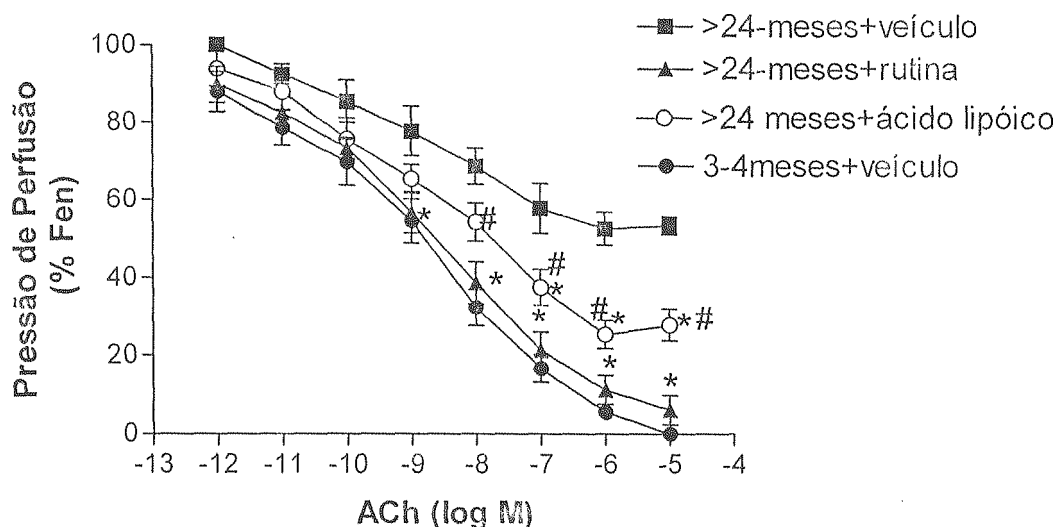
De maneira similar, a resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio não foi significativamente diferente nos diversos grupos estudados (Tabela 7 e Figura 14).

ácido lipóico apresentou resposta máxima de  $72,1 \pm 4,2\%$  ( $p < 0,05$  vs. senescentes) e  $93,9 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,05$  vs. senescentes) nos animais tratados com rutina (Tabela 7 e Figura 11). Os animais senescentes apresentaram uma disfunção endotelial de  $53,4 \pm 4,2\%$  comparada com  $27,9 \pm 3,7\%$  nos animais tratados com ácido lipóico e  $6,1 \pm 1,3\%$  nos tecidos obtidos de ratos senescentes tratados com rutina. A inibição percentual da disfunção endotelial no grupo de animais tratados com ácido lipóico foi de  $47,8 \pm 5,4\%$  e de  $88,6 \pm 6,7\%$  nos animais tratados com rutina.

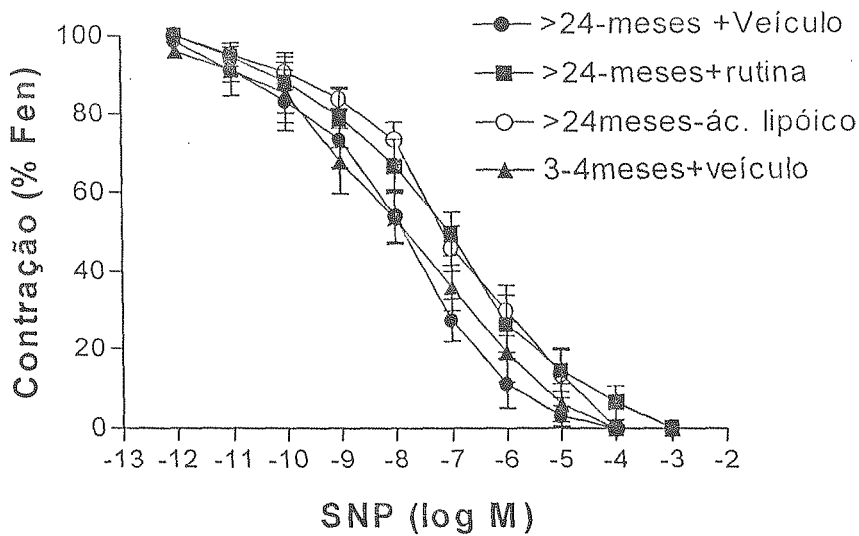
De maneira similar, a resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio não foi significativamente diferente nos diversos grupos estudados (Tabela 7 e Figura 14).



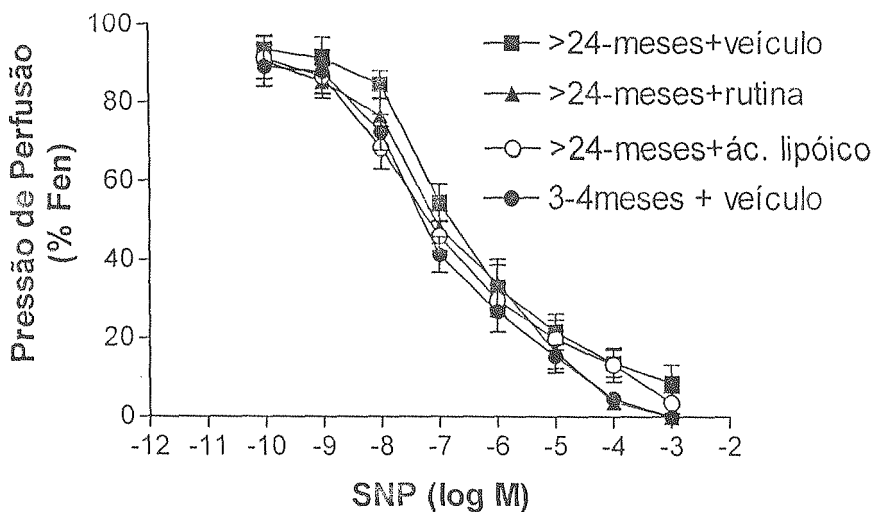
**Figura 11.** Efeito do tratamento de ratos senescentes (idade >24 meses) com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina (ACh) em anéis de aorta torácica. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. senescentes+salina. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. jovens+salina.



**Figura 12.** Efeito do tratamento de ratos senescentes com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida por acetilcolina (ACh) no leito arteriolar mesentérico perfundido. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. senescentes+salina. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. jovens+salina.



**Figura 13.** Efeito do tratamento de ratos senescentes com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 unidades experimentais.



**Figura 14.** Efeito do tratamento de ratos senescentes com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 unidades experimentais.

**Tabela 6.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina; Ach) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos senescentes tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.

Grupo	R <sub>máx</sub> (% Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Senescentes + salina			
ACh	40,2 ± 4,8*	6,4 [7,6-5,2]	6
SNP	100	7,0 [7,3-6,8]	6
Jovens + salina			
ACh	89,4 ± 2,9	7,5 [8,3-6,7]	6
SNP	100	7,8 [8,0-7,6]	6
Senescentes + ác. lipóico			
ACh	63,5±4,9#	6,8 [15,4-7,9]	6
SNP	100	6,9 [7,2-6,6]	6
Senescentes + rutina			
ACh	77,3±6,4#	7,1 [7,9-6,4]	6
SNP	100	7,7 [8-7,4]	6

\*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina. #p<0,05, teste t de Student não pareado vs diabético+salina.

**Tabela 7.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina; Ach) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) no leito arteriolar mesentérico de ratos senescentes tratados com ácido lipóico (20 mg/Kg/12h) ou rutina (50mg/Kg/12h) durante um mês.

Grupo	R <sub>máx</sub> (% Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Senescentes + salina			
ACh	46,6± 2,3*	7,0 [7,9-6,1]	6
SNP	91,4±4,6	6,8 [7,2-6,5]	6
Jovens + salina			
ACh	100	6,5 [6,8-6,2]	6
SNP	100	7,1 [7,7-6,5]	6
Senescentes + ác. lipóico			
ACh	72,1 ± 4,2#	6,6 [7,5-5,7]	6
SNP	96,4±2,6	7,2 [7,9-6,6]	6
Senescente + rutina			
ACh	93,9 ± 3,7#	6,5 [6,6-6,3]	6
SNP	100	6,7 [7,2-6,1]	6

\*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina. #p<0,05, teste t de Student não pareado vs diabético+salina.

#### 4.1.2 Ratos diabéticos por aloxana tratados por via oral com componentes do mediador putativo da insulina (d-quirositol e metil-d-quirositol)

Os ratos tratados com aloxana apresentaram hiperglicemia ( $89,6 \pm 9,0$  mg/dL vs.  $392 \pm 31,7$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) persistente após indução que estava associada a hipertrigliceridemia ( $63 \pm 8,3$  mg/dL vs.  $132 \pm 29,7$  mg/dL,  $p < 0,05$ ). O ganho de peso foi reduzido nestes animais em comparação com ratos euglicêmicos de mesma idade e sexo ( $27,5 \pm 3,4\%$ -eugli vs.  $7,9 \pm 1,5\%$ ;  $p < 0,05$ -Db). Nenhum dos tratamentos foi capaz de restaurar o ganho de peso desses animais (Tabela 8).

A hipertrigliceridemia associada foi significativamente restaurada após tratamento com D-quirositol ( $254,6 \pm 53,6$  mg/dL -Db e  $123 \pm 12,1$  mg/dL;  $p < 0,05$ -Db+D-quirositol) (Tabela 8).

O *status* diabético induzido por aloxana nesses animais também se caracterizou por um índice aterogênico maior em comparação aos animais euglicêmicos de mesma idade e sexo ( $2,03 \pm 0,04$ - eugli vs.  $3,86 \pm 0,09$ -Db,  $p < 0,05$ ). O tratamento com D-quirositol ( $4,36 \pm 0,06$  vs.  $2,08 \pm 0,06$ ,  $p < 0,05$ ) ou com metil-D-quirositol ( $3,97 \pm 0,08$  vs.  $3,07 \pm 0,09$ ,  $p < 0,05$ ) foi capaz de diminuir o índice aterogênico desses animais (Figura 15)

**Tabela 8.** Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídes), pressão arterial média, peso corporal e glicemia ratos euglicêmicos ou diabéticos antes e após 4-semanas de tratamento com salina, D-qui-ro-ino-sitol ou pinitol.

Grupos (I to III)	N	Peso Corporal (g)	PAM (mmHg)	Plasma glucose (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
(I) Euglicêmico	7	247±15,6		89,6±9	63,6±5,8	63±8,3	21±1,9	12,6±1,6	30±4,6
(I) Euglicêmico + salina	7	315 ± 21*	91 ± 4,3	77,3±6,6	91,1±12,7	82±12	28±2,5	16,4±2,5	46,7±8,6
(II) Hiperglicêmico	12	214 ± 12,3		392±31,7	78,3±7,9	132±29,7 <sup>#</sup>	16,1±2	26,4±5,9	35,8±5,0
(II) Hiperglicêmico + salina	12	231 ± 15,4	125±8,7*	435,2±35,6	75,4±4,3	107±8 <sup>#</sup>	16,5±1,7	21,4±2,2	37,5±2,6
(III) Hiperglicêmico	9	223,4±17,3		587±48,6 <sup>#</sup>	99,1±6,7	254,6±53,6	18,5±1,9	50,9±10,	29,7±7,2
						#		7	
(III) Hiperglicêmico + D-qui-ro-ino-sitol	9	246±24	116±5,4	410±10,2 <sup>**</sup>	80,8±4,6	123±12,1*	26,2±1,4	24,6±2,4	30±3,3
(III) Hiperglicêmico	7	221,4±12		334,1±15,2	89,5±4,4	240,7±54,3	18±3,0	48,1±3,4	23,4±2,6
(III) Hiperglicêmico + Pinitol	7	237±7	113±6,8	245±24*	88±5,6	221±28	21,6±4,6	44,2±5,3	22,2±3,7

<sup>a</sup> p<0.05, teste t de Student pareado bicaudal, comparado com controle respectivo, i.e., com os valores obtidos antes do início dos protocolos experimentais. # p<0.05 teste t de Student pareado bicaudal, comparado do grupo euglicêmico. PAM= pressão arterial média; TG= triglicerídes; HDL= lipoproteína de alta-densidade; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa e LDL= lipoproteína de baixa densidade

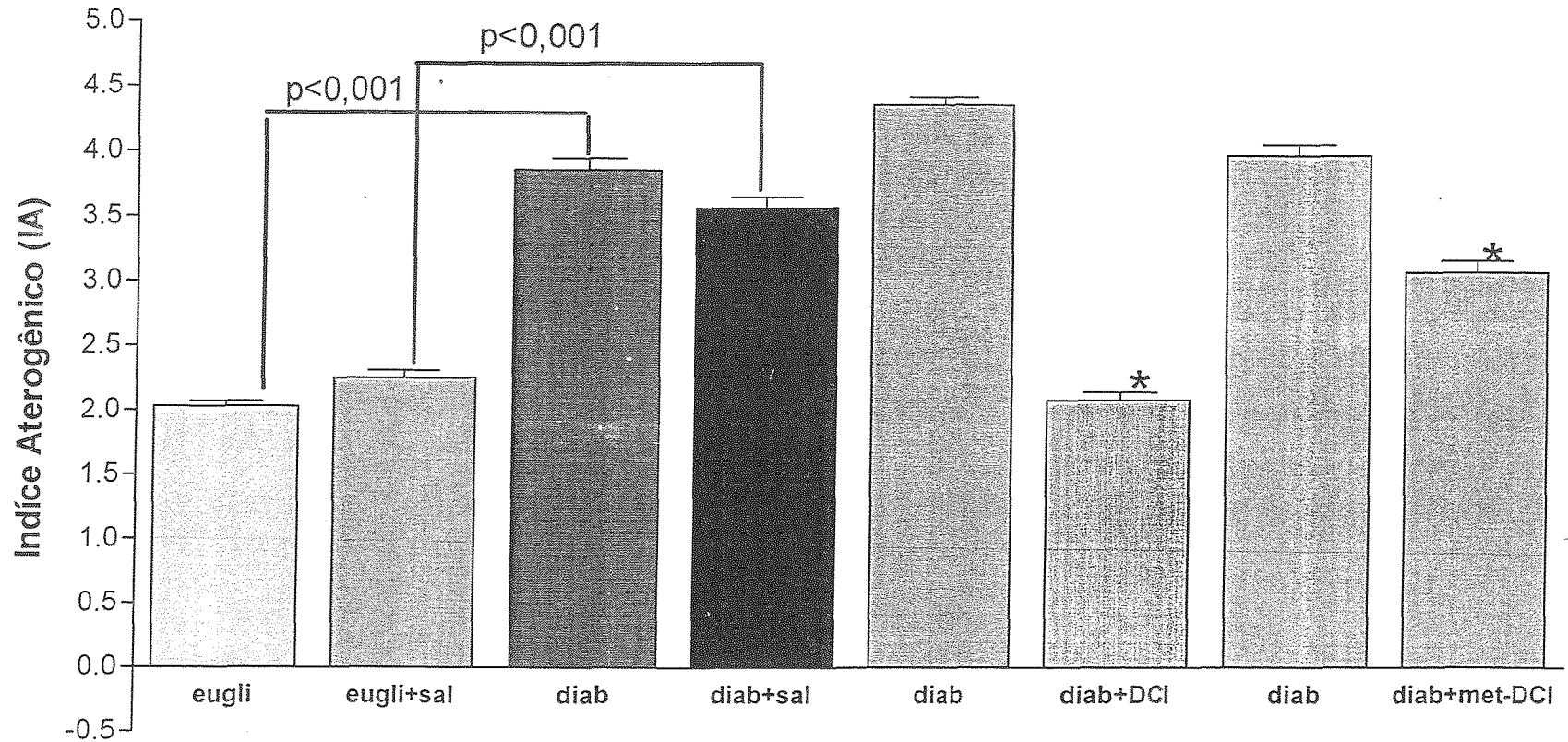


Figura 15. Variação do índice aterogênico (IA), calculado pela seguinte fórmula  $IA = (LDL + VLDL) / HDL$  nos grupos de ratos euglicêmicos tratados com salina ou nos ratos diabéticos por aloxana tratados com salina, D-quirositol ou pinitol. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 7 animais. \* $p < 0,05$ , teste t de Student pareado vs respectivo controle antes do tratamento. DCI=D-quirositol; met-DCI=pinitol.



A disfunção endotelial na aorta de ratos diabéticos foi de  $50,5 \pm 5,1\%$  comparada com  $38,0 \pm 2,4\%$  nos animais tratados com D-quirositol e  $31,4 \pm 2,8\%$  ( $p < 0,05$ ) nos ratos tratados com metil-D-quirositol. A inibição percentual da disfunção nos animais tratados com D-quirositol foi de  $24,7 \pm 3,9\%$  e nos tratados com metil-D-quirositol foi de  $37,9 \pm 4,7\%$ .

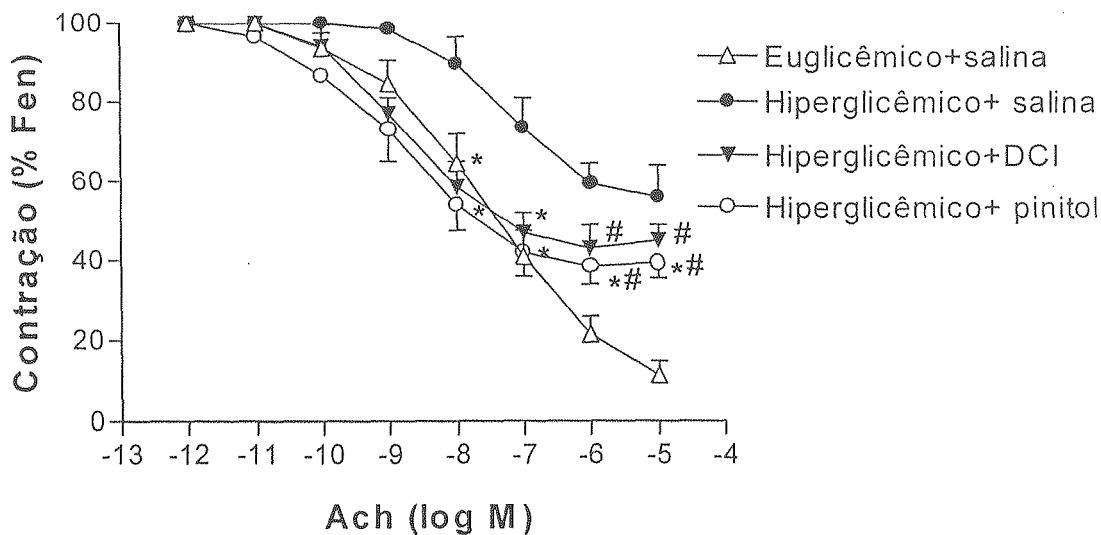
A resposta endotélio-dependente evocada por acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos diabéticos foi de  $43,7 \pm 7,6\%$  comparada com  $88,3 \pm 3,5\%$  nos tecidos obtidos de animais euglicêmicos ( $p < 0,05$ ). Os tecidos de animais tratados por via oral com D-quirositol apresentaram resposta máxima relaxante induzida por acetilcolina de  $54,7 \pm 3,6\%$  e de  $60,6 \pm 3,6\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) nos animais tratados com metil-D-quirositol (Tabela 9 e Figura 16).

A resposta da musculatura lisa dos anéis de aorta ao nitroprussiato de sódio não diferiu significativamente (Tabela 9 e Figura 18).

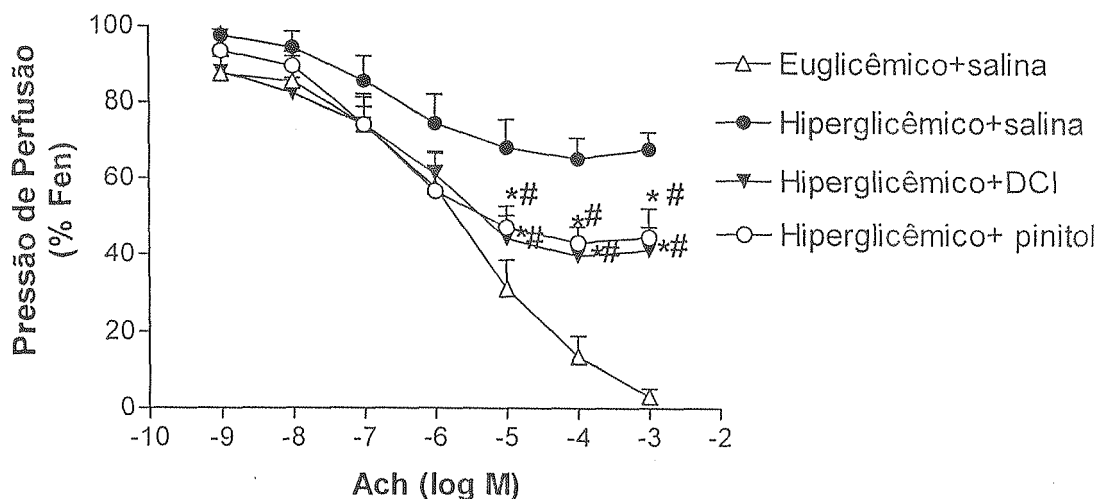
A queda máxima na pressão de perfusão do leito arteriolar mesentérico induzida por acetilcolina foi de  $96,9 \pm 2,1\%$  nos ratos euglicêmicos comparada com  $32,1 \pm 4,3\%$  ( $p < 0,05$ ) nos ratos diabéticos. A resposta vasodilatadora máxima nos animais diabéticos tratados com D-quirositol foi de  $58,7 \pm 6,0\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) e de  $55,4 \pm 7,6\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) (Tabela 10 e Figura 17).

A disfunção endotelial apresentada no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos, neste grupo, foi de  $66,9 \pm 6,2\%$  comparada com  $39,4 \pm 4,3\%$  ( $p < 0,05$ ) nos ratos tratados com D-quirositol e  $48,8 \pm 5,2\%$  ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com metil-D-quirositol. O percentual de inibição da disfunção foi de  $41 \pm 3,7\%$  nos animais tratados com D-quirositol e de  $36,0 \pm 3,9\%$  nos animais tratados com metil-D-quirositol.

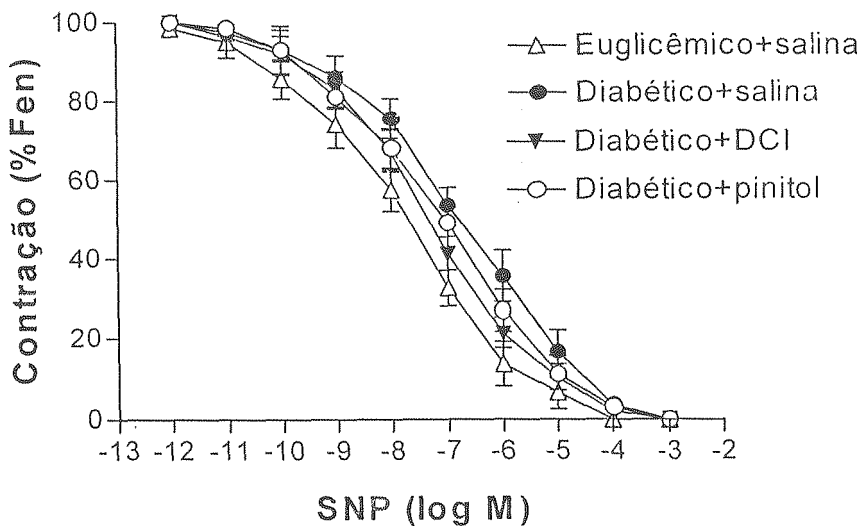
A resposta endotélio-independente não foi alterada em nenhum dos grupos estudados (Tabela 10 e Figura 19).



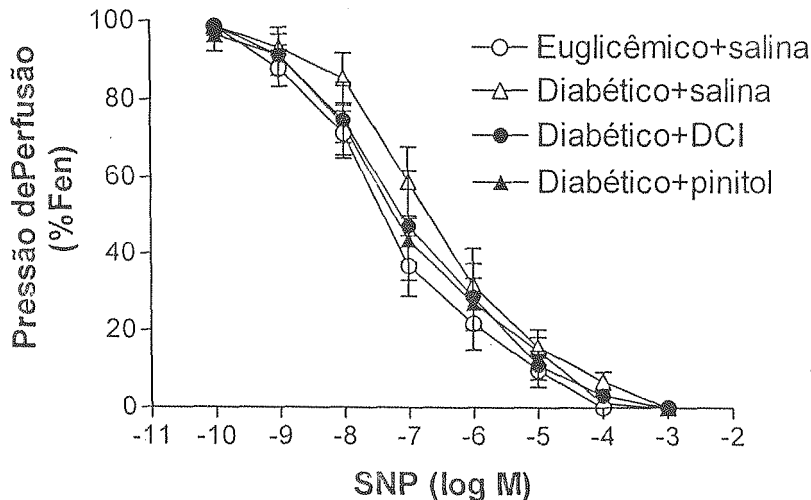
**Figura 16.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com D-qui-ro-inositol (DCI; 20 mg/Kg/12h) ou pinitol (20 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Diabético+salina. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. euglicêmico+salina.



**Figura 17.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com D-qui-ro-inositol (DCI; 20 mg/Kg/12h) ou pinitol (50 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Diabético+salina. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. euglicêmico+salina.



**Figura 18.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com D-quiró-inositol (20 mg/Kg/12h) ou pinitol (20 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais.



**Figura 19.** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com D-quiró-inositol (20 mg/Kg/12h) ou pinitol (20 mg/Kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais.

**Tabela 9.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana tratados com D-quirositol (20 mg/Kg/12h) ou pinitol (20mg/Kg/12h) durante um mês.

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + salina			
ACh	43,7 ± 7,6*	7,2 [7,3-7,1]	12
SNP	100 ± 0	6,6 [6,8-6,4]	12
Euglicêmico + salina			
ACh	88,3 ± 3,5	7,5 [7,6-7,3]	7
SNP	100 ± 0	7,7 [7,9-7,5]	7
Diabético + DCI			
ACh	54,7 ± 3,6	8,8 [8,9-8,5]	7
SNP	100 ± 0	7,3 [7,6-7,2]	7
Diabético + met-DCI			
ACh	60,6 ± 3,6#	8,8 [9,0-8,6]	9
SNP	100 ± 0	7,0 [7,2-6,9]	9

\*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina. \*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina.

**Tabela 10.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos por aloxana tratados com D-quirositol (20 mg/Kg/12h) ou pinitol (20mg/Kg/12h) durante um mês.

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub>	n
Diabéticos + salina			
ACh	32,1 ± 4,3*	6,7 [7,1-6,3]	12
SNP	100 ± 0	6,7 [6,9-6,4]	12
Euglicêmico + salina			
ACh	96,9 ± 2,1	5,4 [5,7-5,2]	7
SNP	100 ± 0	7,4 [7,9-6,9]	7
Diabético + DCI			
ACh	58,7 ± 6,0#		7
SNP	100 ± 0	6,2 [6,8-5,7] 7,1 [7,3-6,8]	7
Diabético + met-DCI			
ACh	55,4 ± 7,6#	6,7 [6,9-6,5]	9
SNP	100 ± 0	7,1 [7,7-6,6]	9

\*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina. \*p<0,05, teste t de Student não pareado vs. euglicêmico+salina.

## 4.2. Incubação ou infusão das drogas testes *in vitro*: avaliação do potencial curativo

### 4.2.1. Efeito dos antioxidantes GSH, ácido lipóico e rutina na disfunção endotelial em anéis de aorta torácica e leito vascular mesentérico de ratos diabéticos por aloxana

Os ratos desse conjunto experimental (ver Tabela 11) foram utilizados para testes de reversão da disfunção endotelial por incubação ou infusão *in vitro* por 1 hora dos agentes testes. A disfunção endotelial apresentada nos anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana foi de  $58,2 \pm 4,6\%$ . Nos tecidos incubados com catequina a disfunção foi de  $62 \pm 4,8\%$  e naqueles tratados com rutina foi de  $38,3 \pm 4,5\%$  ( $p < 0,05$ ). A resposta máxima relaxante para acetilcolina foi de  $40,4 \pm 2,3\%$  nos tecidos de ratos diabéticos comparada com  $96,8 \pm 1,2\%$  nos tecidos obtidos de ratos euglicêmicos ( $p < 0,05$  vs. Db) (Tabela 12). Nos tecidos pré-incubados com catequina a resposta máxima foi de  $36,8 \pm 4,6\%$  e naqueles pré-tratados com rutina foi de  $59,7 \pm 4,5\%$  ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12 e Figura 20a e 22).

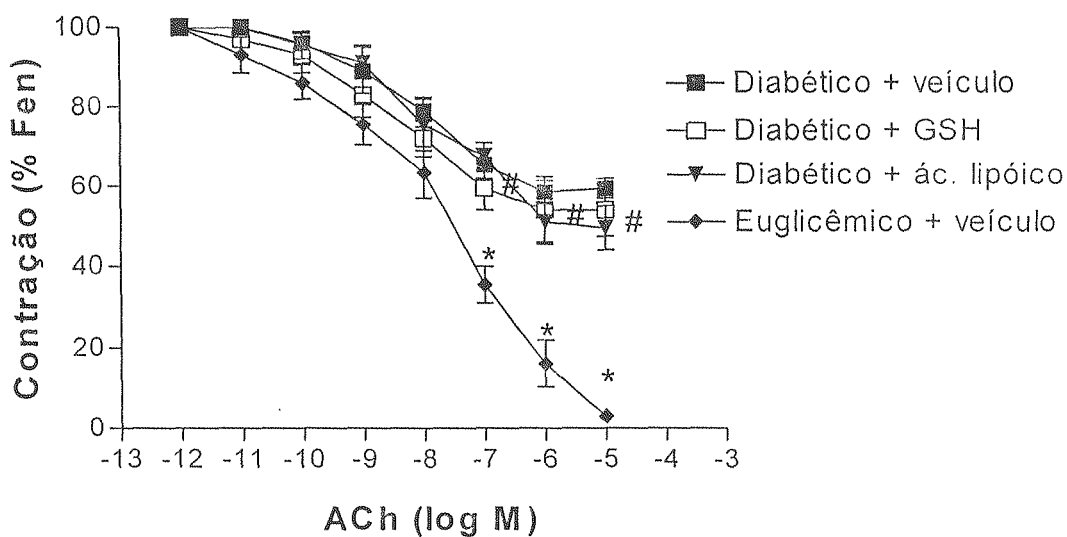
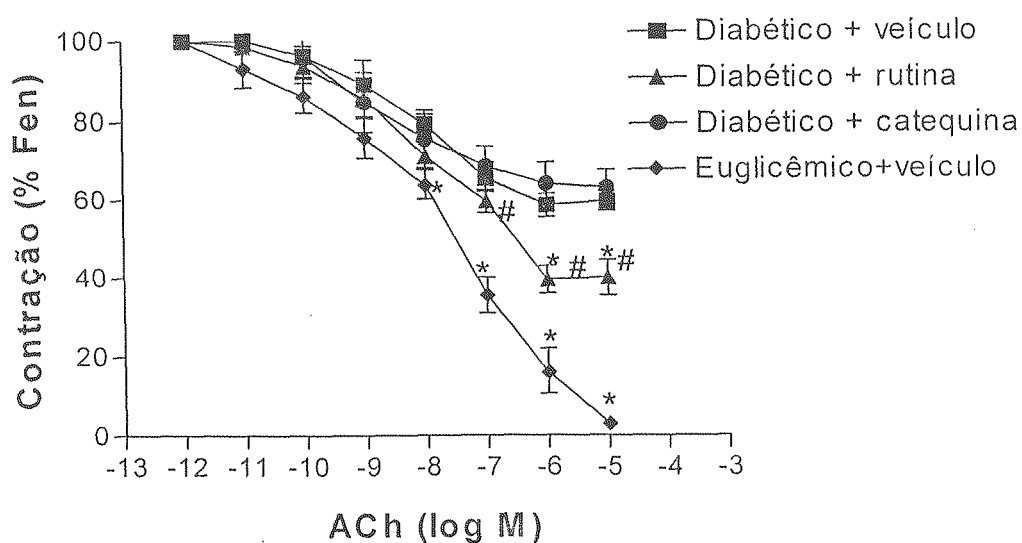
**Tabela 11.** Perfil glicêmico e peso corporal, após 4 semanas da indução, dos ratos diabéticos por aloxana utilizados para os testes *in vitro*.

Grupo	n	Peso corporal (g)	Glicose sérica (mg/dL)
Euglicêmicos	6	245 ± 13	75,9 ± 5,4
Diabéticos (controle)	6	196 ± 11,4*	321 ± 25,9*
Diabéticos (rutina)	6	184 ± 9,7*	284 ± 17,6*
Diabéticos +rutina+Sem endotélio	4	213,6 ± 11,4	245,6 ± 12,7*
Diabéticos (rutina)-K <sup>+</sup> 60mM	4	182,2 ± 6,3*	221,6 ± 12,3*
Diabéticos (rutina)-L-NAME	4	221,3 ± 12,1	324,5 ± 13,4*
Diabéticos (rutina)-ODQ	4	216,7 ± 8,7	287,6 ± 15,4*
Diabéticos (rutina)-Caribdotoxina-apamina	4	234 ± 12,3	315,4 ± 12,4*
Diabéticos (catequina)	6	211 ± 13,6	263,8 ± 15,4*
Diabéticos (GSH)	6	215 ± 14,2	315,4 ± 21,4*
Diabéticos (ác. Lipóico)	6	176,3 ± 8,9*	291,3 ± 15,7*
Diabéticos (DCI)	6	209,6 ± 10,9	245,3 ± 11,3*
Diabéticos (me-DCI)	6	224,6 ± 14,3	256,7 ± 12,8*

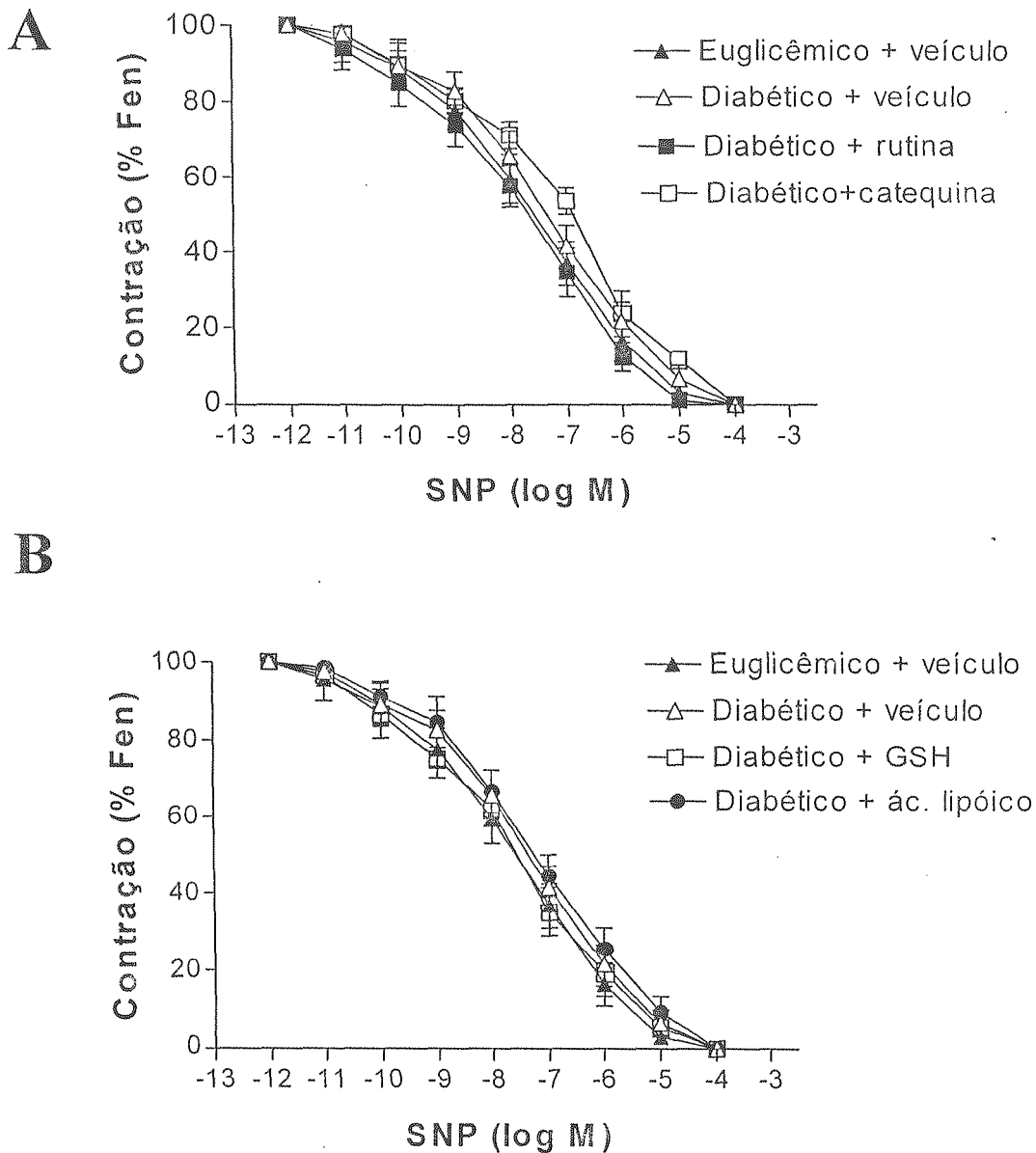
\* $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado bicaudal, comparado com os animais euglicêmicos. Estes animais foram utilizados para experimentos de anéis de aorta torácica e perfusão de leito vascular mesentérico isolado.

Em outro conjunto de experimentos a incubação dos tecidos com GSH ou ácido lipóico mostrou-se ineficiente em melhorar a resposta endotélio-dependente após incubação por 1 hora nos tecidos de ratos diabéticos. A resposta máxima para acetilcolina foi de  $45,8 \pm 6,5\%$  ( $p > 0,05$  vs. Db) nos ratos tratados com GSH e de  $50,4 \pm 5,7\%$  ( $p > 0,05$  vs. Db) nos pré-tratados com ácido lipóico (Tabela 12 e Figura 20b). A leve inibição na disfunção endotelial de  $9,6 \pm 1,5\%$  e  $17,7 \pm 2,1\%$  obtida nestes protocolos não foi estatisticamente significativa.

A resposta ao nitroprussiato de sódio foi similar em todos os grupos estudados. A resposta máxima relaxante para este agonista foi de 100% em todos os grupos com variação não significativa dos cologarismos das concentrações necessárias para produzir metade da resposta máxima ( $PD_2$ ) (Tabela 12 e Figura 21 a e b).

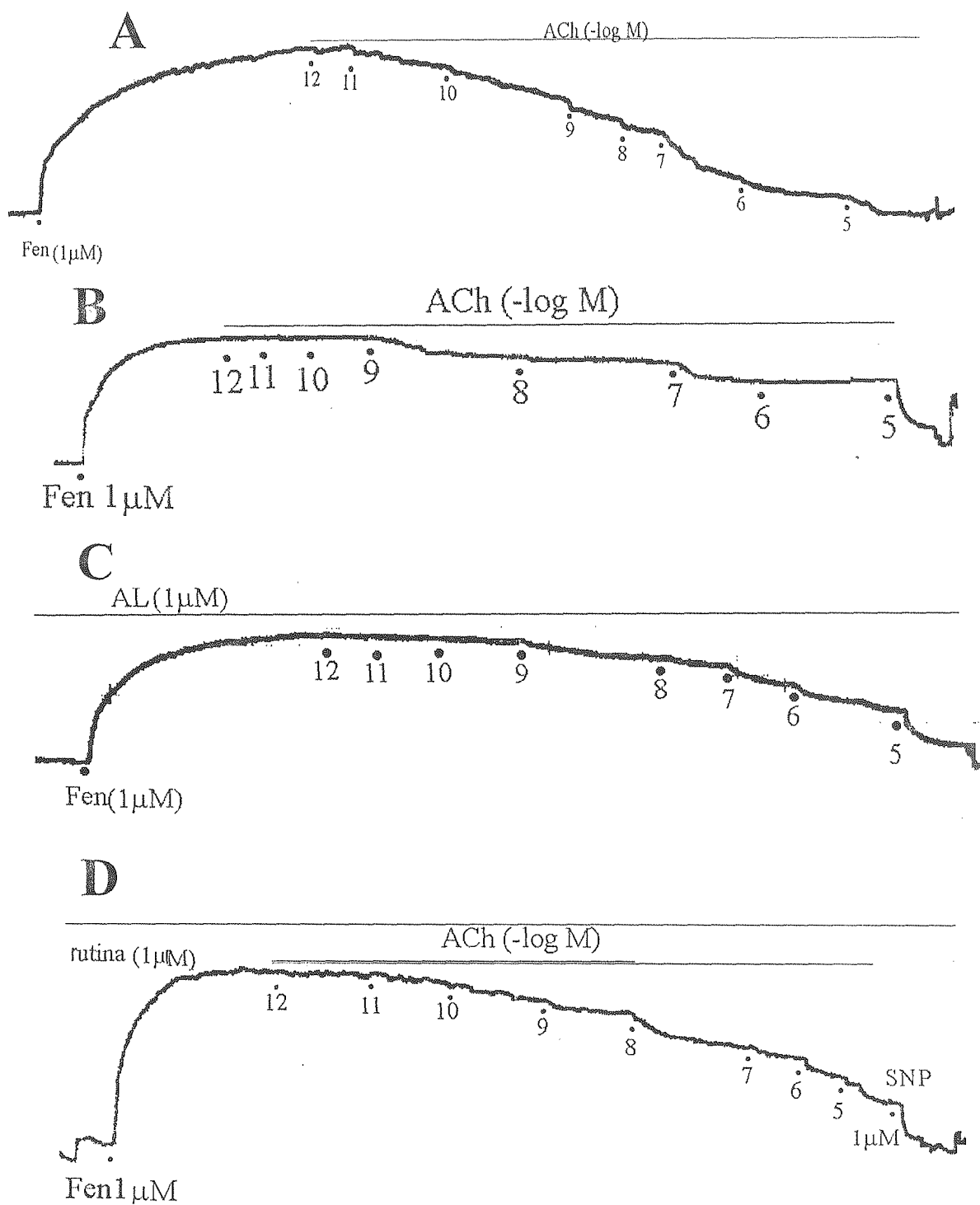


**Figura 20.** Efeito da incubação por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou do grupo das flavanas (catequina) na concentração de 1  $\mu$ M no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos (A). Em B é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de 1  $\mu$ M. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo. \* $p < 0.05$  vs. respostas obtidas em tecidos de ratos diabéticos pré-tratados apenas com salina. #  $p < 0.05$  vs. respostas obtidas em tecidos de ratos euglicêmicos. Os controles diabéticos e euglicêmicos são os mesmos em A e B e os gráficos estão separados por questão de clareza.



**Figura 21.** Efeito da incubação por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou o grupo das flavanas (catequina) na concentração de  $1 \mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos diabéticos (A). Em B é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de  $1 \mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo. Os controles diabéticos e euglicêmicos são os mesmos em A e B e os gráficos estão separados por questão de clareza.





**Figura 22.** Registro fisiográfico representativo da resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta de ratos euglicêmicos e incubados por 1 hora com salina (A), de ratos diabéticos e incubadas com salina (B), de ratos diabéticos e incubadas com ácido lipóico (AL) (C) e de ratos diabéticos incubados com rutina (D).

**Tabela 12.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana e incubadas *in vitro* com 1 $\mu$ M de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico.

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + salina			
ACh	40,4 $\pm$ 2,3*	8,1 [8,3-7,8]	6
SNP	100	6,8 [7,4-7,0]	6
Euglicêmico + salina			
ACh	96,8 $\pm$ 1,2	7,2 [8,0-6,4]	6
SNP	100	7,5 [7,6-7,3]	6
Diabético + rutina			
ACh	59,7 $\pm$ 4,5#	7,7 [8,4-7,0]	6
SNP	100	7,6 [7,9-7,1]	6
Diabético + catequina			
ACh	36,8 $\pm$ 4,6	8,5 [9,0-8,0]	6
SNP	100	6,6 [7,4-6,1]	6
Diabético + GSH			
ACh	45,8 $\pm$ 6,5	8,4 [8,7-8,1]	6
SNP	100	7,5 [7,8-7,1]	6
Diabético + ác. lipóico			
ACh	50,4 $\pm$ 5,7#	7,6 [8,3-6,9]	6
SNP	100	7,1 [7,3-6,8]	6

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

**Tabela 13.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina; ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) leito vascular mesentérico obtidas de ratos diabéticos por aloxana infundidos *in vitro* com 1  $\mu$ M de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico na taxa de 0,1 mL/min).

Grupo	R <sub>máx</sub> (% Fen)	PD <sub>2</sub> [95% IC]	n
Diabéticos + salina			
ACh	43,6 $\pm$ 4,6*	6,4 [6,9-5,9]	6
SNP	100	6,8 [7,4-6,4]	6
Euglicêmico + salina			
ACh	100	6,7 [7,3-6,1]	6
SNP	100	7,4 [7,9-6,9]	6
Diabético + rutina			
ACh	60,2 $\pm$ 5,2#	7,3 [7,6-7,0]	6
SNP	100	7,1 [7,7-6,5]	6
Diabético + catequina			
ACh	51,1 $\pm$ 6,5	6,5 [7,3-5,7]	6
SNP	100	6,1 [6,6-5,7]	6
Diabético + GSH			
ACh	48,7 $\pm$ 5,4	5,9 [6,8-5,1]	6
SNP	100	7,3 [7,7-6,9]	6
Diabético + ác. lipóico			
ACh	46,6 $\pm$ 4,8	6,1 [6,8-5,4]	6
SNP	100	6,4 [7,2-5,6]	6

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

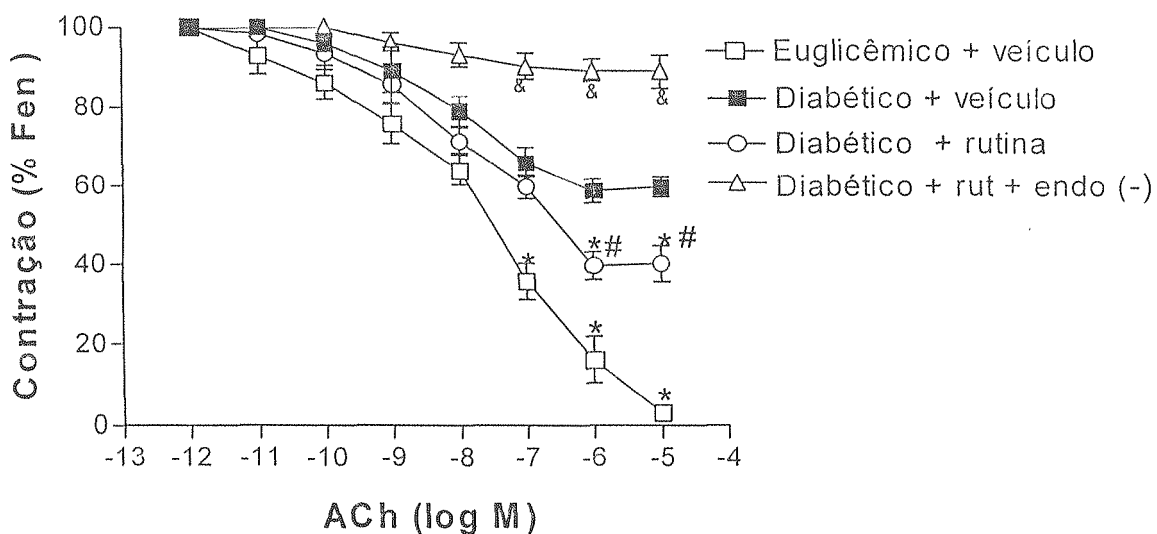
No sentido de investigar o possível mecanismo de ação da rutina na reversão da disfunção endotelial nos vasos de ratos diabéticos por aloxana avaliou-se seus efeitos em vasos com endotélio removido, na presença de alguns bloqueadores farmacológicos e em tecidos pré-contraídos com solução despolarizante ( $K^+$  60mM).

A remoção mecânica do endotélio aboliu completamente a melhora da resposta relaxante da acetilcolina induzida pela rutina. A resposta máxima relaxante evocada pela acetilcolina nos anéis de aorta desendotelizados e pré-tratados com rutina foi de  $11,1 \pm 4,3\%$  comparada com  $59,7 \pm 4,5\%$  nos tecidos não desendotelizados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 14 e Figura 23).

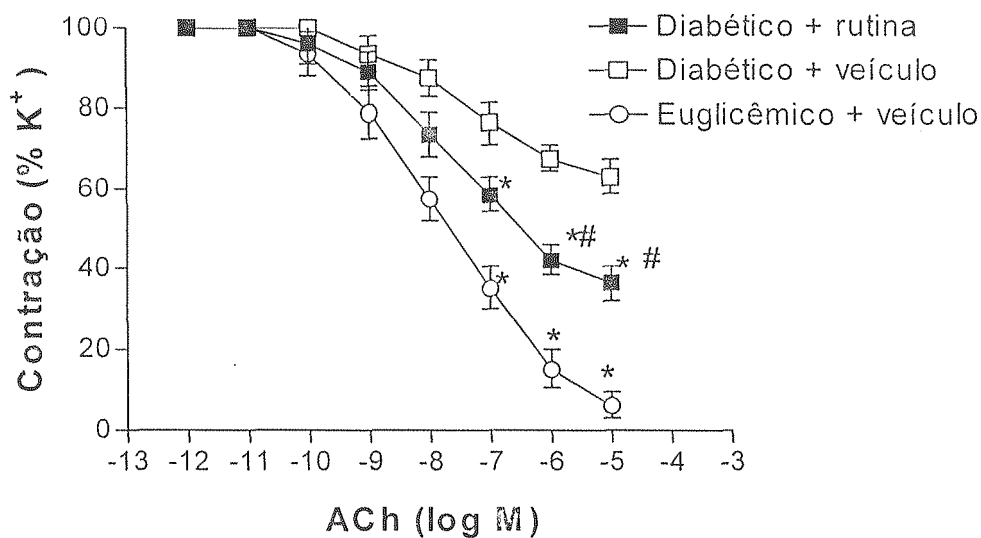
A resposta obtida com o pré-tratamento dos anéis de ratos diabéticos com rutina não foi significativamente afetada em anéis pré-contraídos com solução despolarizante ( $K^+$  60mM). A inibição da disfunção endotelial foi de  $34,2 \pm 3,1\%$  nos anéis obtidos de ratos diabéticos e pré-contraídos com fenilefrina e de  $47 \pm 3,9\%$  ( $p > 0,05$ ) nos anéis pré-contraídos com solução despolarizante (Tabela 14 e Figura 24).

A exposição, por 5 min, dos anéis, após 1 hora de incubação com rutina com o bloqueador da óxido nítrico sintetase (L-NAME) ou da guanilil ciclase solúvel (ODQ) também bloquearam a melhora da resposta endotélio-dependente observada no grupo tratado com rutina apenas. A resposta máxima à acetilcolina nos tecidos pré-tratados com rutina foi de  $19,7 \pm 4,5\%$ , enquanto que naqueles tratados com L-NAME ou ODQ foram de  $14,7 \pm 2,9\%$  ( $p > 0,05$ ) e  $12,4 \pm 3,5\%$  ( $p > 0,05$ ), respectivamente (Tabela 14 e Figura 25).

O uso dos bloqueadores de canais de potássio  $Ca^{2+}$ -sensíveis, caribdotoxina e apamina, não afetou a melhora da resposta endotélio-dependente induzida pela rutina quando utilizada isoladamente. A inibição da disfunção endotelial nos dois grupos não diferiu estatisticamente sendo de  $28,3 \pm 1,9\%$  e  $34,2 \pm 3,1$ , respectivamente (Tabela 14 e Figura 26).



**Figura 23.** Efeito da incubação por 1 hora da rutina na concentração de 1  $\mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos com endotélio ou em anéis que tiveram o endotélio removido mecanicamente. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais/ grupo. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey-Kramer vs. diabético+veículo. # $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey-Kramer vs. euglicêmico+veículo



**Figura 24.** Efeito da incubação por 1 hora da rutina na concentração de 1  $\mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos pré-contráidos com solução despolarizante ( $\text{K}^+$  60mM). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 unidades experimentais/ grupo. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey-Kramer vs. diabético+veículo. # $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey-Kramer vs. euglicêmico+veículo

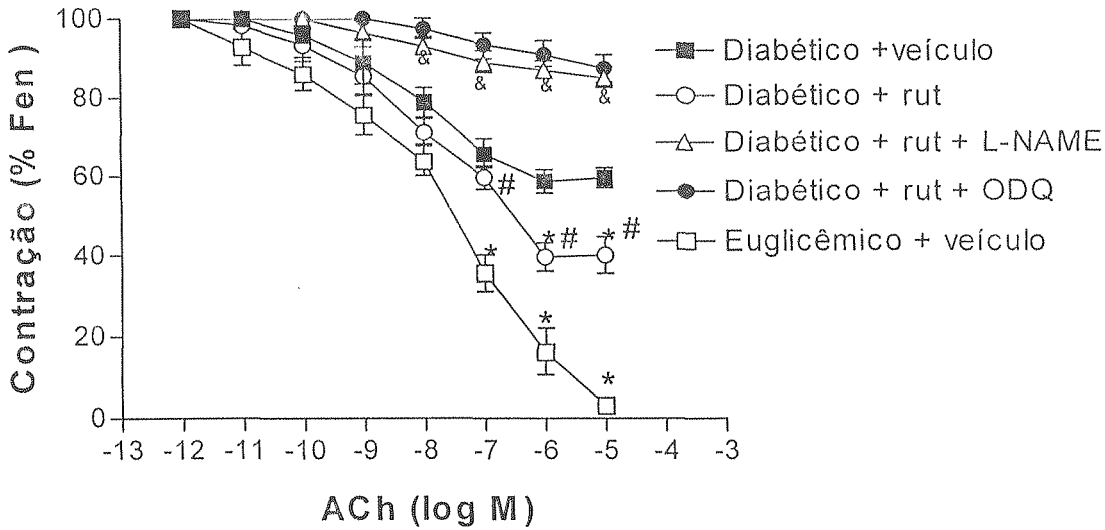


Figura 25. Efeito dos bloqueadores da NOS (L-NAME) e da guanilato ciclase sóluvel (ODQ) no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta pré-tratado ou não com rutina (1  $\mu$ M). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de ratos euglicêmicos. & $P < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos diabéticos e pré-tratados com rutina.

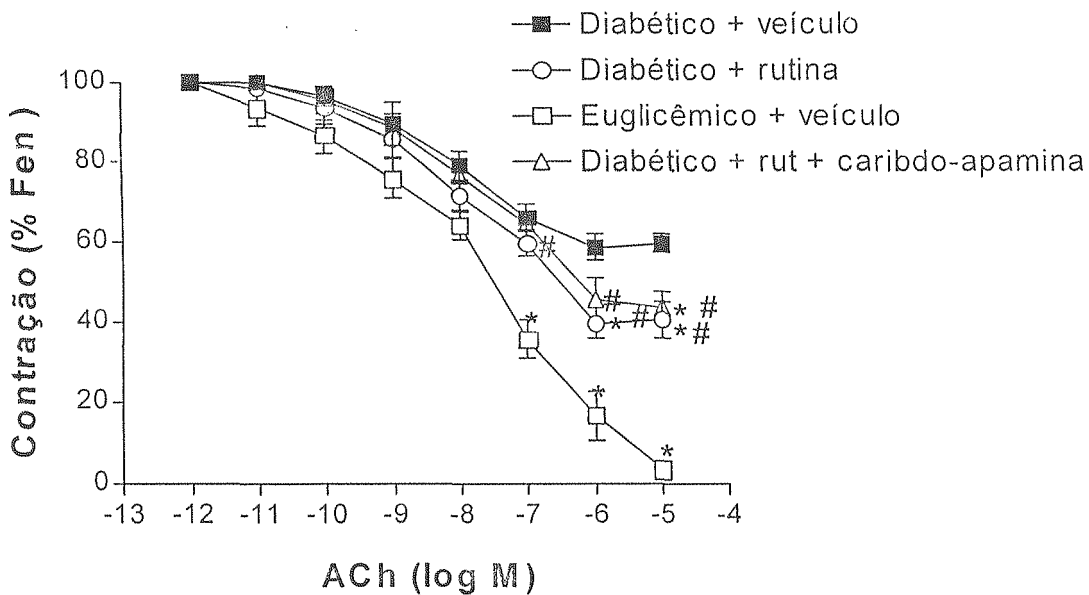


Figura 26. Efeito da mistura caribdotoxina-apamina (bloqueadores dos canais de potássio  $Ca^{2+}$ -sensível) no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta pré-tratado ou não com rutina (1  $\mu$ M). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de ratos euglicêmicos.

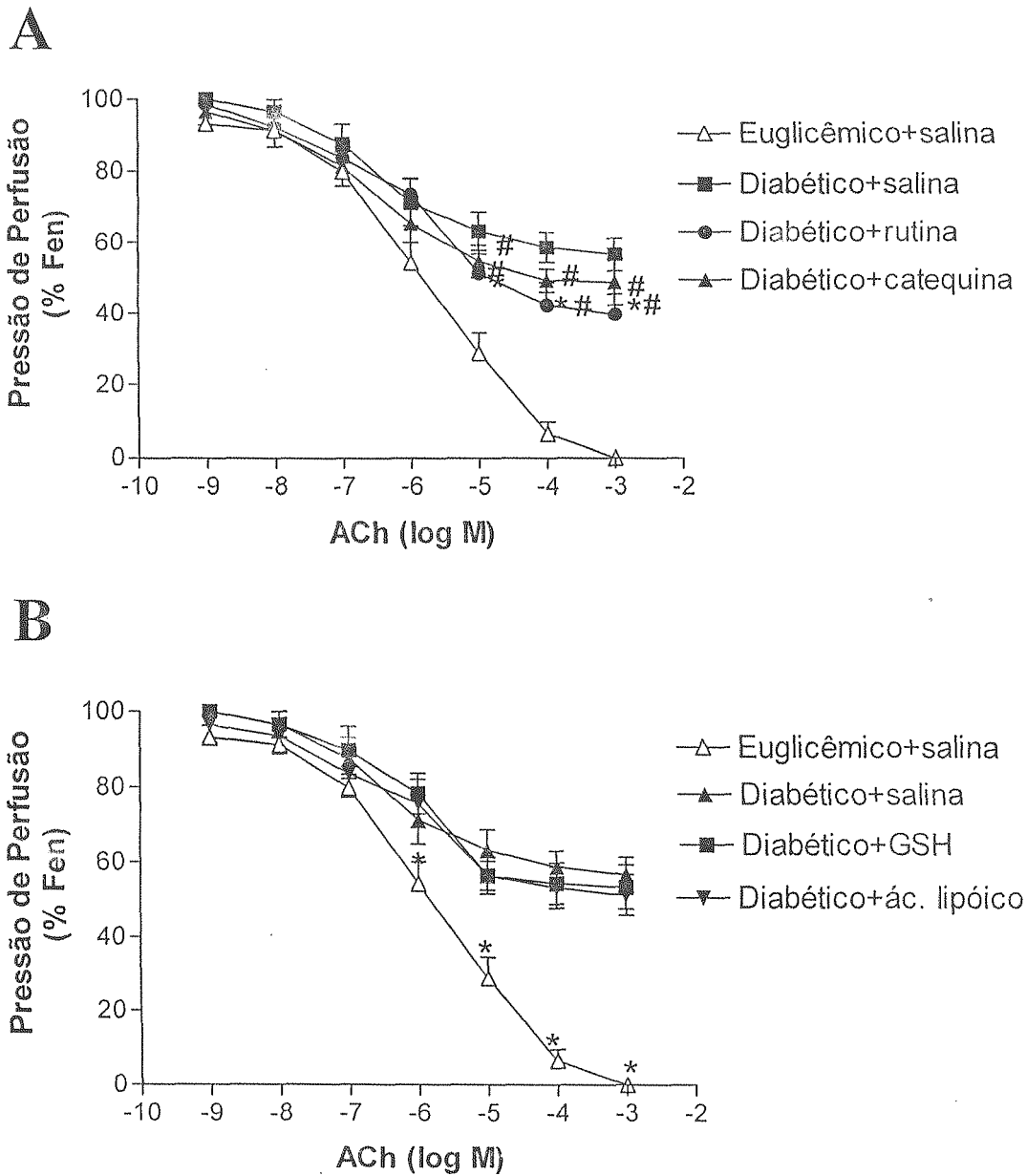


Figura 27. Efeito da infusão por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou do grupo das flavonas (catequina) na concentração de  $1 \mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico (A). Em B é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de  $1 \mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo. Os controles diabéticos e euglicêmicos são os mesmos em A e B e os gráficos estão separados por questão de clareza.

**abela 14.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente acetilcolina; ACh) em anéis de aorta obtidos de ratos diabéticos por aloxana incubados *in vitro* com 1 $\mu$ M de rutina na ausência e presença de diversos bloqueadores farmacológicos ou manipulações fisiológicas.

Grupo	R <sub>máx</sub> (% Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + veículo			
ACh	40,4 $\pm$ 2,3*	8,1 [8,4-7,8]	6
Euglicêmico + veículo			
ACh	96,8 $\pm$ 1,2	7,2 [8,0-6,4]	6
Diabético + rutina			
ACh	59,7 $\pm$ 4,5#	7,7 [8,4-7,0]	6
Diabético + rutina (- endot.)			
ACh	11,1 $\pm$ 4,3&	8,4 [8,8-8,0]	4
Diabético + rutina + L-NAME			
ACh	14,7 $\pm$ 2,9&	7,9 [8,4-7,4]	4
Diabético + rutina + ODQ			
ACh	12,4 $\pm$ 3,5&	6,7 [7,7-5,7]	4
Diabético + rutina + caribdo-apamin			
ACh	56,4 $\pm$ 3,6#	7,4[8,1-6,8]	4

<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo. &p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+rutina.

No leito arteriolar mesentérico, a disfunção endotelial calculada para os tecidos obtidos de ratos diabéticos foi de 56,7 $\pm$ 5,4%, enquanto nos tecidos que foram infundidos com acetilcolina foi de 48,9 $\pm$ 4,7% (inibição de 13,7 $\pm$ 2,4%; p>0,05) e 39,8 $\pm$ 4,1% nos tratados com rutina (inibição de 29,8 $\pm$ 3,1%; p<0,05) (ver Tabela 13 e Figura 27 e 28).

Novamente, para melhor entender a ação da rutina na melhoria da resposta do leito arteriolar mesentérico à acetilcolina, bloqueadores farmacológicos, remoção do endotélio e manipulação das concentrações extracelulares de potássio foram utilizados.

De maneira similar ao observado em anéis de aorta, a remoção do endotélio do leito arteriolar mesentérico impediu a melhora da resposta vascular induzida pela rutina. A resposta máxima relaxante para acetilcolina foi de 60,2 $\pm$ 3,2% no leito arteriolar obtido de ratos diabéticos e pré-tratados com rutina, de 26,8 $\pm$ 4,3% (p<0,05 vs. diabético+rutina) no leito arteriolar mesentérico desendotelizado e pré-tratado com rutina. (ver Tabela 15 e figura 29).

Nos tecidos em que o incremento pressórico foi induzido por solução despolarizante (+ 60 mM) as respostas obtidas na presença da rutina foram semelhantes às obtidas em



tecidos pré-contraídos com fenilefrina. A disfunção endotelial calculada nos tecidos de ratos diabético pré-contraídos com fenilefrina e pré-tratados com rutina foi de  $39,8 \pm 4,1\%$  comparado com  $32,4 \pm 3,5\%$  ( $p > 0,05$ ) no leito pré-contraído com  $K^+$  60 mM e também pré-tratado com rutina. A inibição da disfunção endotelial obtida nos dois grupos foi de  $29,8 \pm 3,1\%$  comparada com  $34,3 \pm 2,7\%$  ( $p > 0,05$ ), respectivamente. (Tabela 15 e figura 30).

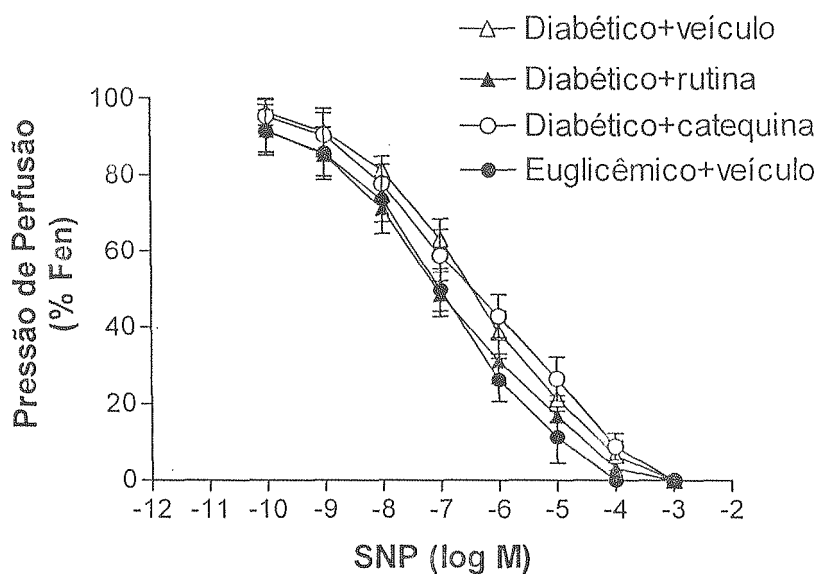
Em leitos arteriolares mesentéricos pré-tratados com rutina e expostos a L-NAME ou ODQ a melhora da função endotelial observada nos tecidos tratados com rutina isoladamente foi abolida. A resposta máxima relaxante para acetilcolina em leitos arteriolares obtidos de ratos diabéticos e pré-tratados com rutina foi de  $60,2 \pm 3,2\%$  comparado com  $18,8 \pm 4,5\%$  ( $p < 0,05$ ) na presença de L-NAME e  $24,7 \pm 6,2\%$  ( $p < 0,05$ ) na presença de ODQ. (Tabela 14 e figura 31).

Por outro lado, em outros conjuntos experimentais, a infusão de GSH ou ácido lipóico não afetou a resposta endotélio-dependente nos tecidos obtidos de ratos diabéticos de maneira significativa. A resposta máxima para acetilcolina nos diabéticos na tratados foi de  $43,3 \pm 4,6\%$  comparada com  $48,7 \pm 5,4\%$  ( $p > 0,05$  vs. Db) e  $46,6 \pm 4,8\%$  ( $p > 0,05$  vs. Db) (Figura 27b). Novamente, a resposta ao nitrovasodilatador não diferiu entre os grupos (Tabela 20 e Figura 28 a e b).

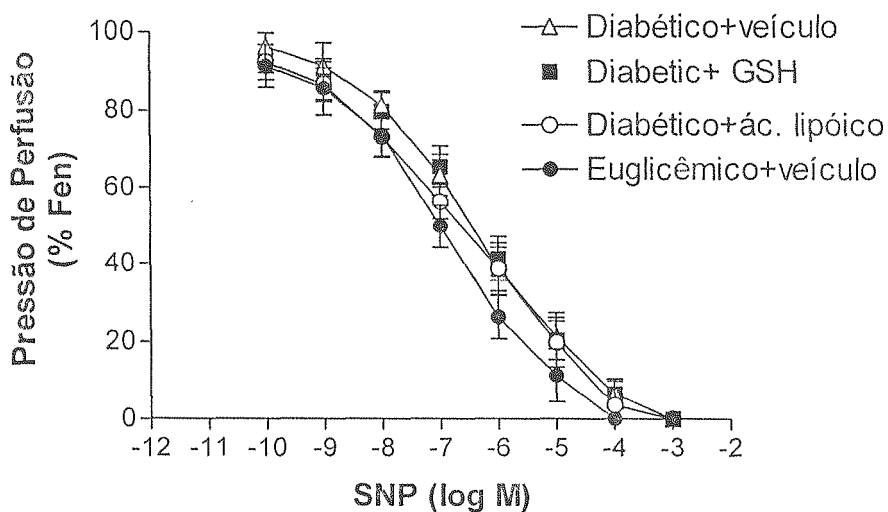
**Tabela 15.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina; ACh) no leito arteriolar mesentérico obtido de ratos diabéticos por aloxana incubados *in vitro* com 1 $\mu$ M de rutina na ausência e presença de diversos bloqueadores farmacológicos ou manipulações fisiológicas.

Grupo	R <sub>máx</sub>	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + veículo			
Ach	43,3 $\pm$ 4,6	6,5 [6,7-6,2]	6
Euglicêmico + veículo			
Ach	100 $\pm$ 0,0	5,6 [5,9-5,4]	6
Diabéticos + veículo (- endot.)			
Ach	19,7 $\pm$ 5,2	3,3 [-19,3-(+)12,7]	4
Euglicêmico + veículo (- endot.)			
Ach	16,4 $\pm$ 4,3	8,3 [11,6-5,0]	4
Diabético + rutina			
Ach	60,2 $\pm$ 3,2	5,8 [6,4-5,2]	4
Diabético + rutina (- endot.)			
Ach	26,8 $\pm$ 4,3	7,3 [8,0-6,5]	4
Diabético + rutina + L-NAME			
Ach	18,8 $\pm$ 4,5	8,9 [10,2-7,6]	4
Diabético + rutina + ODQ			
Ach	24,7 $\pm$ 6,2	8,1 [5,9-5,4]	4

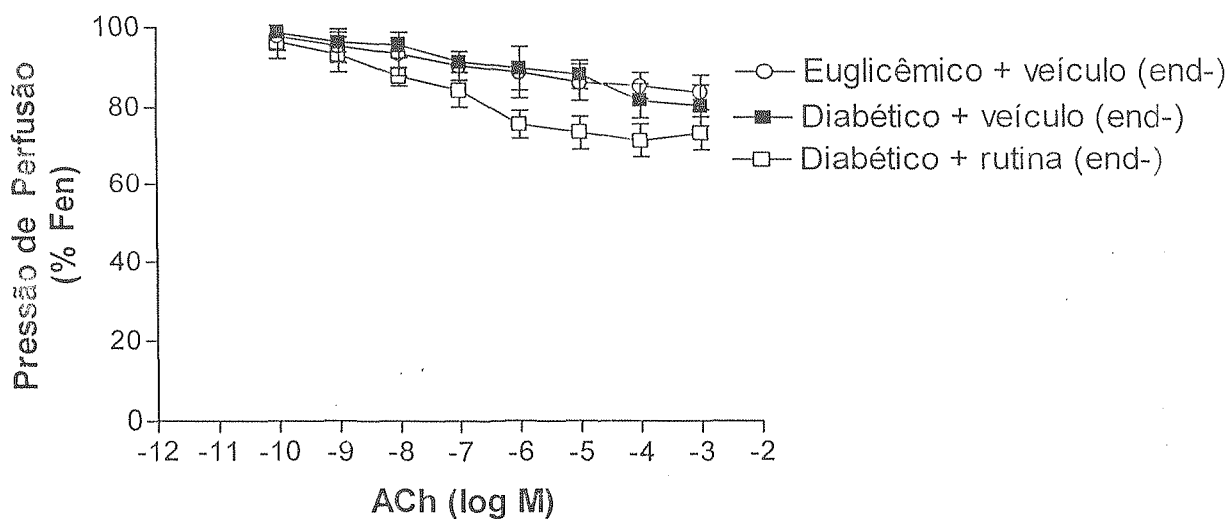
A



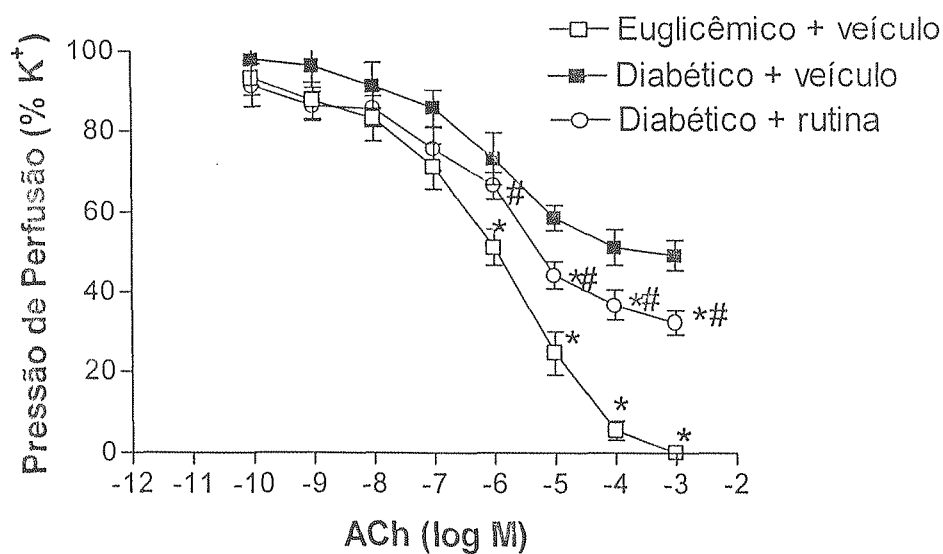
B



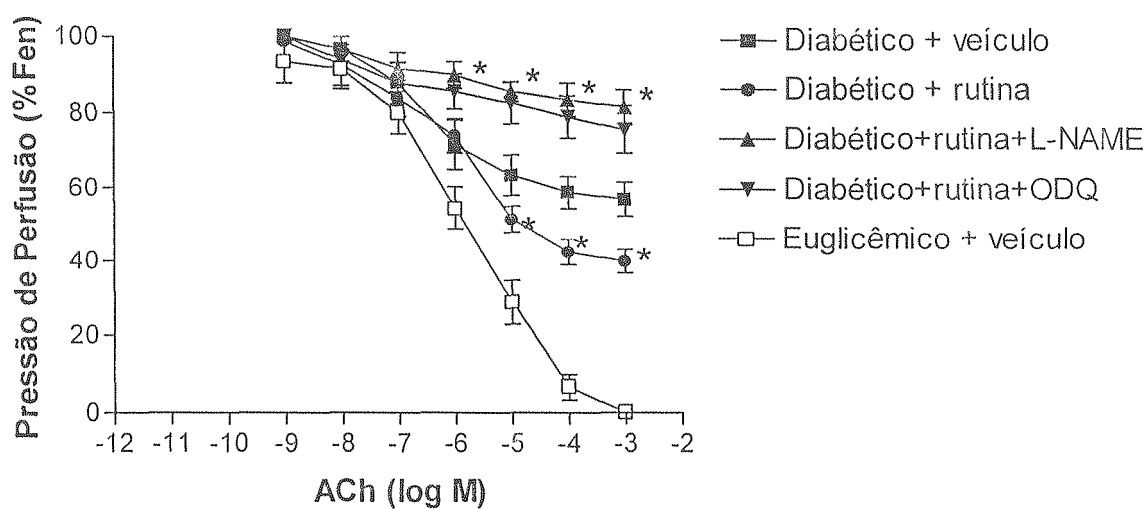
**Figura 28.** Efeito da infusão por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou do grupo das flavonas (catequina) na concentração de 1  $\mu$ M no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio no leito arteriolar mesentérico (A). Em B é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de 1  $\mu$ M. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo. Os controles diabéticos e euglicêmicos são os mesmos em A e B e os gráficos estão separados por questão de clareza.



**figura 29.** Efeito da incubação por 1 hora da rutina na concentração de  $1 \mu\text{M}$  no relaxamentoascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico, com endotélio removido quimicamente, de ratos diabéticos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais/ grupo.



**figura 30.** Efeito da incubação por 1 hora da rutina na concentração de  $1 \mu\text{M}$  no relaxamentoascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos pré-contráidos com solução despolarizante ( $\text{K}^+$  60mM). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 unidades experimentais/ grupo. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey-Kramer vs. diabético+veículo. # $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey-Kramer vs. euglicêmico+veículo



**Figura 31.** Efeito dos bloqueadores da NOS (L-NAME) e da guanilato ciclase sóvel (ODQ) no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar mesentérico pré-tratado ou não com rutina (1  $\mu$ M). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos euglicêmicos. &P < 0,05 vs. resposta obtida em tecidos de coelhos diabéticos e pré-tratados com rutina.

#### 4.2.2. Efeito dos componentes do mediador putativo da ação da insulina na disfunção endotelial em anéis de aorta torácica e leito vascular mesentérico de ratos diabéticos por aloxana

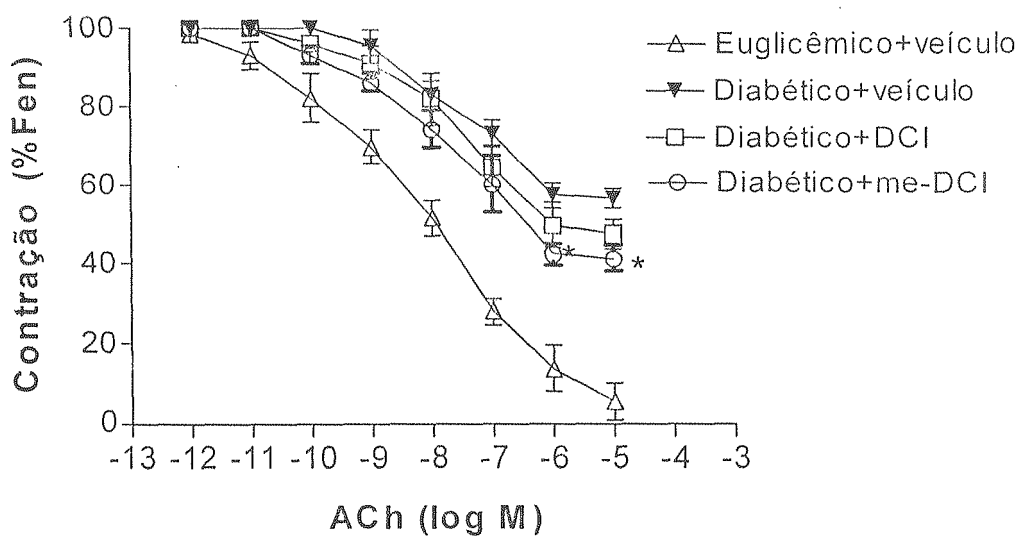
O efeito dos principais componentes do mediador putativo da ação da insulina na reversão da disfunção endotelial diabética também foi avaliado.

A incubação de anéis de aorta torácica com D-qui-ro-inositol (DCI) inibiu a disfunção endotelial em  $17,9\pm 2,4\%$ , mas este valor não foi estatisticamente significativo. A disfunção endotelial apresentada nos anéis de aorta desses ratos diabéticos foi de  $53,8\pm 4,6\%$  comparado com  $44,2\pm 3,2\%$  nos tecidos pré-tratados com DCI. O pré-tratamento com metil-D-qui-ro-inositol reverteu parcialmente a disfunção endotelial observada nos anéis não tratados. A disfunção nesse grupo foi de  $37,7\pm 2,4\%$  correspondendo a uma inibição, em relação ao controle não tratado, de  $29,9\pm 2,4\%$  ( $p>0,05$ ). (ver Tabela 16 e figura 32a).

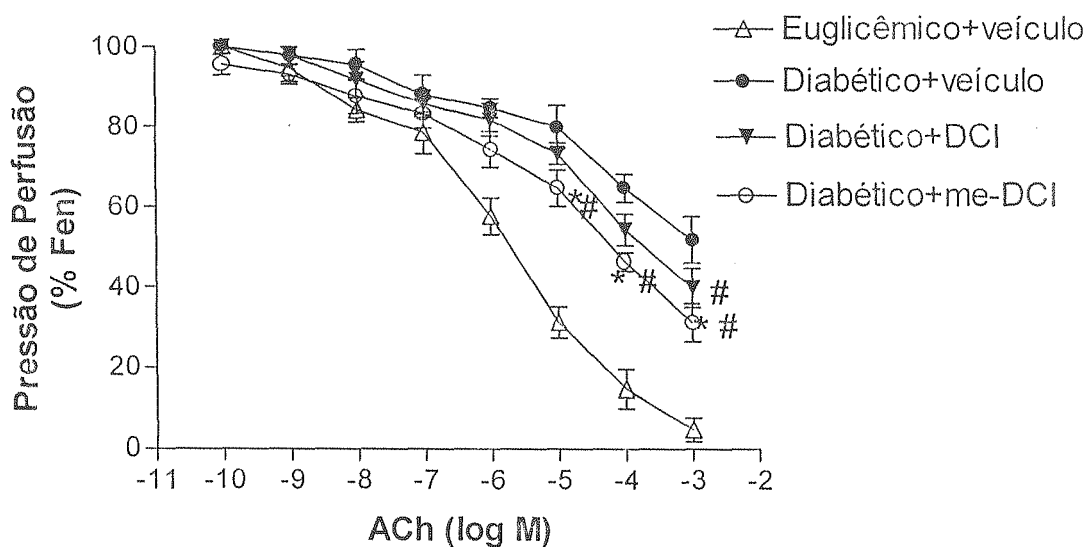
De maneira semelhante ao observado nos anéis de aorta apenas o metil-D-qui-ro-inositol foi capaz de reverter significativamente a disfunção endotelial diabética no leito arteriolar mesentérico. A disfunção endotelial no leito arteriolar mesentérico após infusão com DCI foi de  $39,7\pm 3,2\%$  comparada com  $49,2\pm 4,3\%$  ( $p>0,05$ ) obtida em tecidos pré-tratados com salina. Estes valores correspondem a uma inibição da disfunção de  $25,4\pm 2,8\%$ , que apesar de representarem uma tendência não foram estatisticamente significativos. Nos tecidos pré-tratados com me-DCI, por sua vez, a disfunção endotelial foi de  $27,6\pm 2,2\%$  ( $p>0,05$  vs. diabético não tratado). A inibição da disfunção endotelial calculada foi de  $43,8\pm 3,7\%$  com resposta máxima relaxante à acetilcolina de  $68,8\pm 4,7\%$  comparada com  $48,3\pm 5,7\%$  ( $p<0,05$ ;  $n=6$ ) obtida nos tecidos não tratados (ver Tabela 17 e Figura 32b).

A resposta ao agonista endotélio-independente, nitroprussiato de sódio não diferiu estatisticamente entre os grupos (Tabela 16 e 17 e figura 33a e b).

A

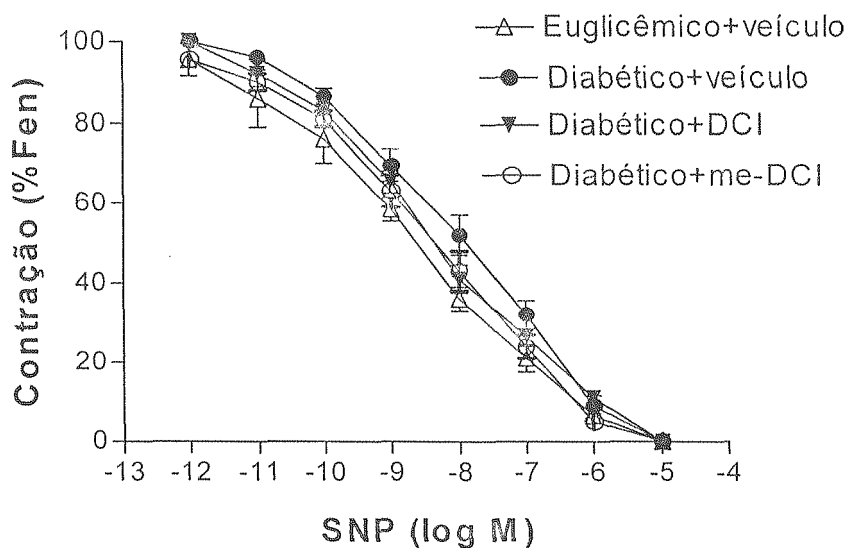


B

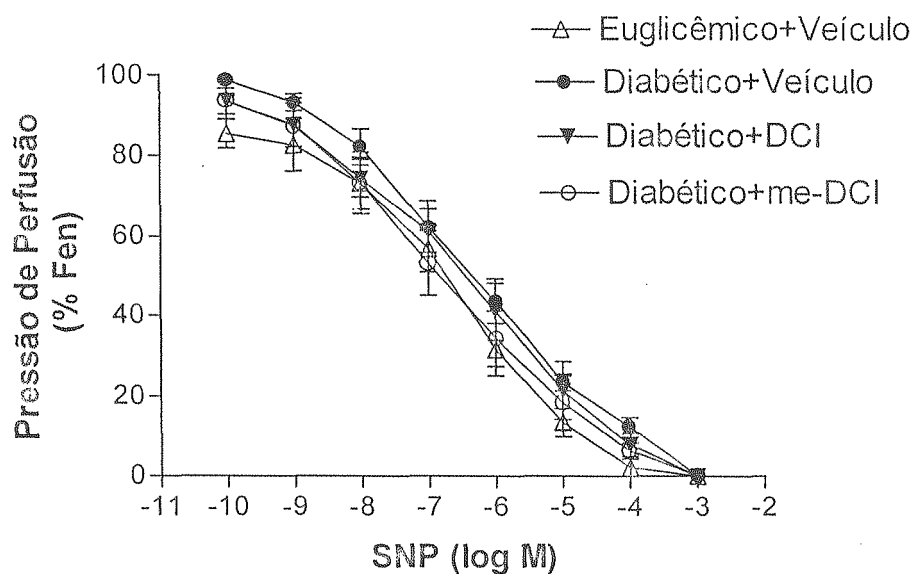


**Figura 32.** Efeito da incubação por 1 hora de 1  $\mu$ M dos inositóis D-qui-ro-inositol (DCI) ou metil-D-qui-ro-inositol (me-DCI) no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos diabéticos pela aloxana. (A). Em B é mostrado o efeito da infusão desses compostos na resposta endotélio-dependente no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo.

A



B



**Figura 33.** Efeito da incubação por 1 hora de 1  $\mu$ M dos inositóis D-qui-ro-inositol (DCI) ou metil-D-qui-ro-inositol (me-DCI) no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica de ratos diabéticos pela aloxana. (A). Em B é mostrado o efeito da infusão desses compostos na resposta endotélio-independente no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo.



**Tabela 16.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos diabéticos por aloxana incubados *in vitro* com 1 $\mu$ M de D-quirositol (DCI) ou metil-D-quirositol (me-DCI).

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + veículo			
ACh	43,6 $\pm$ 2,5*	7,4 [7,9-6,9]	6
SNP	100	7,6 [8,1-7,2]	6
Euglicêmico + veículo			
ACh	94,4 $\pm$ 4,6	8,0 [8,3-7,6]	6
SNP	100	8,0 [8,6-7,8]	6
Diabético + DCI			
ACh	52,7 $\pm$ 3,6#	7,4 [7,8-7,1]	6
SNP	100	8,2 [8,6-7,8]	6
Diabético + me-DCI			
ACh	58,8 $\pm$ 3,1#	7,6 [8,0-6,9]	6
SNP	100	8,1 [8,4-7,8]	6

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

**Tabela 17.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) no leito vascular mesentérico obtidas de ratos diabéticos por aloxana infundidos *in vitro* com 1 $\mu$ M de D-quirositol (DCI) ou metil-D-quirositol (me-DCI) na taxa de 0,1 mL/min).

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + veículo			
ACh	48,3 $\pm$ 5,7*	4,6 [6,8-2,4]	6
SNP	100	6,3 [6,8-5,8]	6
Euglicêmico + veículo			
ACh	95 $\pm$ 2,9	6,6 [8,1-5,1]	6
SNP	100	6,4 [6,5-6,3]	6
Diabético + DCI			
ACh	60,2 $\pm$ 4,9#	5,9 [7,6-3,2]	6
SNP	100	6,2 [6,5-5,9]	6
Diabético + me-DCI			
ACh	68,8 $\pm$ 4,7#	5,6 [7,1-4,1]	6
SNP	100	6,7 [6,9-6,5]	6

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

### 4.2.3. Efeito dos antioxidantes GSH, ácido lipóico, rutina e catequina na disfunção endotelial em anéis de aorta torácica e leito vascular mesentérico de ratos senescentes.

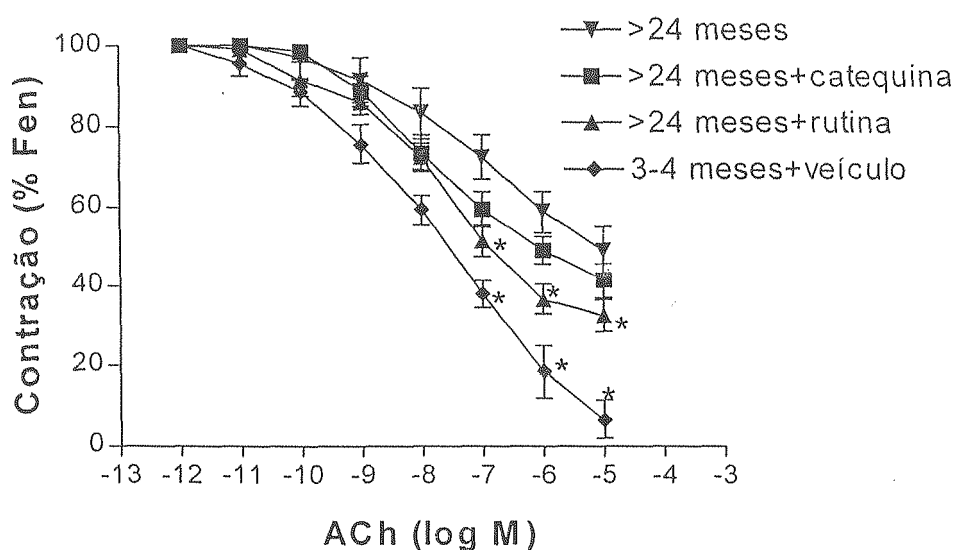
De maneira similar ao observados nos ratos diabéticos, a resposta endotélio-dependente nos anéis de aorta dos ratos senescentes apresentou-se diminuída quando comparados com ratos jovens de mesma idade e sexo. A disfunção endotelial nos tecidos de ratos senescentes foi de  $37,2 \pm 4,1\%$  comparada com  $45,1 \pm 3,6\%$  nos diabéticos ( $p > 0,05$  diabéticos vs. senescentes) e  $27,6 \pm 1,9\%$  nos jovens ( $p < 0,05$  jovens vs. senescentes). A resposta máxima nos ratos jovens foi de  $93,5 \pm 4,8\%$  e de  $58,7 \pm 4,3\%$  nos tecidos de ratos senescentes ( $p < 0,05$  vs. jovens). O pré-tratamento dos tecidos com catequina não alterou a resposta máxima a acetilcolina ( $51,3 \pm 6,2\%$ -senescentes+catequina vs.  $58,7 \pm 4,3\%$ -senescentes). Por outro lado, o pré-tratamento com rutina reverteu levemente a disfunção endotelial na aorta de ratos senescentes ( $67,7 \pm 4,1\%$ -senescentes+rutina vs.  $58,7 \pm 4,3\%$ -senescentes) com inibição percentual da disfunção endotelial de  $25,9 \pm 2,3\%$  (Tabela 18 e Figura 34a). O pré-tratamento dos tecidos de ratos senescentes com GSH ou ácido lipóico não reverteu a disfunção endotelial de maneira significativa (Tabela 18 e Figura 34b). A resposta ao nitroprussiato de sódio não diferiu entre os grupos (Tabela 18 e Figura 35 a e b).

A disfunção endotelial no leito arteriolar mesentérico do ratos senescentes não tratados foi de  $48,2 \pm 5,1\%$ . A resposta máxima a acetilcolina foi de  $51,1 \pm 5,9\%$  nos tecidos obtidos de ratos senescentes comparada com  $98,7 \pm 1,5\%$  obtidas nos tecidos de ratos jovens ( $p < 0,05$  vs. senescentes). A infusão de catequina não alterou a resposta endotélio-dependente nesse grupo de animais (Tabela 19 e Figura 36a). Por outro lado, a infusão de rutina inibiu a disfunção endotelial em  $45 \pm 3,9\%$  ( $p < 0,05$ ). A resposta máxima à acetilcolina neste grupo foi de  $72,6 \pm 4,3\%$  comparado com  $51,1 \pm 5,9\%$  obtidos nos tecidos de ratos senescentes não tratados (Tabela 19 e Figura 36 a).

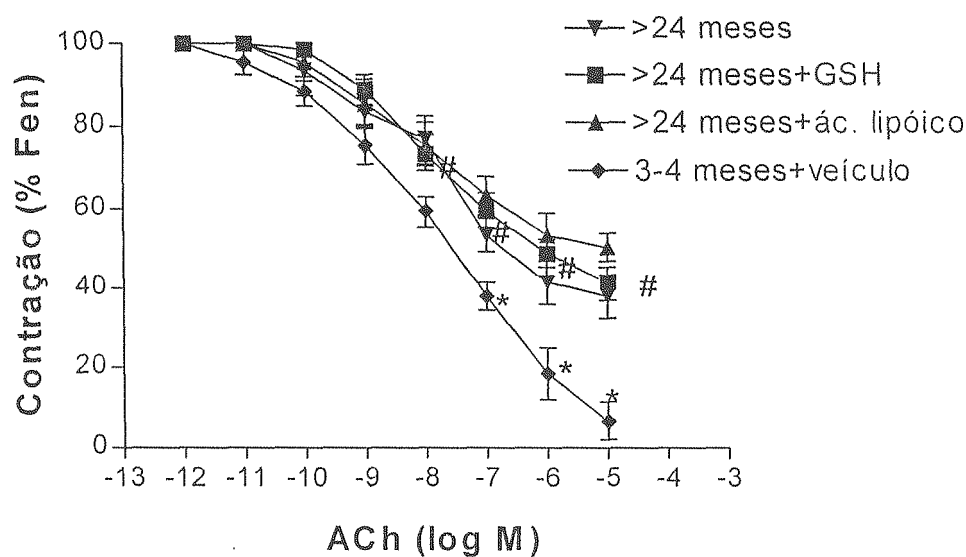
Novamente nem a infusão de GSH nem a infusão de ácido lipóico alteraram a resposta endotélio-dependente em tecidos obtidos de ratos senescentes. A resposta máxima pra acetilcolina nos ratos senescentes foi de  $51,1 \pm 5,9\%$  comparada com  $44,6 \pm 4,7$  ( $p > 0,05$  vs. senescentes não tratados) nos tecidos infundidos com GSH e  $51,4 \pm 5,2\%$  nos tratados com ácido lipóico ( $p > 0,05$  senescentes não tratados) (Tabela 19 e Figura 36b).

As curvas-concentração resposta ao nitrovasodilatador, nitroprussiato de sódio não diferiram entre os grupos estudados (Tabela 19 e Figura 37 a e b).

A

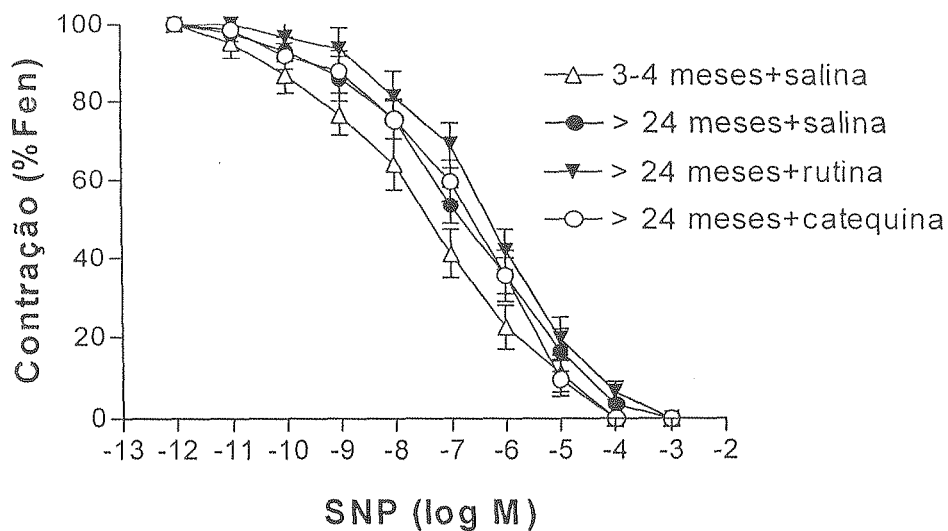


B

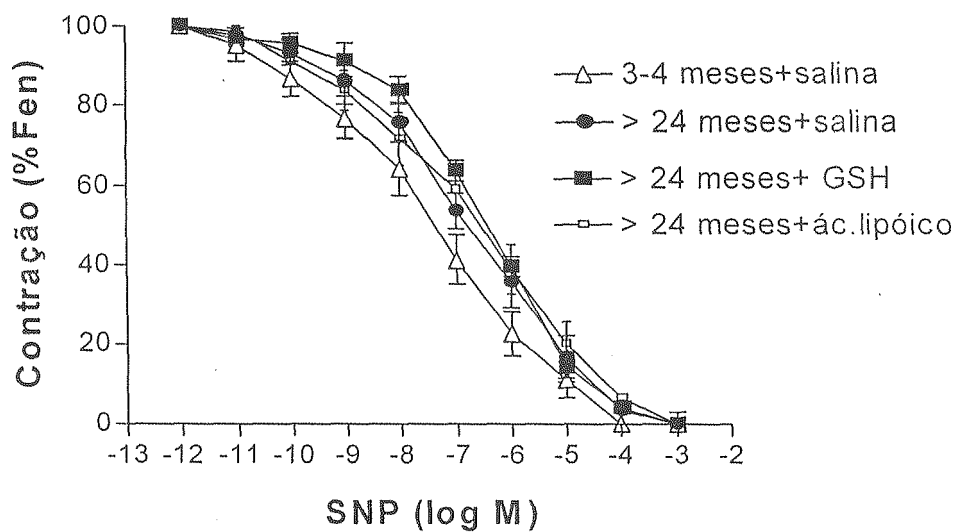


**Figura 34.** Efeito da incubação por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou do grupo das flavanas (catequina) na concentração de 1  $\mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratos senescentes (A). Em B é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/grupo. \*p<0.05 vs. respostas obtidas em tecidos de ratos senescentes pré-tratados apenas com salina. #. p<0.05 vs. respostas obtidas em tecidos de ratos jovens. Os controles senescentes (<24 meses) e jovens são os mesmos em A e B e os gráficos estão separados por questão de clareza.

A

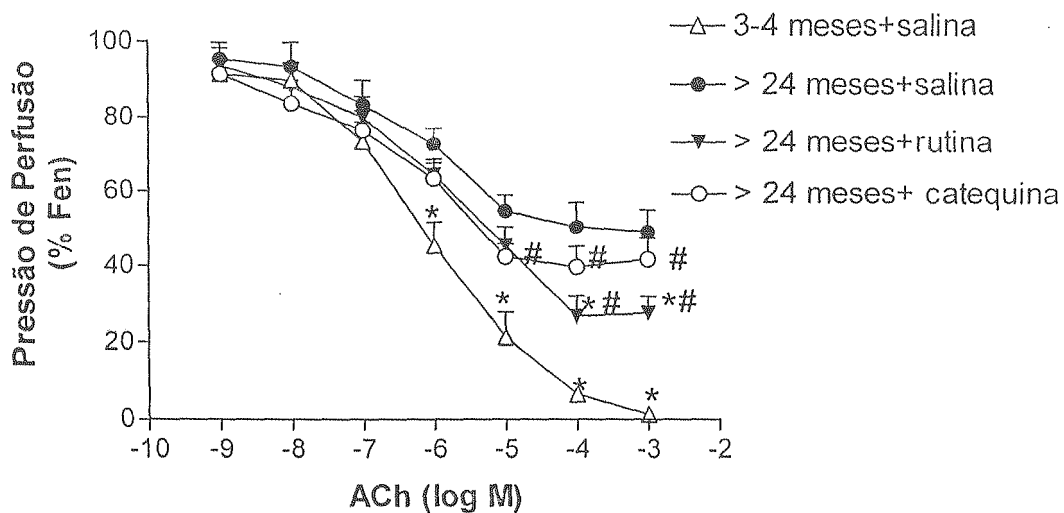


B



**Figura 35.** Efeito da incubação por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou do grupo das flavanas (catequina) na concentração de  $1 \mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-independente induzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos senescentes (A). Em B é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de  $1 \mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo. Os controles senescentes e jovens são os mesmos em A e B e os gráficos estão separados por questão de clareza.

A



B

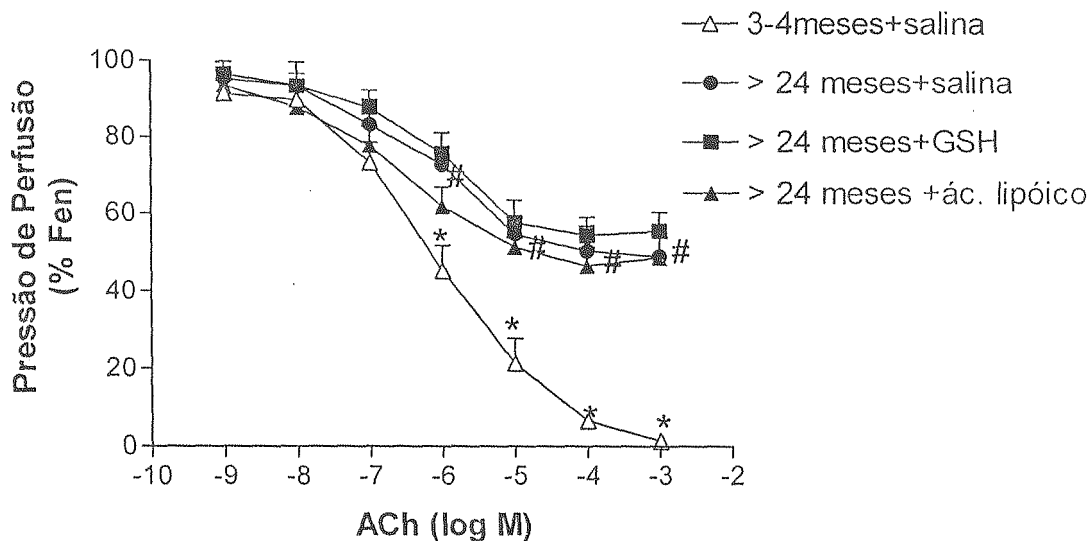
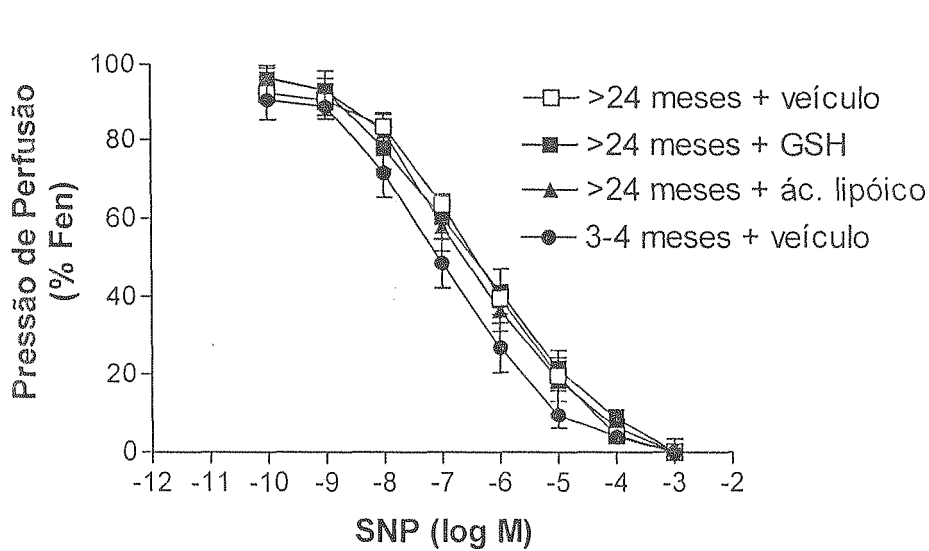
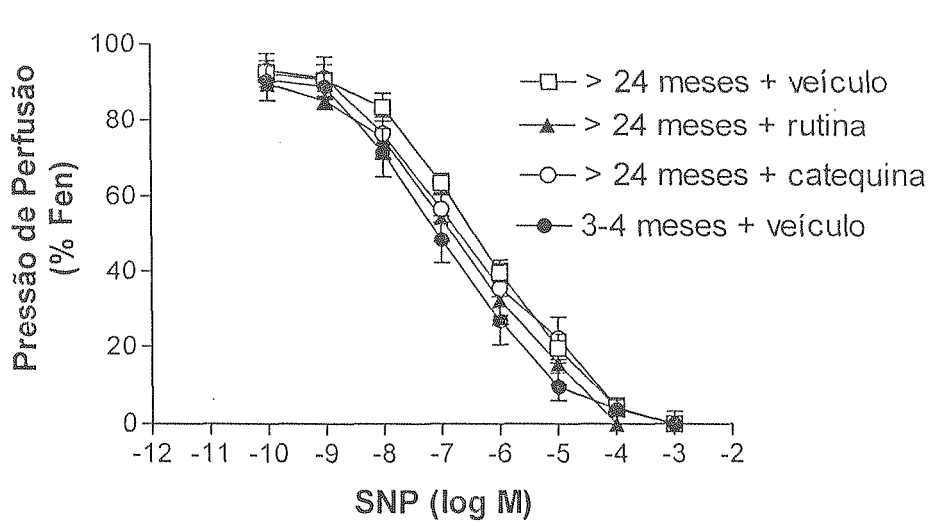


Figura 36. Efeito da infusão por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou do grupo das flavanas (catequina) na concentração de  $1 \mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar de ratos senescentes (A). Em B é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de  $1 \mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/ grupo. Os controles senescentes e jovens são os mesmos em A e B e os gráficos estão separados por questão de clareza.



**Figura 37.** Efeito da infusão por 1 hora dos flavonóides do grupo dos flavonóis (rutina) ou do grupo das flavanas (catequina) na concentração de  $1 \mu\text{M}$  no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por nitroprussiato de sódio no leito arteriolar de ratos senescentes (**A**). Em **B** é mostrado o efeito dos antioxidantes endógenos GSH e ácido lipóico na concentração de  $1 \mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais/grupo. Os controles senescentes e jovens são os mesmos em **A** e **B** e os gráficos estão separados por questão de clareza.

**Tabela 18.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de ratos senescentes e incubadas *in vitro* com 1µM de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico.

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Senescentes + salina			
ACh	58,7 ±4,4*	7,7 [8,1-7,3]	6
SNP	100	6,4 [6,9-5,9]	6
jovem + salina			
ACh	93,5 ± 4,8	7,4 [7,8-7,0]	6
SNP	100	7,3 [7,9-6,6]	6
Senescentes + rutina			
ACh	67,7±3,1#	7,9 [8,4-7,4]	6
SNP	100	6,2 [6,8-5,8]	6
Senescentes + catequina			
ACh	51,3±6,2	6,7 [7,4-6,0]	6
SNP	100	7,1 [7,8-6,4]	6
Senescentes + GSH			
ACh	49,6±3,8	7,9 [8,4-7,4]	6
SNP	100	6,5 [7,4-5,6]	6
Senescentes + ácido lipóico			
ACh	62,2±5,4#	8,1 [9,0-7,2]	6
SNP	100	6,2 [6,8-5,8]	6

\*p<0,05, teste t não pareado vs. jovem+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. senescente+veículo.

**Tabela 19.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente acetilcolina; Ach) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio; SNP) leito vascular mesentérico obtidas de ratos senescentes e infundidos *in vitro* com 1 $\mu$ M de rutina, catequina, GSH ou ácido lipóico na taxa de 0,1 mL/min).

Grupo	R <sub>máx</sub> (% Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Senescentes + salina			
Ach	51,1 $\pm$ 5,9*	6,1 [6,9-5,3]	6
SNP	100	6,2 [6,9-5,5]	6
jovem + salina			
Ach	98,7 $\pm$ 1,1	7,0 [8,1-5,9]	6
SNP	100	6,9 [7,4-6,4]	6
Senescentes + rutina			
Ach	72,6 $\pm$ 4,3#	5,8 [6,3-5,3]	6
SNP	100	6,5 [6,8-6,2]	6
Senescentes + catequina			
Ach	58,4 $\pm$ 5,7	6,5 [6,9-6,1]	6
SNP	100	5,9 [6,7-5,1]	6
Senescentes + GSH			
Ach	44,6 $\pm$ 4,7	6,3 [6,8-5,8]	6
SNP	100	6,8 [7,4-6,2]	6
Senescentes + ac. lipóico			
Ach	51,4 $\pm$ 5,2	6,8 [7,4-6,2]	6
SNP	100	6,4 [6,9-6,0]	6

\*p<0,05, teste t não pareado vs. jovem+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. senescente+veículo.



#### 4.2.4. Efeito dos antioxidantes GSH, ácido lipóico e rutina na disfunção endotelial no leito vascular renal e anéis de aorta torácica de coelhos diabéticos por aloxana.

O perfil glicêmico dos coelhos após quatro semanas da indução por injeção intraperitoneal de aloxana é mostrada na Tabela 20.

Os experimentos de perfusão de rim isolado revelaram uma resposta aos agonistas endotélio-dependentes, bradicinina e acetilcolina diminuídas. A disfunção endotelial no rim de coelhos diabéticos foi de  $71,5 \pm 6,7\%$  utilizando-se a bradicinina como agonista e  $69,6 \pm 5,8\%$  para a acetilcolina em comparação às respostas obtidas em coelhos euglicêmicos. A resposta máxima para bradicinina nos animais euglicêmicos foi de  $26 \pm 3,6\%$  e de  $7,4 \pm 1,2\%$  nos animais diabéticos ( $p < 0,05$ ). O tratamento dos tecidos por infusão contínua com duração de 1 hora com GSH foi capaz de inibir em 65% a disfunção endotelial para bradicinina. Nesse grupo a resposta máxima para bradicinina foi de  $19,5 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) com uma disfunção em relação aos animais euglicêmicos de  $25 \pm 4,3\%$ . A infusão de rins de coelhos diabéticos com ácido lipóico por uma hora foi capaz de reverter a disfunção endotelial em  $50 \pm 4,2\%$ . A resposta vasodilatadora máxima para bradicinina nesse grupo foi de  $16,7 \pm 3,5\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db). O grupo de rins infundidos com rutina apresentou uma resposta máxima de  $20,6 \pm 4,6\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) com uma reversão da função endotelial em  $71 \pm 5,9\%$  (Tabela 21 e Figura 38).

A resposta vasodilatadora máxima à acetilcolina em animais euglicêmicos foi de  $52,7 \pm 4,7\%$  comparada com  $16 \pm 2,0\%$  ( $p < 0,05$  vs. eugli) obtida no rim de coelhos diabéticos. A disfunção endotelial calculada nesse grupo de coelhos diabéticos pré-tratados com veículo foi de  $69,6 \pm 5,8\%$ . Por outro lado, a disfunção endotelial no grupo de rins infundidos com GSH foi de  $56,3 \pm 3,6\%$  comparada com  $69,6 \pm 5,8\%$  nos diabéticos, não havendo entre estes grupos diferença significativa. A resposta máxima vasodilatadora para acetilcolina no grupo pré-tratado com GSH foi de  $23 \pm 5,4\%$  comparada com  $16 \pm 2,0\%$  obtido nos tecidos de coelhos diabéticos controles. A inibição da disfunção endotelial foi de  $19,1 \pm 3,6\%$  não sendo, no entanto significativa estatisticamente. A disfunção endotelial diabética medida no leito arteriolar renal foi inibida em  $40,9 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,05$ ) após infusão com ácido lipóico nestes tecidos. A resposta máxima nesses tecidos foi de  $31 \pm 3,9\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) comparada com  $16,2 \pm 2,0\%$  obtida nos tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo. A infusão de rutina no leito arteriolar renal foi capaz de reverter a disfunção endotelial em  $70,8 \pm 6,3\%$

( $p < 0,05$  vs. Db). A resposta máxima de decréscimo na pressão de perfusão do leito vascular renal foi de  $42 \pm 3,4\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db). (Tabela 21 e Figura 39a).

Em todos os grupos a resposta ao nitrovasodilatador, nitroprussiato de sódio permaneceu inalterada (ver Tabela 21 e Figura 39b).

Tabela 20. Perfil glicêmico e peso corporal de coelhos diabéticos por aloxana após 4 semanas da indução.

Grupo	n	Agonista endotélio-dependente	Massa corporal (Kg)	Glicose sérica (mg/dL)
(I) Euglicêmicos	6	BK	2,1±0,2	85,7±6,3
(II) Diabéticos (controle)	6	BK	1,6±0,1	262,4±11,7*
(III) Diabéticos (GSH)	6	BK	1,9±0,1	254,6±13,3*
(IV) Diabéticos (Ác. lipóico)	6	BK	1,4±0,1	347,5±16,6*
(V) Diabéticos (rutina)	6	BK	1,6±0,2	316,4±17,4*
(VI) Euglicêmicos	8	ACh	1,7±0,2	76,4±5,7
(VII) Diabéticos (controle)	6	ACh	1,4±0,2	339,6±21,7*
(VIII) Diabéticos (GSH)	6	ACh	1,2±0,1	284,3±16,8*
(IX) Diabéticos (Ác. lipóico)	5	ACh	1,6±0,2	343, 1±18,5*
(X) Diabéticos (rutina)	7	ACh	1,3±0,1	243,6±15,7*
(XI) Diabéticos (rutina+L-NAME)	4	ACh	1,5±0,2	352,3±23,8*
(XII) Diabéticos (rutina+ ODQ e caribdotoxina-ε pamina)	4	ACh	1,4±0,1	412,5±24,7*

\*p<0,05, teste t de Student não pareado bicaudal, comparado com os animais euglicêmicos. Estes animais foram utilizados para experimentos de perfusão renal e anéis de aorta torácica.

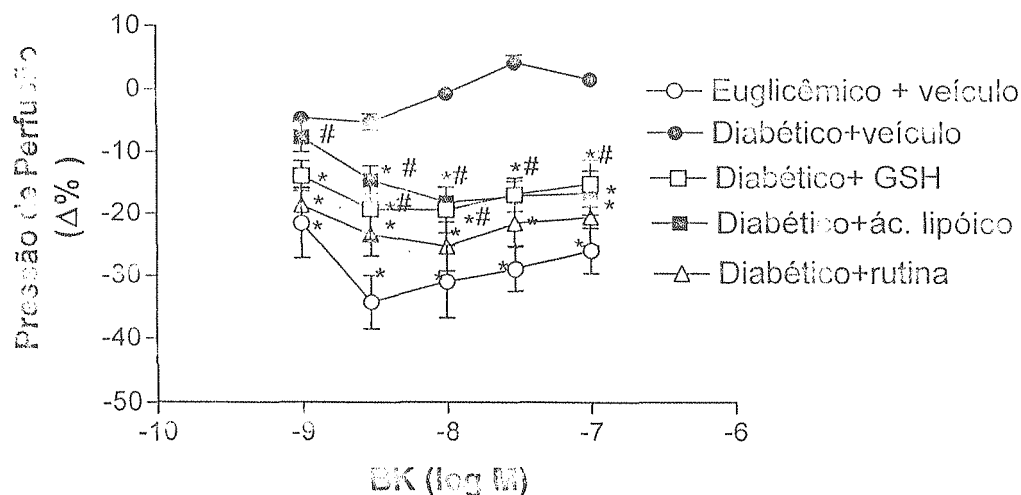
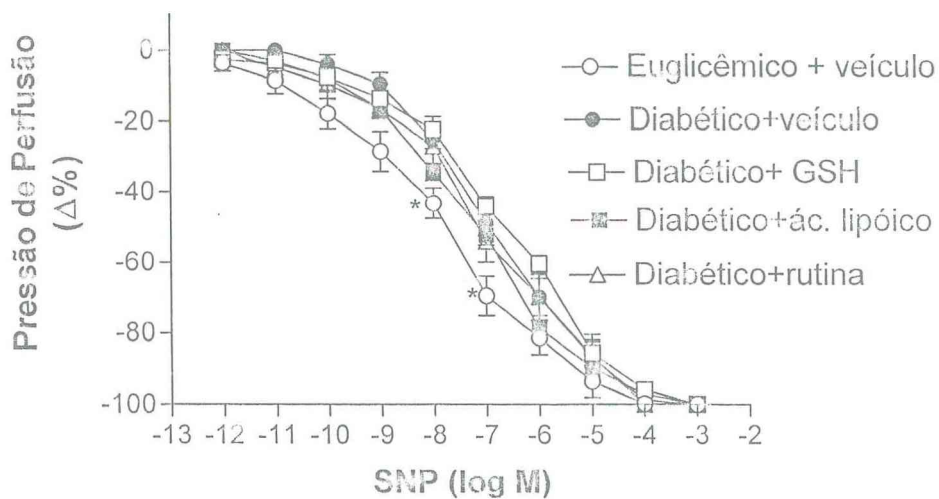
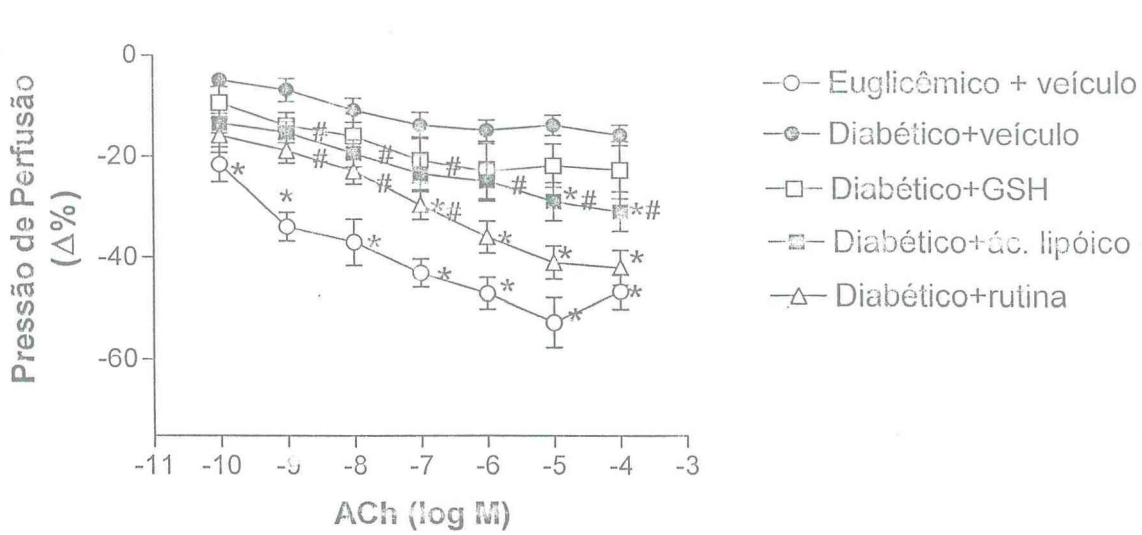


Figura 38. Efeito de antioxidantes (glutation reduzido=GSH, ácido lipóico e rutina, na concentração de  $1\mu\text{M}$ ) na vasodilatação endotélio-dependente induzida por bradicinina no leito vascular renal de coelhos quando infundidos durante 1 hora antes da realização das curvas. O tônus da preparação foi mantido por infusão contínua de fenilefrina ( $1-5\mu\text{M}$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs.resposta obtida em tecidos de coelhos euglicêmicos.



**Figura 39.** Vasodilatação endotélio-dependente induzida por acetilcolina (A) ou endotélio-independente induzida por nitroprussiato de sódio (B) no leito vascular renal de coelhos na ausência e presença de  $1 \mu\text{M}$  de glutathiona reduzida (GSH), ácido lipóico ou rutina infundidos durante 1 hora antes da realização das curvas. O tônus do leito foi aumentado com infusão de fenilefrina ( $1\text{-}5 \mu\text{M}$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de seis unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos euglicêmicos.

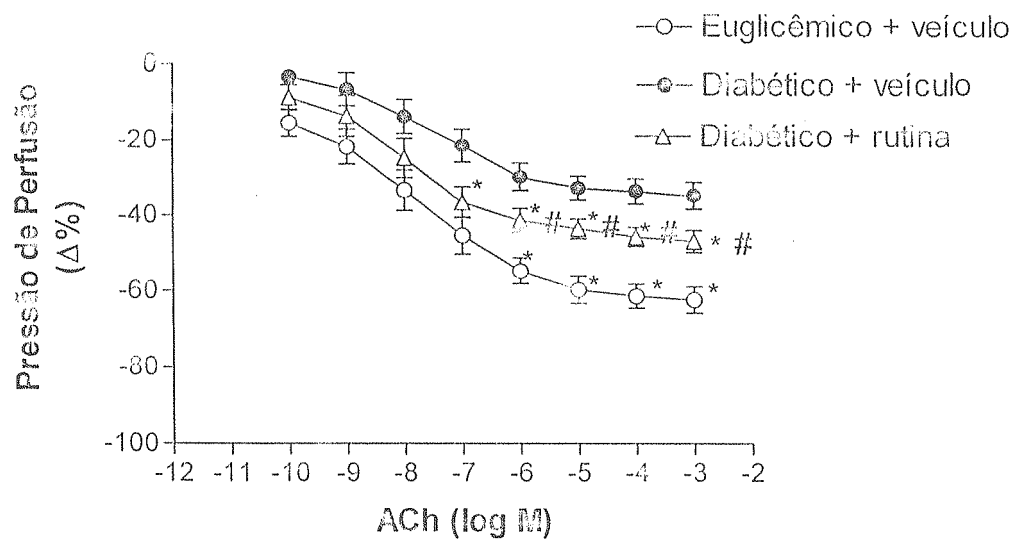
**Tabela 21.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependentes (acetilcolina;ACh e bradicinina-BK) ou ao agonista endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) na pressão de perfusão de rins obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença de antioxidantes (glutaciona reduzida=GSH, ácido lipóico e rutina, concentração de 1µM) comparado com a resposta obtida em animais euglicêmicos.

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Ren)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + veículo			
BK	7,4 ± 1,2*	8,0 [15,3-3,6]	6
ACh	16 ± 2,0*	7,3 [10,4-4,2]	6
SNP	100 ± 0	6,8 [7,4-6,3]	6
Euglicêmico + veículo			
BK	26 ± 3,6	9,0 [14,7-4,6]	8
ACh	52,7 ± 4,9	11,3 [16,4-6,2]	8
SNP	100 ± 0	7,7 [8,2-7,1]	8
Diabético +GSH			
BK	19,5 ± 3,7#	9,1 [13,3-4,9]	6
ACh	23 ± 5,4	7,6 [11,4-3,8]	6
SNP	100 ± 0	6,4 [6,7-6,1]	6
Diabético + ác. lipóico			
BK	16,7 ± 3,5#	8,4 [14,0-3,0]	5
ACh	31 ± 3,9#	9,8 [14,3-5,3]	5
SNP	100 ± 0	7,2 [7,4-7,0]	5
Diabético + rutina			
BK	20,6 ± 4,6#	9,0 [11,0-7,0]	7
ACh	42 ± 3,4#	7,5 [10,2-4,7]	7
SNP	100 ± 0	6,9 [7,2-6,5]	7

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

Em um grupo de rins perfundidos o agonista contrátil utilizado para incrementar a pressão de perfusão foi uma solução de Krebs-Henseleit com concentração de potássio de 60 mM (solução despolarizante). A resposta vasodilatadora máxima a acetilcolina em tecidos de animais euglicêmicos, nestas condições, foi de  $62,3 \pm 3,5\%$  comparada com  $34,6 \pm 3,6\%$  ( $p < 0,05$  vs. eugli) obtido em tecidos de coelhos diabéticos. A infusão de tecidos de coelhos diabéticos com rutina reverteu a disfunção endotelial nesse grupo em  $44 \pm 3,2\%$ . Nesse grupo a resposta máxima de queda na pressão de perfusão do rim isolado foi de  $46,8 \pm 2,9\%$  (Tabela 22 e Figura 40). Quando comparamos o percentual de inibição da disfunção endotelial nos grupos pré-contráidos com fenilefrina ( $70,8 \pm 6,3\%$ ) e nos grupos pré-contráidos com  $K^+$  60 mM ( $44 \pm 3,2\%$ ) constatamos que existe diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Em dois grupos de perfusão renal distintos, a infusão de rutina foi seguida por infusão, durante a realização das curvas concentração-resposta para acetilcolina, do bloqueador da enzima NOS, L-NAME (100  $\mu$ M) ou do bloqueador da enzima guanilil ciclase solúvel, ODQ (100  $\mu$ M). Nesses grupos a resposta máxima à acetilcolina foi de  $10,6 \pm 4,3\%$  (na presença de L-NAME e pós infusão de rutina) e  $11,6 \pm 5,6\%$  (na presença de ODQ e pós-infusão de rutina). Esses valores de resposta máxima foram significativamente menores do que aqueles obtidos na ausência dos bloqueadores ( $p < 0,05$  vs. Db+rutina) (Tabela 23 e Figura 41).



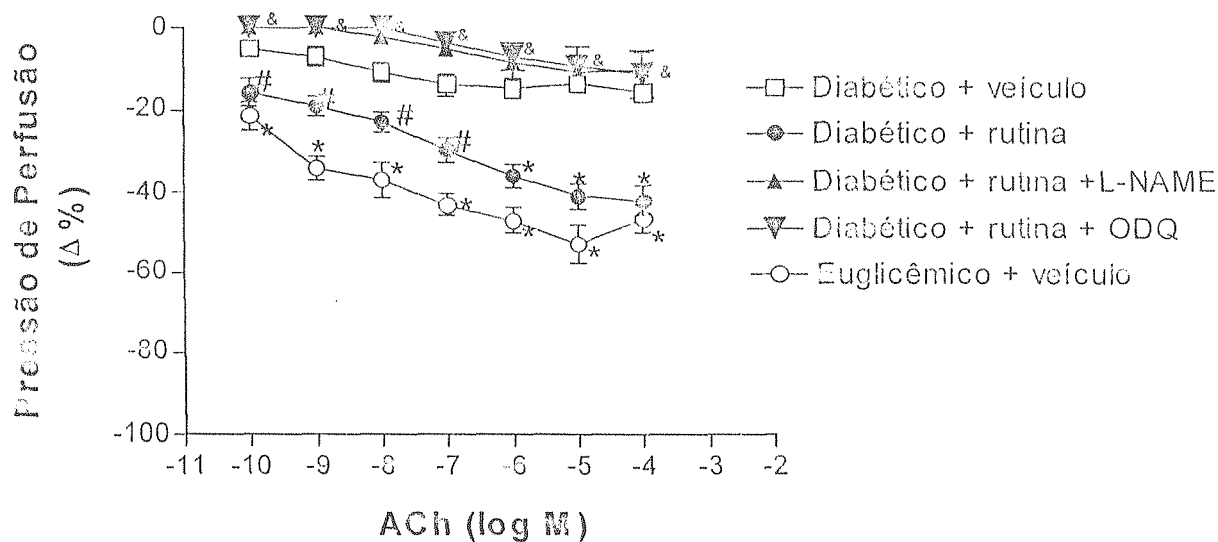
**Figura 40.** Efeito da rutina ( $1\mu\text{M}$ ), infundida durante 1 hora antes da realização das curvas, na vasodilatação endotélio-dependente induzida por acetilcolina no leito vascular renal de coelhos. O tônus do leito foi aumentado com solução despolarizante ( $\text{K}^+$  60 mM). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos euglicêmicos.

**Tabela 22.** Peso corporal e glicemia de coelhos após 4 semanas da indução de diabetes por aloxana ou injeção de veículo e parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente (acetilcolina; ACh) na pressão de perfusão de rins, mantida por perfusão contínua com solução despolarizante ( $\text{K}^+$  60 mM), obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença de rutina, na concentração de  $1\mu\text{M}$ , comparado com a resposta obtida em animais euglicêmicos.

Grupo	Peso	Glicemia (mg/dL)	$R_{\text{máx}}$ (% $\text{K}^+$ )	$\text{PD}_2$ [95%IC]	N
Diabéticos + veículo ACh	$1,6 \pm 0,2$	$327,5 \pm 14,6$	$34,6 \pm 3,6$	7,4 [7,7-7,2]	5
Euglicêmico + veículo ACh	$2,3 \pm 0,3$	$83,6 \pm 4,8$	$62,3 \pm 3,5$	7,7 [7,9-7,5]	4
Diabético + rutina ACh	$1,8 \pm 0,2$	$297 \pm 12,4$	$46,8 \pm 2,9$	7,9 [8,3-7,5]	4

\* $p < 0,05$ , teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. # $p < 0,05$ , teste t não pareado vs. diabético+veículo.





**Figura 41.** Efeito dos bloqueadores da NOS (L-NAME) e da guanilato ciclase solúvel (ODQ) no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina no leito arteriolar renal pré-tratado ou não com rutina (1  $\mu$ M). O tônus do leito foi aumentado com infusão de fenilefrina (1-5  $\mu$ M). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  s. resposta obtida em tecidos de coelhos euglicêmicos. \* $P < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos diabéticos e pré-tratados com rutina.

**Tabela 23.** Parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente (ACh) na pressão de perfusão de rins obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença da rutina (1  $\mu$ M), ou rutina (1  $\mu$ M) em conjunto com L-NAME (100  $\mu$ M) ou ODQ (100  $\mu$ M), comparados com a resposta obtida em animais euglicêmicos.

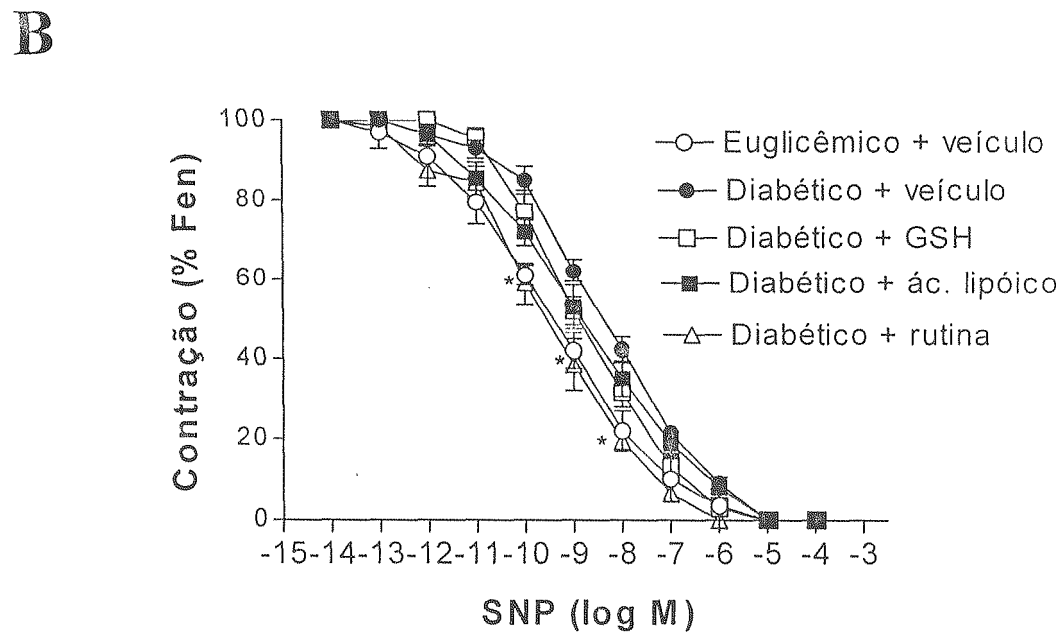
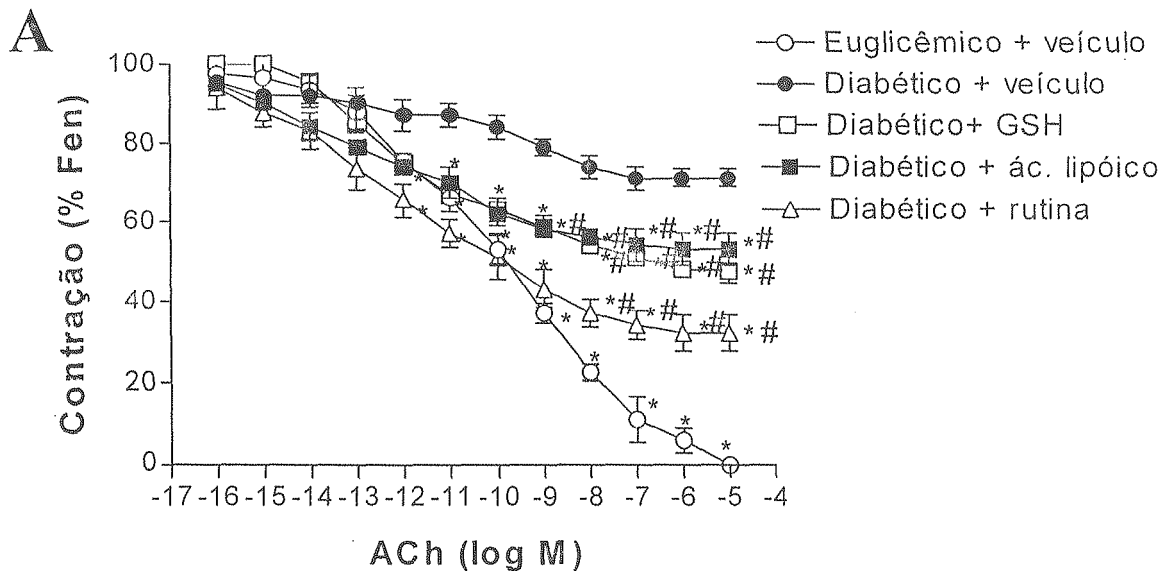
Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fcu)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	N
Diabéticos + veículo			
ACh	16 $\pm$ 2,0*	7,3 [10,4-4,2]	6
Euglicêmico + veículo			
ACh	52,7 $\pm$ 4,9	11,3 [16,4-6,2]	8
Diabético + rutina			
ACh	42 $\pm$ 3,4#	7,5 [10,2-4,7]	7
Diabético + rutina + L-NAME			
ACh	10,6 $\pm$ 4,3&	7,0 [7,5-6,4]	4
Diabético + rutina + ODQ			
ACh	11,4 $\pm$ 5,6&	6,4 [7,1-5,7]	4

\* $p < 0,05$ , teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. # $p < 0,05$ , teste t não pareado vs. diabético+veículo. & $p < 0,05$ , teste t não pareado vs. diabético+rutina.

Por outro lado, a disfunção endotelial apresentada nos anéis de aorta torácica de coelhos diabéticos foi de  $71,3 \pm 6,4\%$ . A resposta relaxante máxima à acetilcolina foi de  $100 \pm 0\%$  nos tecidos obtidos de coelhos euglicêmicos e de  $28,7 \pm 2,4$  em anéis de aorta de coelhos diabéticos ( $p < 0,05$  vs. eugli). A incubação dos tecidos por 1 hora com GSH promoveu uma reversão de  $33,2 \pm 4,1\%$  na função endotelial com resposta máxima de  $52,4 \pm 3,2\%$  comparada com  $28,7 \pm 2,4\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db+GSH) obtida nos tecidos de coelhos diabéticos. Em tecidos que foram pré-incubados com ácido lipóico a resposta máxima à acetilcolina foi de  $47 \pm 4,0\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db), correspondendo a uma inibição de  $25 \pm 3,1\%$  na disfunção endotelial apresentada pelos tecidos não tratados. De maneira similar, a incubação dos tecidos por uma hora com rutina foi capaz de reverter a função endotelial em  $55 \pm 4,3\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db). Nesses tecidos a resposta máxima à acetilcolina foi de  $68 \pm 4,6\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) (Tabela 24 e Figura 42a).

A sensibilidade para acetilcolina dos tecidos tratados com GSH, ácido lipóico e rutina parece ter aumentado uma vez que os valores de  $PD_2$  nestes animais foram significativamente maiores, revelando maior potência agonista (Tabela 24).

A resposta endotélio-independente está inalterada entre os grupos (tabela 24 e fig. 42).



**figura 42.** Efeito de antioxidantes (glutaciona reduzida=GSH, ácido lipóico e rutina, concentração de  $1\mu\text{M}$ ), incubados por 1 hora, no relaxamento vascular endotélio-dependente induzido por acetilcolina (**A**) ou no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio, agonista endotélio-independente (**B**) em anéis de aorta de coelhos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de pelo menos 5 unidades experimentais. \* $p < 0.05$  vs. respostas obtidas em aórtas de coelhos diabéticos pré-tratados apenas com veículo. #.  $p < 0.05$  vs. respostas obtidas em tecidos de coelhos euglicêmicos.

**Tabela 24.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) na ausência e presença de antioxidantes (glutathiona reduzida=GSH, ácido lipóico e rutina, concentração de 1 $\mu$ M) em anéis de aorta torácica obtidas de coelhos diabéticos por aloxana

Grupo	E <sub>máx</sub> (%Pen)	PP (95%IC)	n
Diabéticos + veículo			
ACh	28,7 $\pm$ 2,4*	9,8 [10,7-8,8]	6
SNP	100 $\pm$ 0	8,3 [8,6-8,0]	6
Euglicêmico + veículo			
ACh	100 $\pm$ 0	9,7 [9,9-9,5]	8
SNP	100 $\pm$ 0	9,4 [9,8-9,2]	8
Diabético + GSH			
ACh	52,4 $\pm$ 3,2#	12,3 [13,4-11,4]	6
SNP	100 $\pm$ 0	8,8 [9,0-8,6]	6
Diabético + ác. lipóico			
ACh	47 $\pm$ 4,0#	12,6 [13,6-11,7]	5
SNP	100 $\pm$ 0	8,9 [9,2-8,6]	5
Diabético + rutina			
ACh	68 $\pm$ 4,6#	12,2 [12,5-11,8]	7
SNP	100 $\pm$ 0	9,5 [9,7-9,2]	7

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

A resposta máxima à acetilcolina em anéis de aorta de coelhos diabéticos pré-contráídos com  $K^+$  60 mM foi de  $46,8 \pm 3,7\%$  comparado com  $87,7 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db). A reversão da função endotelial nos tecidos tratados com rutina foi  $50,6 \pm 4,9\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) com resposta máxima de  $67,5 \pm 3,2\%$ . Essa resposta foi semelhante a obtida nos tecidos pré-contráídos com fenilefrina ( Tabela 25 e Figura 43).

A incubação de L-NAME (100  $\mu$ M) ou ODQ (100  $\mu$ M), após 1 h de incubação com rutina e na presença desta, foi capaz de prevenir a melhora na função endotelial induzida pela rutina. A resposta máxima acetilcolina nos tecidos tratados com L-NAME foi de  $10,7 \pm 3,1\%$  e de  $5,1 \pm 1,3\%$  nos tratados com ODQ. Este relaxamento foi significativamente menor do que aquele obtido nos animais diabéticos tratados com veículo (ver Tabela 26 e Figura 44).

Por outro lado, a resposta relaxante à acetilcolina em tecidos diabéticos incubados com rutina por 1h e depois expostos a caribdotoxina e apamina, bloqueadores de canais de potássio ativados por cálcio ( $BK_{Ca}$ ,  $IK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$ ), não foi significativamente diferente da resposta obtida na ausência desse bloqueador. A resposta relaxante máxima foi de  $68,6 \pm 4,6\%$  nos tecidos obtidos de coelhos diabéticos e incubados com rutina e de  $56,8 \pm 3,5$  nos tecidos de coelhos diabéticos incubados com rutina por 1 hora e expostos à mistura caribdotoxina-apamina (Tabela 26 e Figura 44). A inibição da disfunção do grupo pré-incubado com rutina foi de  $55 \pm 4,3\%$  comparado com  $39,4 \pm 2,6\%$  obtido nos tecidos incubados com rutina e expostos à mistura caribdotoxina-apamina.

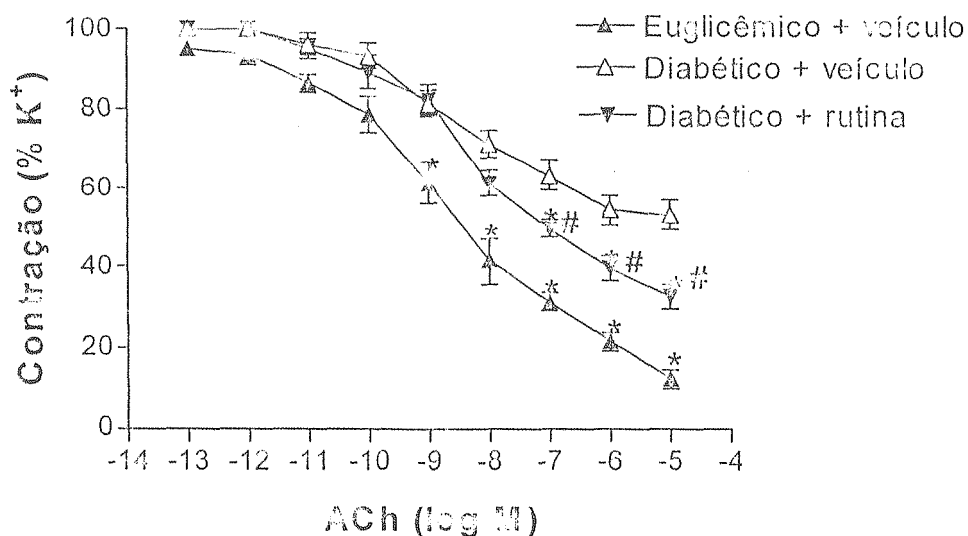
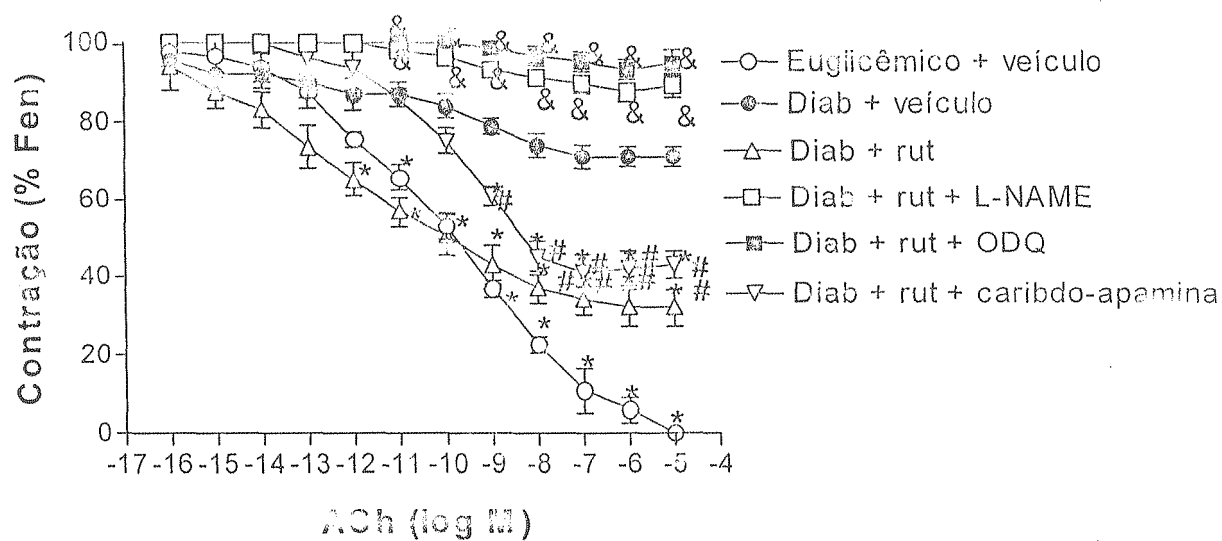


Figure 43. Efeito da rutina ( $1\mu\text{M}$ ), infundida durante 1 hora antes da realização das curvas, na vasodilatação endotélio-dependente induzida por acetilcolina em anéis de aorta torácica de coelhos. O tônus do leito foi aumentado com solução despolarizante ( $\text{K}^+$  60 mM). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de quatro unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos euglicêmicos.

Tabela 25. Parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente acetilcolina (ACh) em anéis de aorta torácica, pré-contraídas com solução despolarizante ( $\text{K}^+$  60 mM), obtidas de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença de rutina, na concentração de  $1\mu\text{M}$ , comparado com a resposta obtida em animais euglicêmicos.

Grupo	$R_{\text{máx}}$ (% $\text{K}^+$ )	$\text{PD}_2$ [95%IC]	N
Diabéticos + veículo			
ACh	$46,8 \pm 3,7^*$	8,4 [8,7-8,1]	4
Euglicêmico + veículo			
ACh	$87,7 \pm 2,3$	8,6 [8,9-8,2]	4
Diabético + rutina			
ACh	$67,5 \pm 3,2\#$	8,1 [8,4-7,7]	4

$p < 0,05$ , teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. # $p < 0,05$ , teste t não pareado vs. diabético + veículo.



**Figura 44.** Efeito dos bloqueadores da NOS (L-NAME), da guanilil ciclase sóluvel (ODQ) e de canais de potássio cálcio-sensíveis (caribdotoxina e apamina) no relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta pré-tratadas com rutina (1  $\mu$ M). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$  vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo, # $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos euglicêmicos. & $p < 0,05$  vs. resposta obtida em tecidos de coelhos diabéticos e pré-tratados com rutina.

**Tabela 26.** Parâmetros das curvas dose-resposta a acetilcolina em anéis de aorta de coelhos diabéticos na ausência e presença da rutina (1  $\mu$ M), ou rutina (1  $\mu$ M) com L-NAME (100  $\mu$ M), ou ODQ (100  $\mu$ M), ou da mistura caribdotoxina (0,1  $\mu$ M) e apamina (1  $\mu$ M)

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fca)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	n
Diabéticos + veículo ACh	28,7 $\pm$ 2,4*	9,8 [10,7-8,8]	6
Euglicêmico + veículo ACh	100 $\pm$ 0	9,7 [10-9,4]	8
Diabético + rutina ACh	68 $\pm$ 4,6#	12,1 [12,5-11,6]	7
Diabético + rutina + L-NAME ACh	10,7 $\pm$ 3,1&	9,2 [9,6-8,8]	4
Diabético + rutina + ODQ ACh	5,1 $\pm$ 1,3&	8,2 [8,7-7,7]	4
Diabético + rutina + caribdo-apamina ACh	56,8 $\pm$ 3,5#	9,7 [10.1-9,3]	4

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo. &p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+rutina.



#### 4.2.5. Efeito dos componentes do mediador putativo da insulina na disfunção endotelial no leito vascular renal e anéis de aorta torácica de coelhos diabéticos per aloxana.

A incubação dos componentes principais do mediador putativo da ação da insulina, DCI e me-DCI, por 1 hora em anéis de aorta de coelhos diabéticos melhorou significativamente a resposta endotélio-dependente evocada pela acetilcolina. A disfunção endotelial apresentada nos tecidos não tratados foi de  $57,8 \pm 4,6\%$  comparada com  $41,9 \pm 3,4\%$  ( $p < 0,05$ ) e  $35,1 \pm 2,8\%$  ( $p < 0,05$ ) obtidas nos tecidos tratados com DCI e me-DCI, respectivamente. Esses valores correspondem a uma inibição percentual da disfunção endotelial de  $27,4 \pm 2,3\%$  e  $39,2 \pm 3,4\%$ , respectivamente. Os valores de resposta máxima para acetilcolina nos tecidos não tratados foi de  $41,3 \pm 2,5\%$  comparada com  $56,8 \pm 3,4\%$  e  $63,5 \pm 5,4\%$  obtidas nos tecidos tratados com DCI e me-DCI, respectivamente. (Tabela 27 e Figura 45a).

DE maneira similar, a infusão de D-qui-ro-inositol ou metil-D-qui-ro-inositol melhorou a resposta endotélio-dependente no leito vascular renal em  $49,9 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,05$  Db+DCI vs. Db+Veículo) e  $63,8 \pm 5,6\%$  ( $p < 0,05$  Db+me-DCI vs. Db+Veículo), respectivamente. A resposta relaxante máxima induzida pela acetilcolina nos tecidos de animais diabéticos não tratados foi de  $22,9 \pm 3,5\%$  comparada com  $63,6 \pm 4,3\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db). Nos tecidos infundidos com D-qui-ro-inositol por uma hora a resposta relaxante máxima para acetilcolina foi de  $43,2 \pm 5,2\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) e de  $48,7 \pm 3,2\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) nos tecidos obtidos de coelhos diabéticos e infundidos com metil-D-qui-ro-inositol (Tabela 27 e Figura 46a).

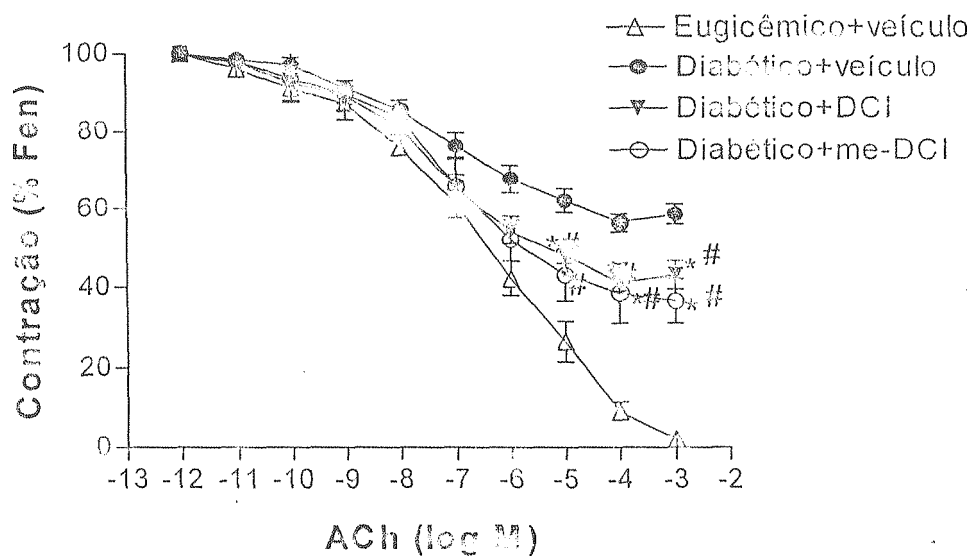
A resposta endotélio-independente induzida por nitroprussiato de sódio não foi afetada em nenhum dos tecidos pelo diabetes ou por quaisquer dos tratamentos utilizados (Tabelas 27 e 28 e Figuras 45b e 46b).

**Tabela 27.** Parâmetros das curvas dose-resposta aos vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina;ACh) ou endotélio-independente (nitroprussiato de sódio;SNP) em anéis de aorta torácica obtidas de coelhos diabéticos por aloxana incubados *in vitro* com 1 $\mu$ M de D-quirositol (DCI) ou metil-D-quirositol (me-DCI)

Grupo	R <sub>máx</sub> (%Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	N
Diabéticos + veículo			
ACh	41,3 $\pm$ 2,5*	7,2 [7,6-6,9]	6
SNP	100	6,8 [7,0-6,6]	6
Euglicêmico + veículo			
ACh	97,9 $\pm$ 0,3	6,1 [6,4-5,8]	6
SNP	100	7,0 [7,3-6,7]	6
Diabético + DCI			
ACh	56,8 $\pm$ 3,4#	7,3 [7,6-7,0]	6
SNP	100	6,6 [6,8-6,4]	6
Diabético + me-DCI			
ACh	63,5 $\pm$ 5,4#	7,0 [7,3-6,7]	6
SNP	100	6,9 [7,0-6,7]	6

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

A



B

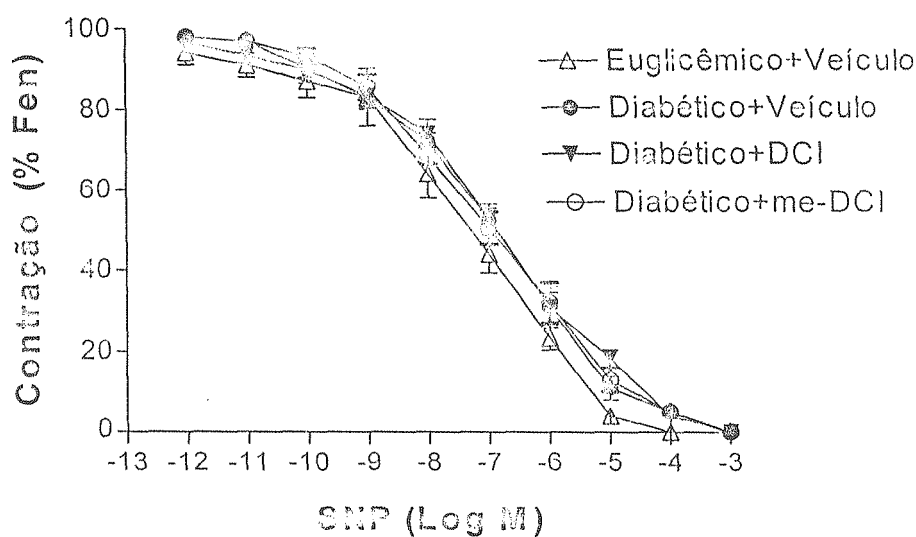


Figura 45 No painel (A) é mostrado o efeito da incubação por 1 hora de D-quirositol ou inítol (me-DCI) na vasodilatação induzida pelo agonistas endotélio-dependente, acetilcolina (ACh). Em (B) a resposta endotélio-independente induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica obtidas de coelhos diabéticos por aloxana comparadas com a resposta obtida em coelhos euglicêmicos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo. #  $p < 0,05$  vs. euglicêmicos.

**Tabela 28.** Peso, glicemia de coelhos após 4 semanas da indução de diabetes por aloxana ou injeção de veículo e parâmetros das curvas dose-resposta ao agonista endotélio-dependente (acetilcolina; ACh) na pressão de perfusão de rins obtidos de coelhos diabéticos por aloxana na ausência e presença da D-quirositol (DCI; 1 $\mu$ M) ou pinitol (me-DCI; 1 $\mu$ M).

Grupo	Peso (Kg)	Glicemia (mg/dL)	R <sub>máx</sub> (% Fen)	PD <sub>2</sub> [95%IC]	N
Diabéticos + veículo					
ACh	1,3 $\pm$ 0,1	253,7 $\pm$ 13,6*	22,9 $\pm$ 3,6*	10,7 [11,4-10,1]	4
SNP			100 $\pm$ 0	6,8 [7,1-6,5]	4
Euglicêmico + veículo					
ACh	1,6 $\pm$ 0,2	74,3 $\pm$ 4,5	63,6 $\pm$ 4,3	9,8 [10,1-9,5]	4
SNP			100 $\pm$ 0	7,4 [8,0-6,8]	4
Diabético + DCI					
ACh	1,1 $\pm$ 0,1	316,3 $\pm$ 18,7*	43,2 $\pm$ 5,2#	9,7 [9,9-9,5]	4
SNP			100 $\pm$ 0	6,6 [6,9-6,4]	4
Diabético + me-DCI	1,2 $\pm$ 0,1	269,4 $\pm$ 17,3*			
ACh			48,7 $\pm$ 3,2#	9,4 [9,9-8,9]	4
SNP			100 $\pm$ 0	6,9 [7,2-6,6]	4

\*p<0,05, teste t não pareado vs. euglicêmico+veículo. #p<0,05, teste t não pareado vs. diabético+veículo.

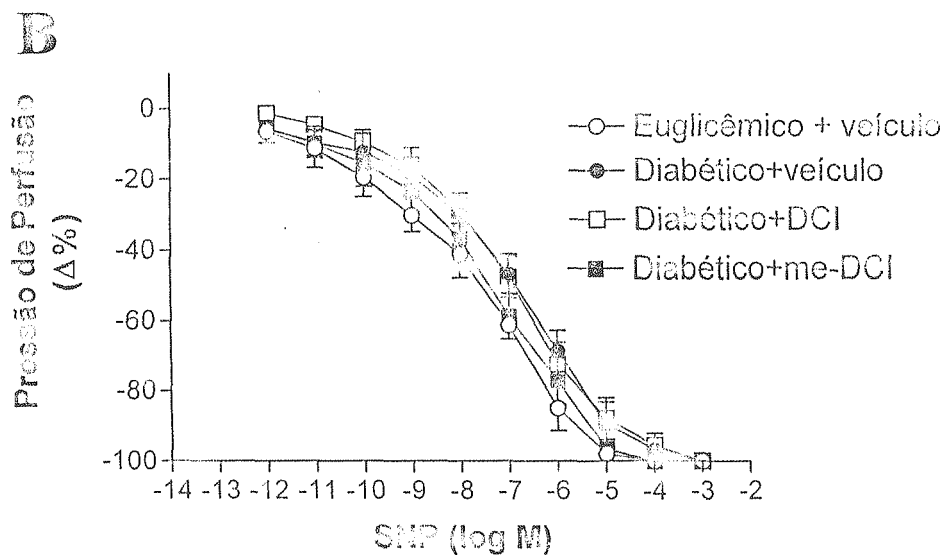
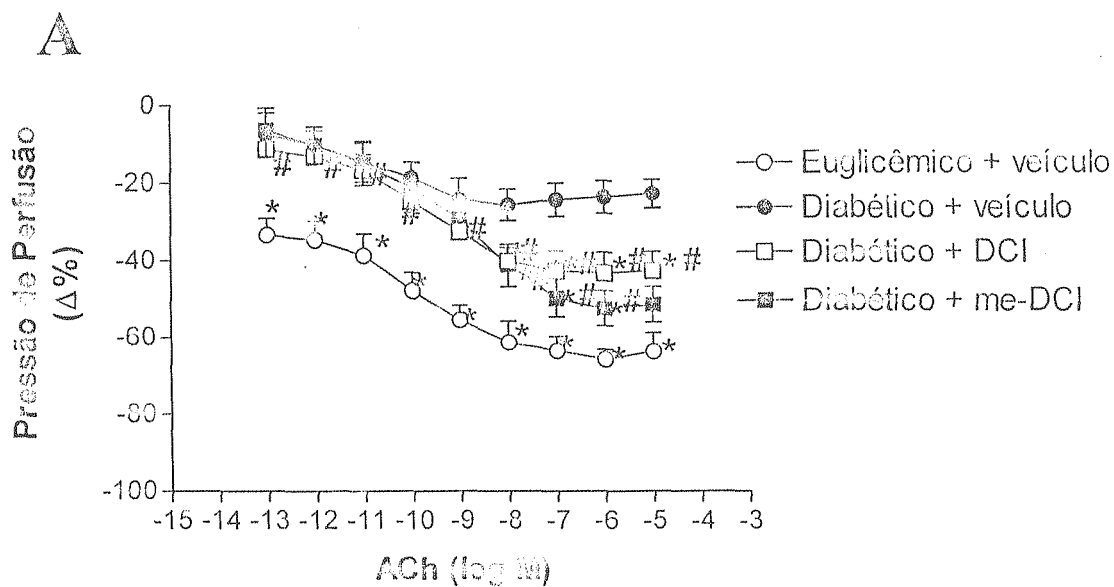


Figura 46. Efeito da infusão por 1 hora de D-quiroinositol ou pinitol na vasodilatação induzida pelo agonistas endotélio-dependente, acetilcolina (ACh; A) e endotélio-independente, nitroprussiato de sódio (SNP; B) no leito vascular renal de coelhos diabéticos por aloxana comparadas com a resposta obtida em coelhos euglicêmicos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer vs. tecidos de animais diabéticos infundidos com veículo. #  $p < 0,05$  vs. euglicêmicos.



#### 4.2.6 Efeito dos antioxidantes naturais GSH, ácido lipóico e rutina na disfunção endotelial e nitrérgica de corpos cavernosos de coelhos diabéticos por aloxana.

Em experimentos iniciais controles o efeito da estimulação transmural por campo elétrico (EFS), que evoca uma resposta nervosa não-adrenérgica não-colinérgica cujo maior componente é nitrérgico, isto é mediado por óxido nítrico de origem neuronal, foi investigada em tiras de corpo cavernoso obtidas de coelhos euglicêmicos na ausência e presença de bloqueadores farmacológicos em experimentos isolados. Os bloqueadores utilizados nos testes com estimulação por campo elétrico transmural foram o L-NAME, bloqueador inespecífico das enzimas óxido nítrico sintetase; ODQ, bloqueador da enzima guanilil ciclase solúvel; 7-NI, bloqueador inespecífico da enzima óxido nítrico sintetase, que sofre captação neuronal e TTX, bloqueador de potenciais de ação neuronais. A resposta relaxante obtida na frequência máxima utilizada (16 Hz) foi de  $72 \pm 4,0\%$ . A resposta máxima obtida nos tecidos pré-tratados com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), ODQ (100  $\mu\text{M}$ ), 7-NI (100  $\mu\text{M}$ ) ou TTX (1  $\mu\text{M}$ ) foi de  $8,9 \pm 2,1\%$  (bloqueio de  $87,6 \pm 4,7\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ),  $7,6 \pm 2,3\%$  (bloqueio de  $89,5 \pm 5,7\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ),  $8,1 \pm 3,4\%$  (bloqueio de  $88,8 \pm 6,3\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) e  $3,1 \pm 0,4\%$  ( $95,7 \pm 1,3\%$  de bloqueio;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ), respectivamente (Figura 47a e 48)

A resposta endotélio-dependente induzida por acetilcolina (1  $\mu\text{M}$ ) em tiras de corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina foi de  $87 \pm 8,0\%$ . O pré-tratamento das tiras com atropina (10  $\mu\text{M}$ ), L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) e ODQ (100  $\mu\text{M}$ ) reduziu a resposta máxima para  $9,3 \pm 4,3\%$  (bloqueio de  $89,3 \pm 6,4\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ),  $7,6 \pm 1,6\%$  (bloqueio de  $91,3 \pm 7,8\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) e  $3,6 \pm 0,7\%$  (bloqueio de  $95,9 \pm 8,4\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ), respectivamente (Figura 47b e 48).

O relaxamento induzido pelo óxido nítrico (30  $\mu\text{M}$ ; nitrato de sódio em solução com pH 2,0) foi de  $56 \pm 4,7\%$  quando estudado na ausência de bloqueadores e de  $53,3 \pm 3,6\%$  ( $p > 0,05$ ) na presença de L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) e  $5,9 \pm 1,2\%$  (bloqueio de  $89,5 \pm 7,2\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) na presença de ODQ (100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 47b e 48)

O relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP; 1  $\mu\text{M}$ ) foi de  $84 \pm 3,6\%$  nos tecidos controle, de  $85 \pm 9,3\%$  ( $p > 0,05$ ) nos tecidos pré-tratados com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) e de

$12 \pm 3,4\%$  (bloqueio de  $85,7 \pm 6,8\%$ ;  $p < 0,05$ ) nos tecidos pré-tratados com ODQ ( $100 \mu\text{M}$ ) (Figura 47b).

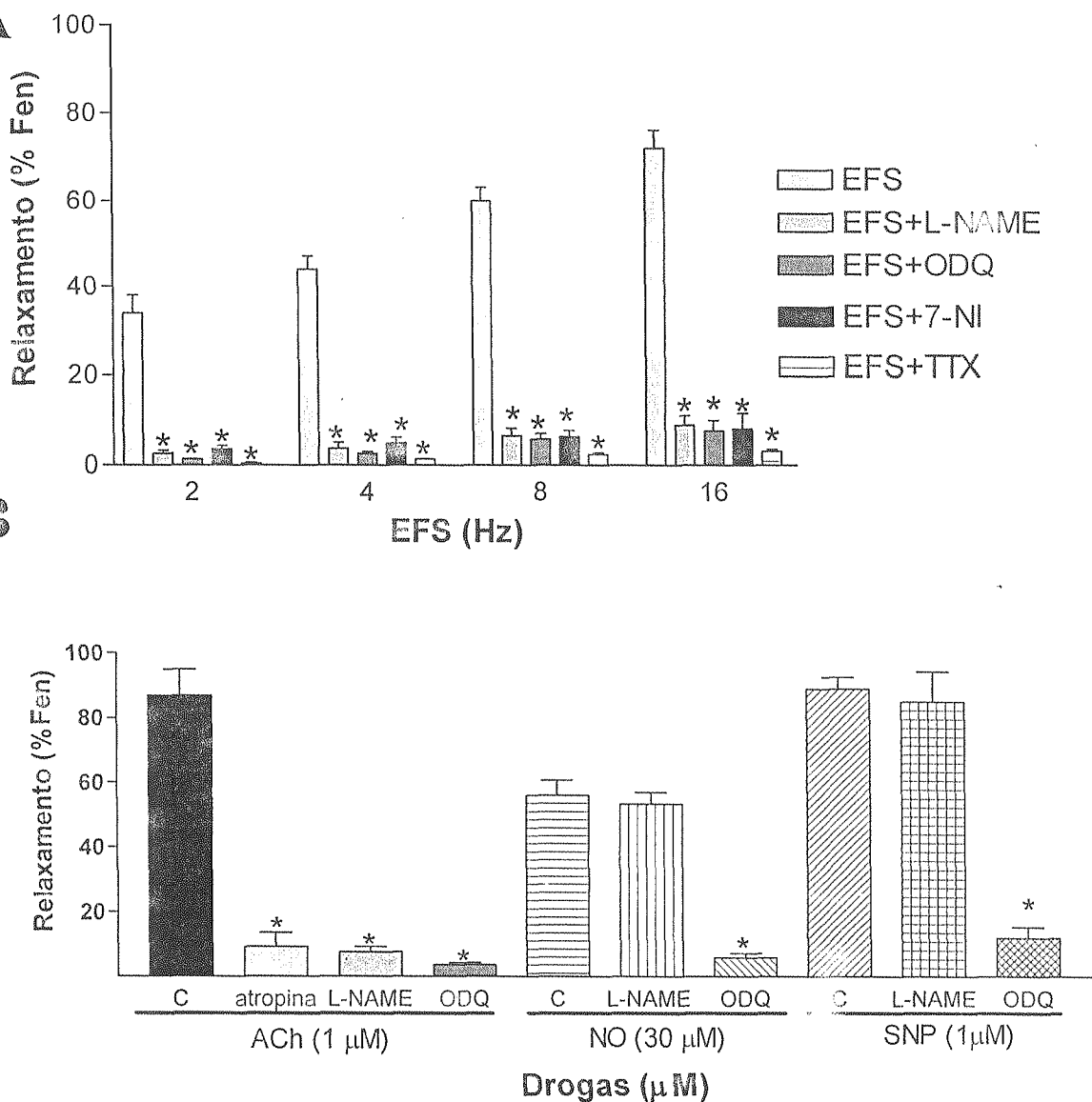
A diabetes aloxânica causou após 4 semanas da indução uma significativa diminuição na resposta nitrérgica nas tiras de corpos cavernosos isolados. A resposta máxima obtida (com frequência de 16 Hz) por estimulação através de campo elétrico transmural diminuiu em  $58,7 \pm 4,3\%$  ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ) nos tecidos obtidos de coelhos diabéticos (Figura 49a). Os valores de resposta relaxante máxima foram de  $89,6 \pm 6,8\%$  ( $n=12$ ) nos corpos cavernosos de coelhos euglicêmicos e de  $37 \pm 4,0\%$  ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ) nos tecidos obtidos de coelhos diabéticos, respectivamente. De maneira similar, a resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina ( $1 \mu\text{M}$ ) foi reduzida em  $68 \pm 5,7\%$  ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ). A resposta máxima obtida com adição de  $30 \mu\text{M}$  de solução de óxido nítrico foi significativamente menor ( $45 \pm 3,6\%$ ,  $p < 0,05$ ) nos tecidos de obtidos de coelhos diabéticos (Figura 49b).



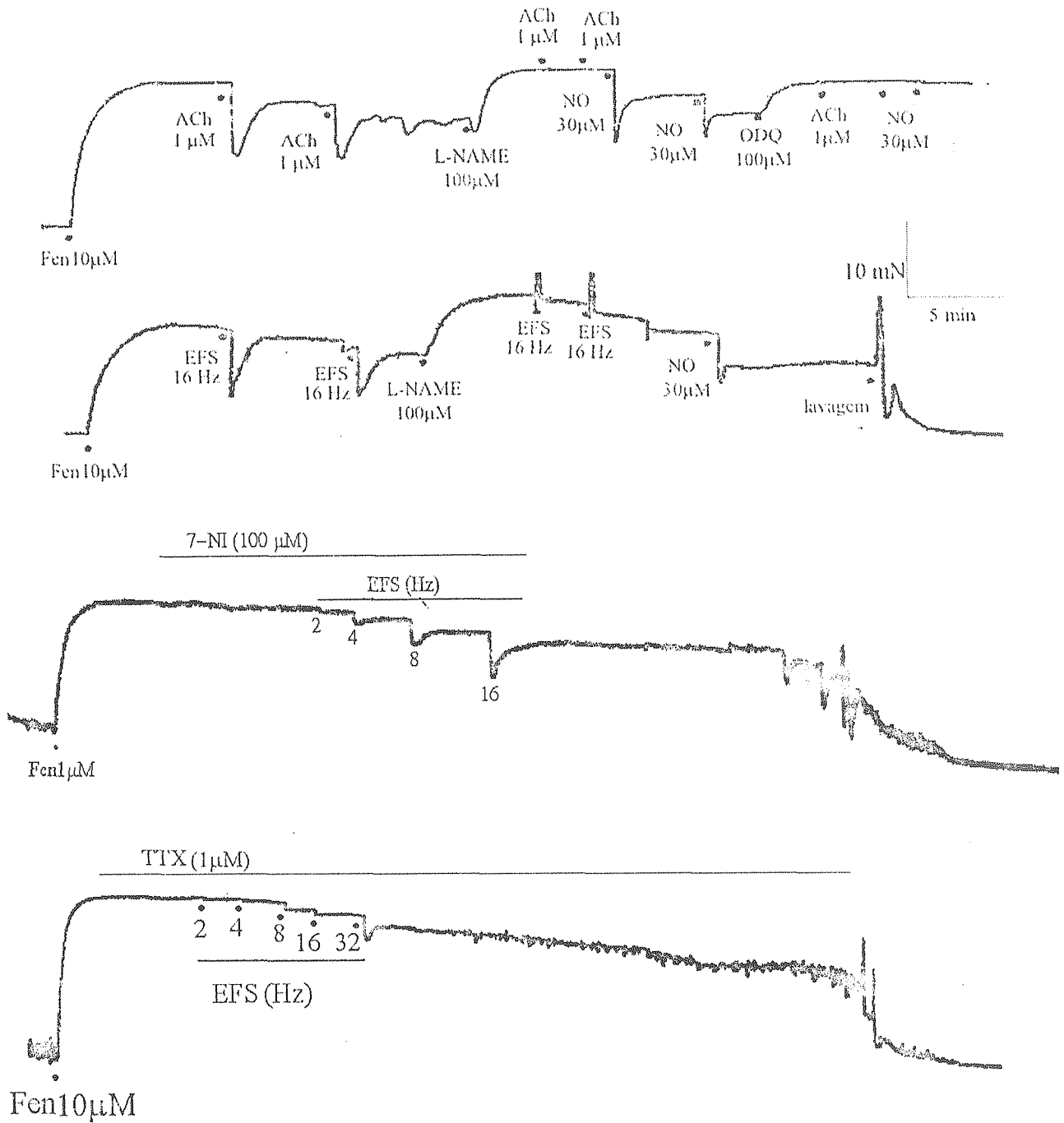
Tabela 29. Perfil glicêmico e peso corporal de coelhos diabéticos por aloxana após 4 semanas da indução.

Grupo	n	Peso corporal (Kg)	Glicose sérica (mg/dL)
Euglicêmicos (controle)	12	3,6±0,4	77,4 ± 4,3
Diabéticos (controle)	10	2,8±0,3	320,2 ±12,3*
Diabéticos (GSII)	4	3,1±0,4	342,3±14,3*
Diabéticos (Ác. lipóico)	4	2,6±0,3	273,4±11,6*
Diabéticos (rutina; rutina +TTX)	5	2,4±0,4	257,1±13,2*
Diabéticos (rutina+L-NAME; rutina+7-NI)	3	2,6±0,3	311±14,6*
Diabéticos (rutina+ ODQ; rutina+ caribdotoxina- apamina)	3	3,0±0,4	265,2±11,1*
Euglicêmicos (K <sup>+</sup> 60 mM)	4	2,5±0,3	83,6±7,
Diabéticos (K <sup>+</sup> 60 mM; K <sup>+</sup> 60 mM+rutina)	4	3,4±0,2	228,5±15,6*

\*p<0,05, teste t de Student não pareado bicaudal, comparado com os animais euglicêmicos. Estes animais foram utilizados para experimentos de corpos cavernosos isolados.



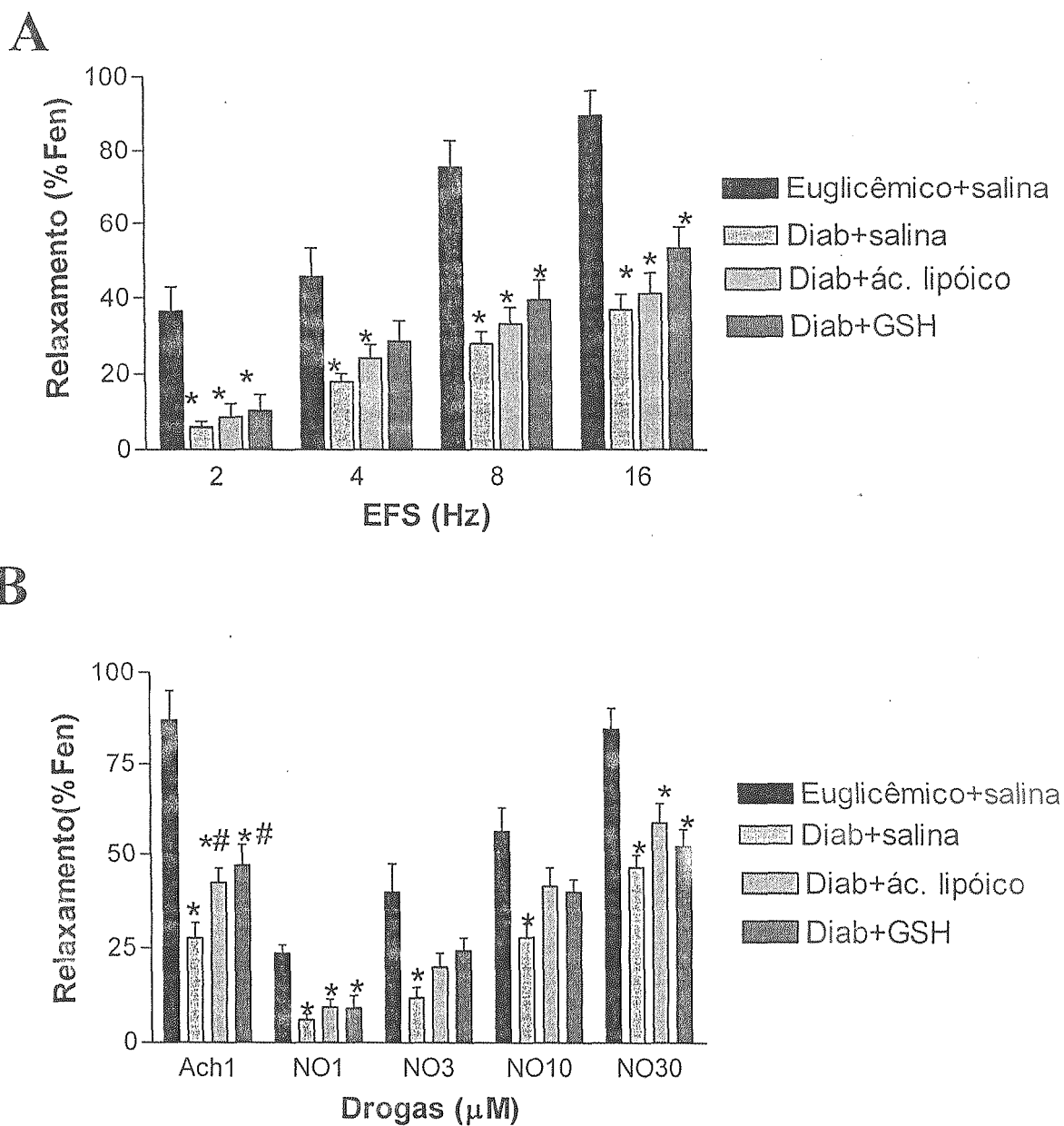
**Figura 47.** Efeito do L-NAME (100μM), ODQ (100μM), 7-NI (100μM) e TTX (1μM) no relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (EFS) no corpo cavernoso de coelhos euglicêmicos (A). Em (B) é mostrado o efeito do L-NAME (100μM) e ODQ (100μM) na resposta endotélio-dependente induzida por acetilcolina (1μM) e nas respostas endotélio-independentes induzida por nitrato de sódio (NO; 30 μM) e nitroprussiato de sódio (1 μM), além do efeito da atropina na resposta da acetilcolina (1μM). Fen = fenilefrina; EFS = estimulação por campo elétrico transmural (do inglês “Electrical Field Stimulation”). \* p<0,05, ANOVA seguida de Tukey vs. euglicêmicos. Os dados são expressos como média ± erro padrão (n=4), tanto para o painel A como para o B.



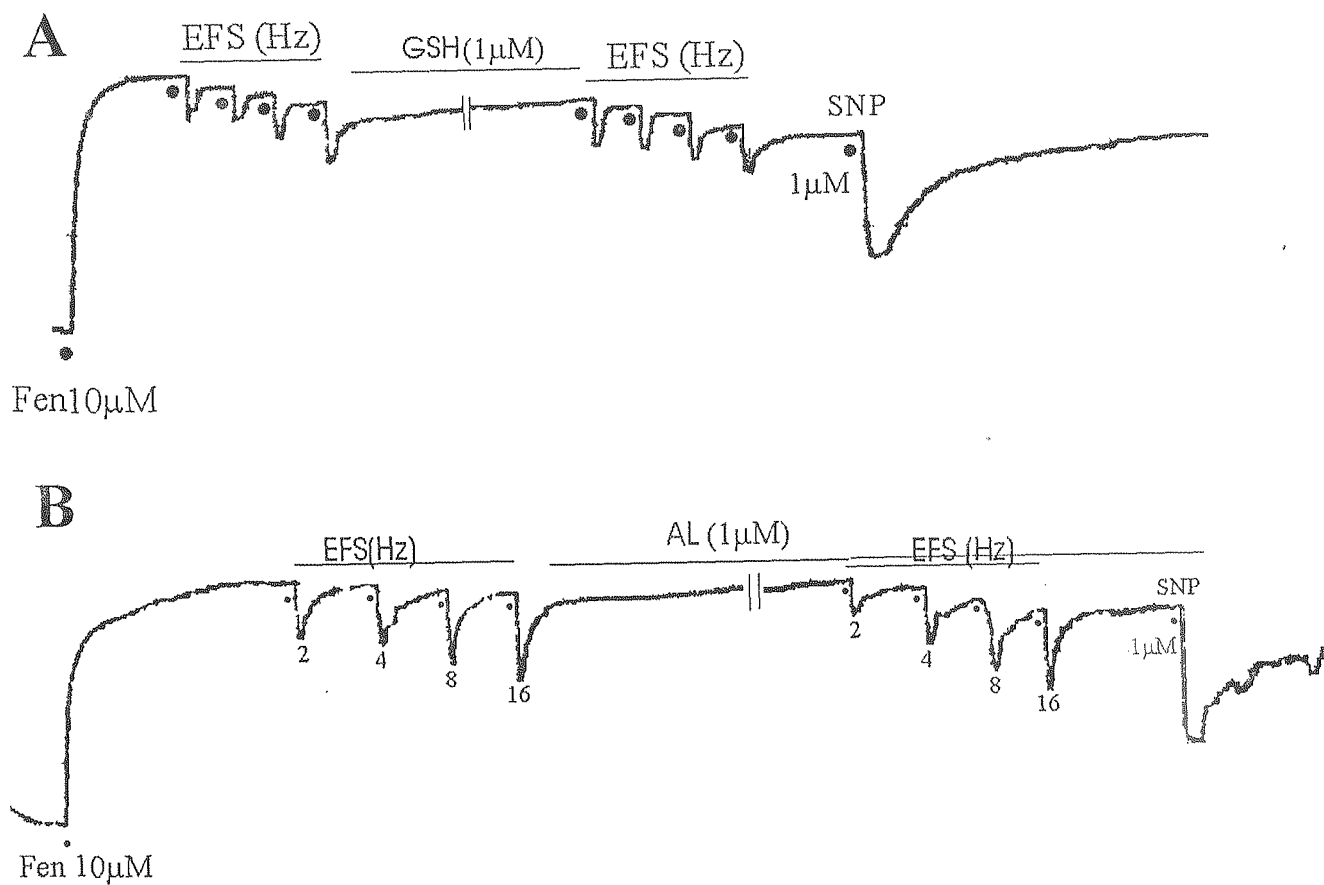
**Figura 48.** Registros fisiográficos representativos do efeito do L-NAME, ODQ, 7-NI ou TTX no relaxamento induzido por acetilcolina ( $1\mu\text{M}$ ), nitrato de sódio ( $100\mu\text{M}$ ; pH 2.0; NO) ou estímulo elétrico transmural (EFS) no corpo cavernoso de coelhos euglicêmicos. Fen=fenilefrina; EFS = estimulação por campo elétrico transmural (do inglês "Electrical Field Stimulation").

A incubação dos tecidos com ácido lipóico ou GSH por uma hora não afetou a resposta ao estímulo por campo elétrico em nenhuma das frequências estudadas. A resposta obtida na frequência máxima utilizada (16 Hz) foi de  $41,3 \pm 5,4\%$  ( $P > 0,05$ ) nos tecidos tratados com ácido lipóico e de  $53,4 \pm 5,7\%$  ( $p > 0,05$ ) nos tecidos tratados com GSH (Figura 49a e 50a). Por outro lado, a resposta relaxante induzida por acetilcolina foi significativamente afetada pelo tratamento com ácido lipóico ou GSH. A resposta máxima nos tecidos de animais diabéticos foi de  $27,8 \pm 3,8\%$  comparada com  $47 \pm 5,0\%$  ( $69 \pm 5,7\%$  de incremento;  $p < 0,05$  vs. Db) e  $42,3 \pm 5,6\%$  ( $52 \pm 4,6\%$  de incremento;  $p < 0,05$  vs. Db) nos corpos cavernosos de coelhos diabéticos e pré-tratados com ácido lipóico ou GSH, respectivamente (Figura 49b e 50b). Apesar da tendência ao incremento nos grupos pré-tratados com ácido lipóico ou GSH (aumento de  $26 \pm 3,4\%$  e de  $12,5 \pm 2,1\%$ , respectivamente), não houve diferença estatisticamente significativa entre a resposta induzida por óxido nítrico nos grupos diabéticos e tratados.

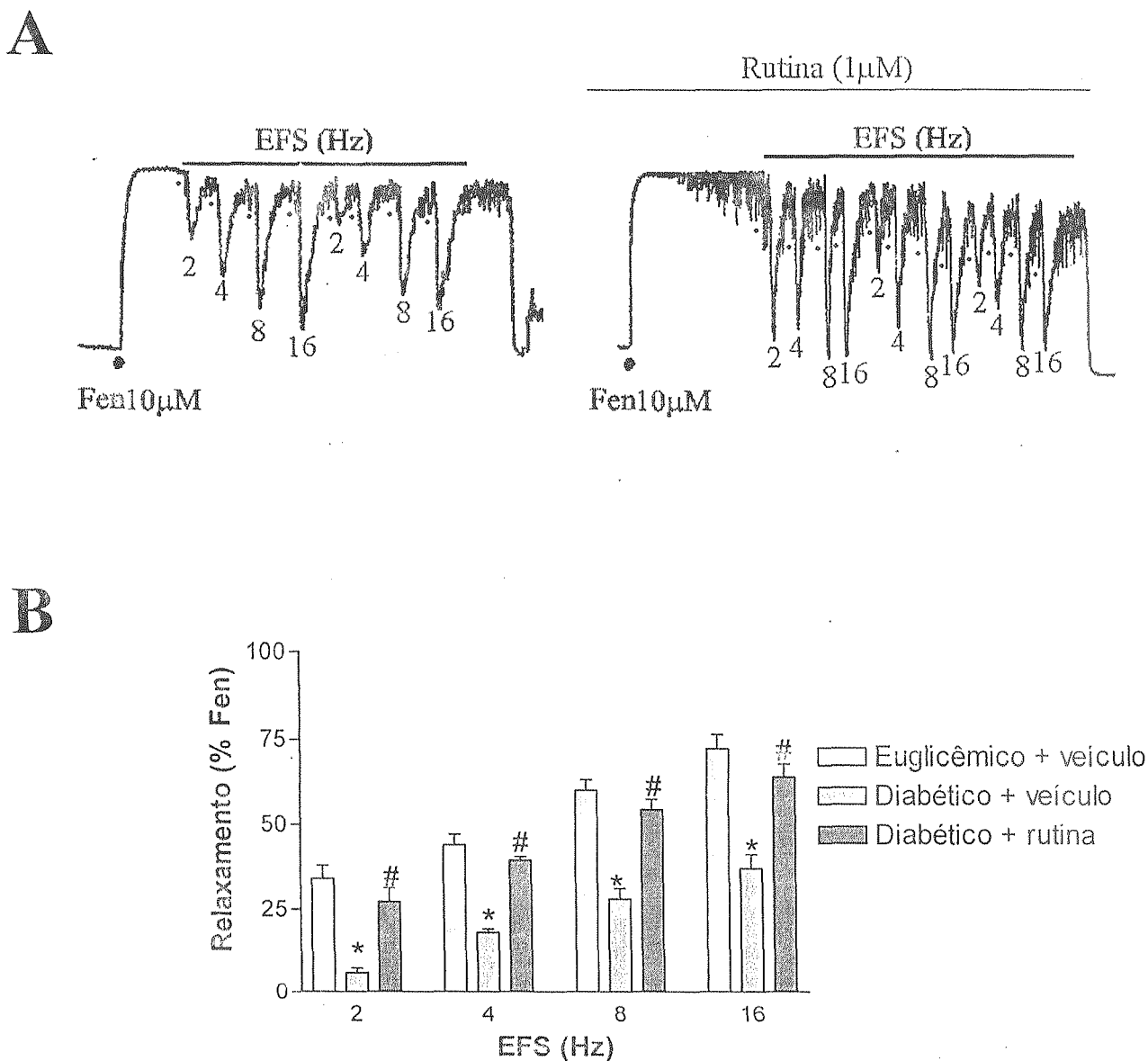
Por outro lado, a resposta ao estímulo por campo elétrico foi significativamente incrementada nos tecidos incubados com rutina em todas as frequências utilizadas. A resposta induzida pela frequência máxima utilizada foi de  $63,8 \pm 4,0\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) comparada com  $37 \pm 4,0\%$  obtidas nos tecidos de coelhos diabéticos (Figura 51 a e b). A resposta relaxante induzida pela acetilcolina em tiras de corpo cavernosos de coelhos diabéticos não tratados foi de  $27,8 \pm 3,8\%$  comparada com  $74 \pm 7,0\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) nos tecidos pré-incubados com rutina (Figura 52 a e b). A resposta ao óxido nítrico em solução foi incrementada em  $60,4 \pm 6,7\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db) nos tecidos de coelhos diabéticos incubados com rutina. A resposta máxima obtida na concentração de  $100 \mu\text{M}$  foi de  $48 \pm 5,9\%$  nos tecidos de corpo cavernoso de coelhos diabéticos antes da incubação com rutina e de  $77 \pm 4,1\%$  ( $p < 0,05$ ) após 1 hora de incubação (Figura 52b).



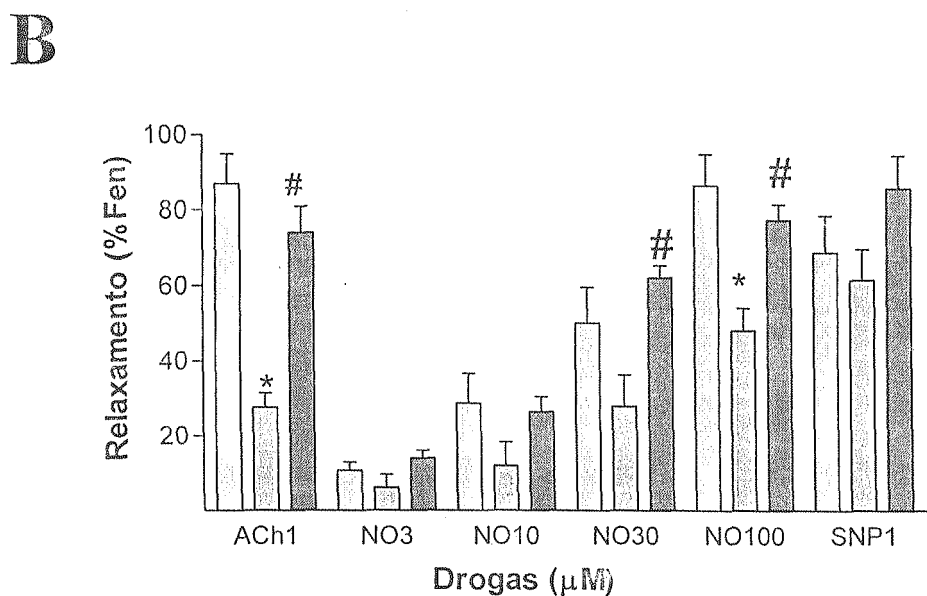
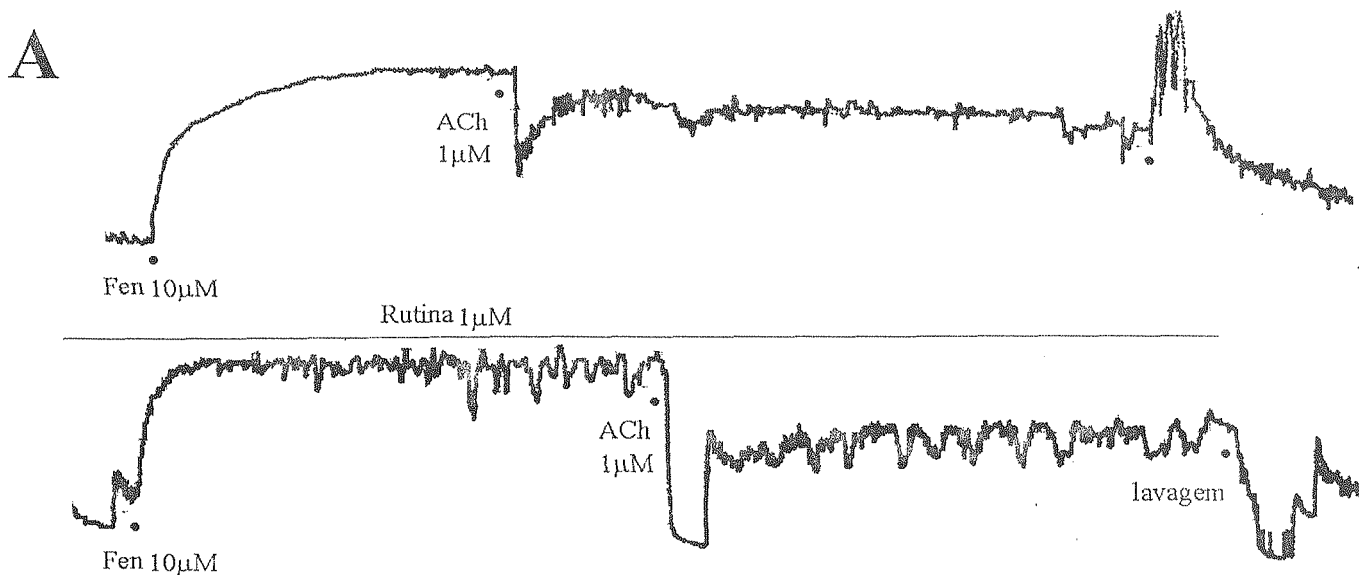
**Figura 49.** Efeito do ácido lipóico ( $1\mu\text{M}$ ) ou GSH ( $1\mu\text{M}$ ) no relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (EFS) no corpo cavernoso de coelhos diabéticos por aloxana (A) comparado com aquele obtido em coelhos euglicêmicos. Em (B) é mostrado o efeito do do ácido lipóico ( $1\mu\text{M}$ ) ou GSH ( $1\mu\text{M}$ ) nas respostas relaxantes induzidas por ACh ( $1\mu\text{M}$ ) ou óxido nítrico (NO);  $1-30\mu\text{M}$ ) em tiras de corpos cavernosos obtidas de coelhos diabéticos. Fen = fenilefrina; EFS = estimulação por campo elétrico transmural (do inglês “Electrical Field Stimulation”). \*  $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey vs. euglicêmicos. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey vs. diabéticos. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ), tanto para o painel A como para o B.



**Figura 50.** Registro fisiográfico representativo do efeito da incubação, por 1 hora, de tiras de corpo cavernosos obtidas de coelhos com 4 semanas de diabetes aloxânica com glutathiona reduzida em (A) ou ácido lipóico em (B) nas respostas relaxantes evocadas por campo elétrico transmural (20V; 0,5 ms; 2-16Hz).



**Figura 51.** No painel (A) é mostrado um traçado representativo do efeito da rutina na resposta nitrérgica evocada por campo elétrico transmural e da resposta colinérgica endotélio-dependente. em (B) é mostrado o efeito da rutina no relaxamento induzido por campo elétrico transmural (2-16Hz) no corpo cavernoso de coelho. \* $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais euglicêmicos. #  $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais diabéticos. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).



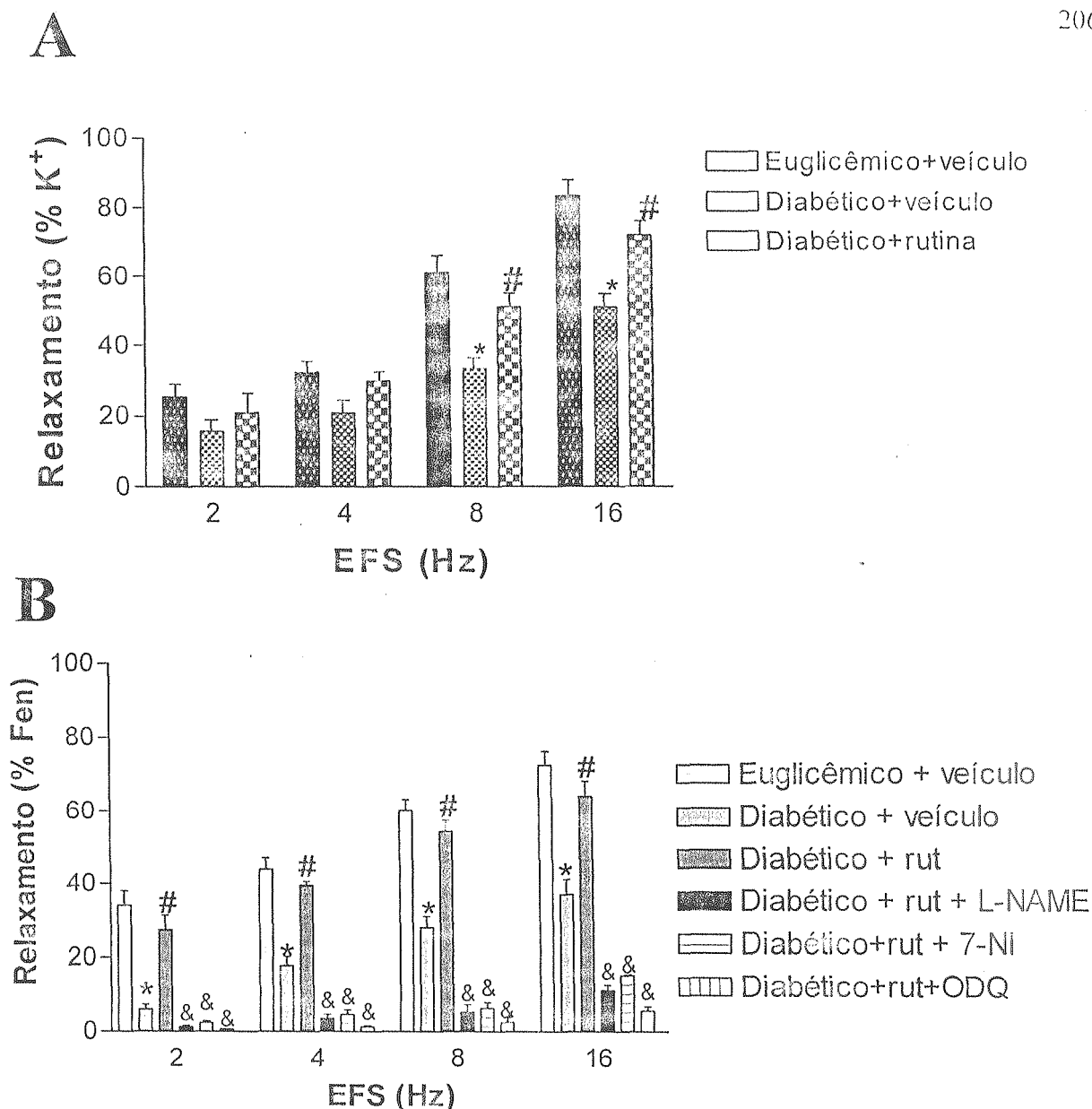
**Figura 52.** Registro fisiográfico representativo do efeito da rutina na resposta endotélio-dependente induzida por acetilcolina em tiras de corpos cavernosos de coelhos diabéticos (A). Em (B) é mostrado o efeito da rutina no relaxamento induzido por acetilcolina ( $1 \mu\text{M}$ ), nitrato de sódio (pH 2,0; NO; 3-100  $\mu\text{M}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $1 \mu\text{M}$ ) no corpo cavernoso de coelho. \* $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais euglicêmicos. #  $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais diabéticos. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ).



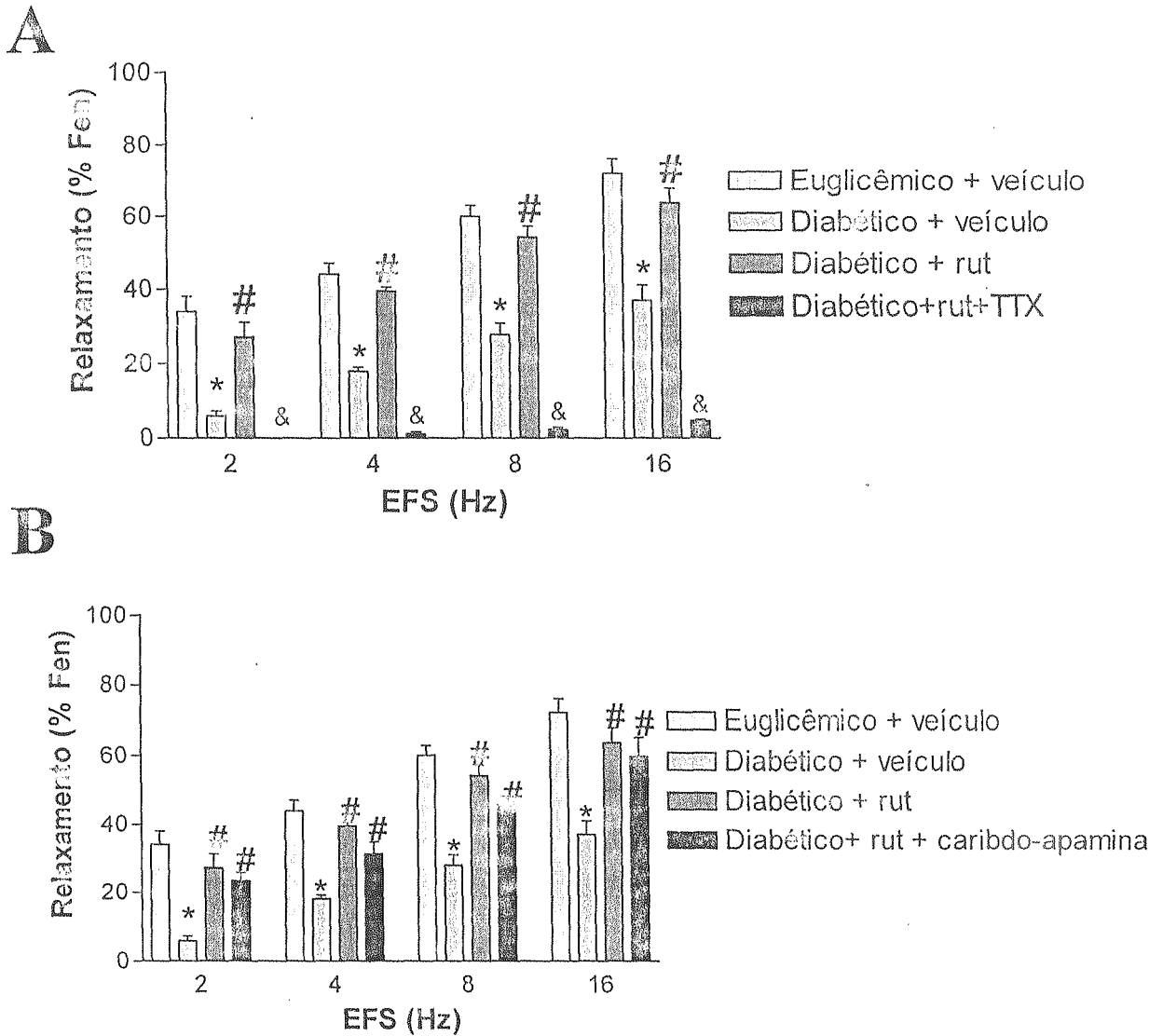
A resposta relaxante máxima induzida por campo elétrico em tiras de corpo cavernosos pré-contraídos com  $K^+$  60 mM foi de  $83,5 \pm 4,6\%$  em tecidos obtidos de coelhos euglicêmicos e de  $51,3 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,05$  vs. eugli) em tiras de coelhos diabéticos. Em tecidos incubados por 1 hora com rutina a resposta relaxante máxima foi de  $72,3 \pm 4,0\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db).(Figura 53a). Este valor de relaxamento foi semelhante ao obtido em tiras pré-contraídas com fenilefrina. Por outro lado, os tecidos de coelhos diabéticos tratados com  $100 \mu\text{M}$  L-NAME, 7-NI ou ODQ apresentaram resposta ao estímulo transmural significativamente reduzidas. As respostas à estimulação elétrica na frequência de 16 Hz foram de  $11,3 \pm 1,6\%$  ( $p > 0,05$ , vs. Db),  $15,3 \pm 0,3\%$  ( $p > 0,05$ , vs. Db) e  $5,6 \pm 1,2\%$  ( $p > 0,05$ , vs. Db) (Figura 53b).

A resposta nitrérgica evocada por campo elétrico em tiras de corpos cavernosos de coelhos diabéticos pré-tratados com rutina foi também bloqueada na presença de tetrodotoxina. A resposta de coelhos diabéticos na presença de rutina foi de  $63,8 \pm 4,0\%$  e de  $4,6 \pm 0,5\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db+rutina) em tecidos pré-tratados com rutina e expostos a tetrodotoxina (Figura 54a). A mistura caribdotoxina-apamina, porém, não foi capaz de afetar a resposta ao estímulo por campo elétrico em coelhos diabéticos após a incubação com rutina. A resposta relaxante evocada nesses tecidos foi de  $63,8 \pm 4,0\%$  comparada com  $59,8 \pm 5,4\%$  ( $p < 0,05$  vs. Db+rutina) obtidas nos tecidos tratados com rutina e expostos aos bloqueadores de canais de potássio cálcio dependente (Figura 54b).

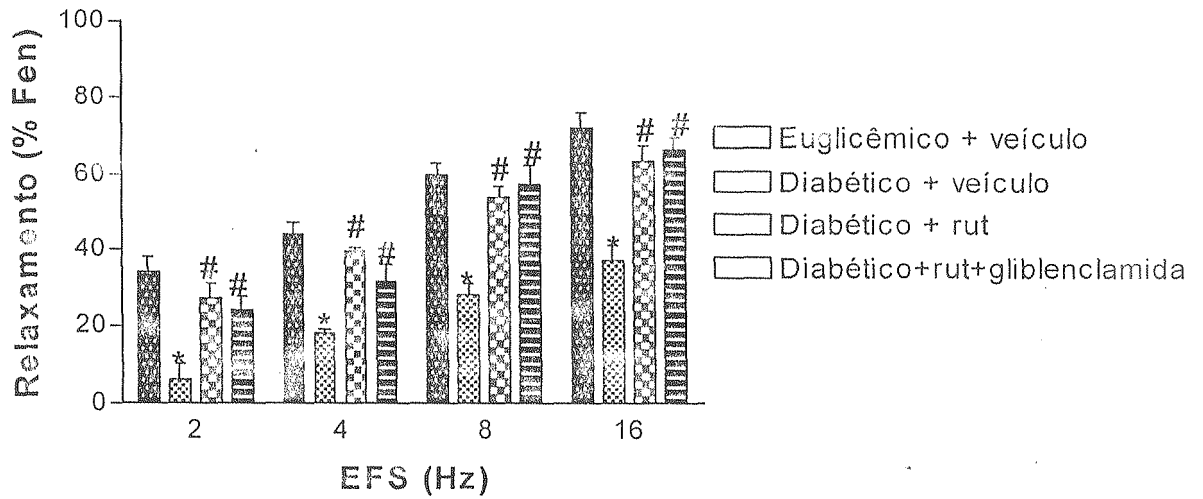
De maneira similar, a resposta a estimulação por campo elétrico transmural, após incubação com rutina e glibenclamida, não difere da resposta na presença de rutina isoladamente. A resposta à frequência máxima utilizada (16 Hz) foi de  $66,6 \pm 2,9\%$  nos tecidos incubados com rutina e expostos a glibenclamida comparada com  $63,8 \pm 4,0\%$  ( $p > 0,05$ ) nos tecidos tratados apenas com rutina.(Figura 55).



**Figura 53** No painel (A) é mostrado o efeito da rutina na resposta nitrérgica evocada por campo elétrico transmural em tiras de corpos cavernosos de coelhos diabéticos e pré-contraídas com K<sup>+</sup> 60 mM. No painel (B) é mostrado o efeito da rutina no relaxamento induzido por campo elétrico transmural (2-16Hz) no corpo cavernoso de coelhos diabéticos na ausência e presença de L-NAME (100µM), 7-nitroindazol (7-NI; 100µM) ou ODQ (100µM). \*p<0,05, ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais euglicêmicos. # p<0,05, ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais diabéticos. & p<0,05, ANOVA seguido de Tukey-Kramer comparada com respostas de tecidos diabéticos não tratados. Os dados são expressos como média ± erro padrão (n=5) nos três primeiros grupos e (n=3) nos testes com bloqueadores.



**Figura 54.** No painel (A) é mostrado o efeito da tetrodotoxina (bloqueador neuronal) na resposta nitrérgica evocada por campo elétrico transmural em tiras de corpos cavernosos de coelhos diabéticos pré-tratados ou não com rutina. No painel (B) é mostrado o efeito da mistura caribdotoxina (caribdo; 0,1  $\mu$ M) e apamina (1 $\mu$ M) relaxamento induzido por campo elétrico transmural (2-16Hz) no corpo cavernoso de coelhos pré-tratados ou não com rutina (1 $\mu$ M). \* $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais euglicêmicos. #  $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais diabéticos. &  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer comparado com respostas de tecidos diabéticos não tratados. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ) nos três primeiros grupos e ( $n=3$ ) nos testes com bloqueadores.



**Figura 55.** Efeito da glibenclamida ( $10\mu\text{M}$ ) (bloqueador de canais de potássio ATP-sensíveis) na resposta nitrérgica evocada por campo elétrico transmural em tiras de corpos cavernosos de coelhos diabéticos pré-tratados ou não com rutina ( $1\mu\text{M}$ ). \* $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais euglicêmicos. #  $p < 0,05$ , ANOVA com Tukey como teste post-hoc comparado com animais diabéticos. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ) nos três primeiros grupos e ( $n=3$ ) nos testes com bloqueadores.

#### 4.2.7 Efeito dos componentes do mediador putativo da insulina na disfunção endotelial e nitrérgica de corpos cavernosos de coelhos diabéticos por aloxana.

A incubação por 1 h de 1  $\mu$ M dos componentes principais do mediador putativo da ação da insulina, D-qui-ro-Inositol (DCI) e metil-D-qui-ro-inositol (me-DCI) não alterou a resposta ao óxido nítrico exógeno e nem a resposta relaxante induzida por estimulação nitrérgica. Apesar de haver uma tendência global ao incremento das respostas nenhuma delas alcançou significância estatística.

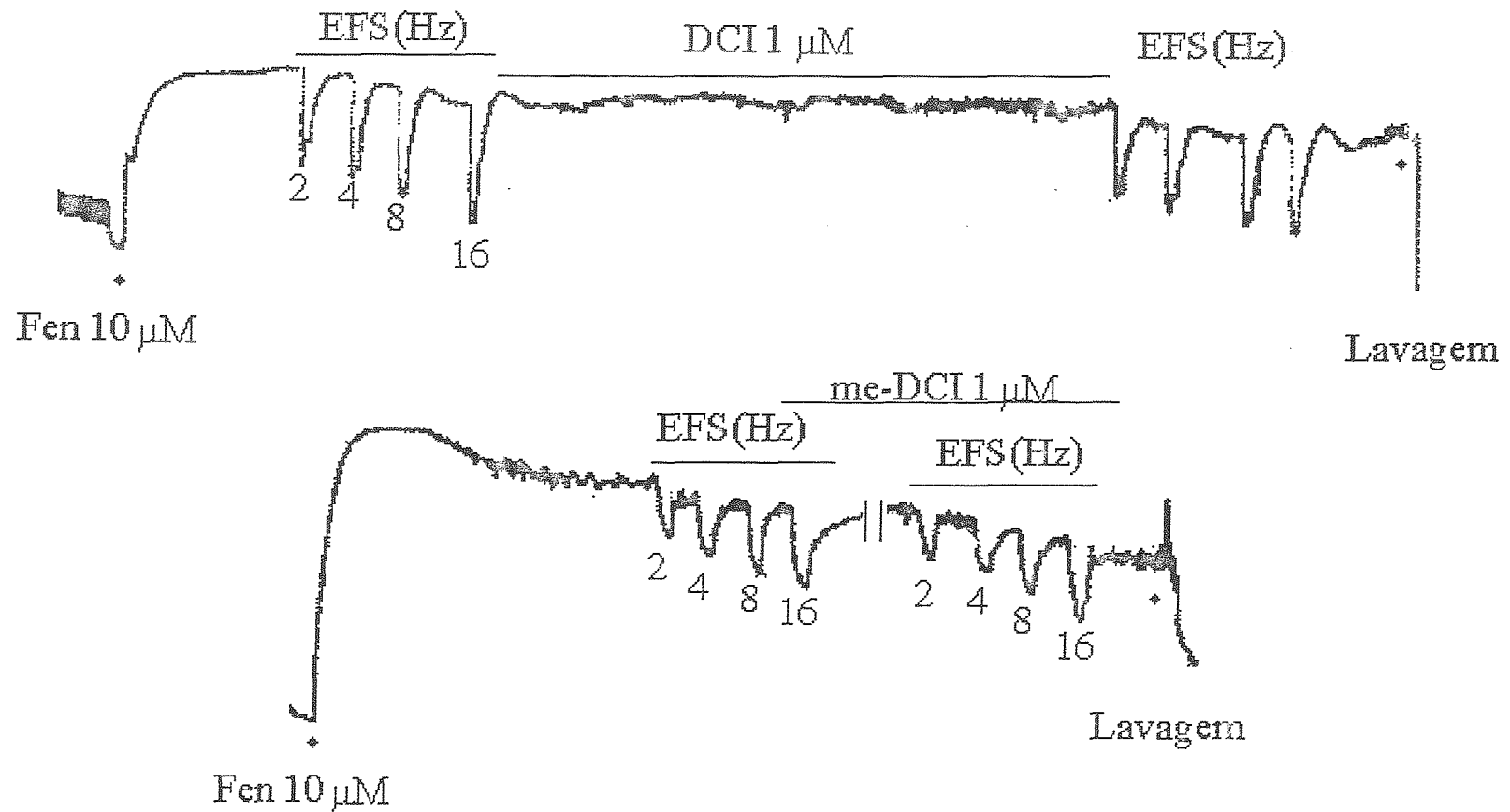
A incubação dos tecidos com DCI aumentou em  $22\pm 3,8\%$  a resposta induzida por 30  $\mu$ M de óxido nítrico enquanto que o me-DCI incrementou essa resposta em  $24,2\pm 3,9\%$  sem no entanto apresentar significância estatística. O valor de relaxamento máximo na tiras de corpo cavernoso obtidas de coelhos diabéticos foi de  $46,5\pm 3,4\%$  comparada com  $59,6\pm 3,4\%$  nos tecidos pré-tratados com DCI e  $61,3\pm 6,3\%$  nos pré-tratados com me-DCI (Figura 57a).

Por outro lado, o relaxamento nitrérgico induzido por campo elétrico transmural em tiras de corpos cavernos obtidos de coelhos diabéticos foi incrementado em  $13\pm 1,6\%$  após incubação com DCI e em  $28,4\pm 3,4\%$  após pré-tratamento com me-DCI, mostrando uma tendência, embora sem significância estatística, a uma melhora da resposta. Os valores de resposta a estimulação na frequência de 16 Hz foram de  $37\pm 4,0\%$  nos tecidos diabéticos não tratados, de  $42,5\pm 3,6\%$  naqueles pré-tratados com DCI e de  $51,7\pm 2,6\%$  nos incubados com me-DCI (Figura 56 e 57b).

**Tabela 30.** Perfil glicêmico e peso corporal de coelhos diabéticos por aloxana após 4 semanas da indução.

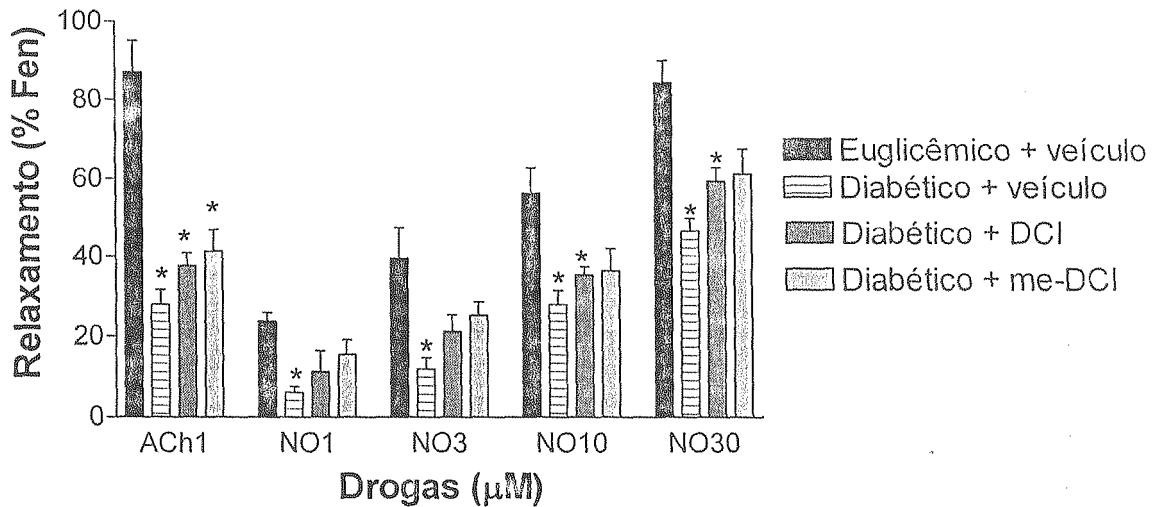
Grupo	n	Peso corporal (Kg)	Glicose sérica (mg/dL)
Euglicêmicos (controle)	12	$3,6\pm 0,4$	$77,4 \pm 4,3$
Diabéticos (DCI)	4	$2,7\pm 0,1$	$234,6\pm 11,8^*$
Diabéticos (me-DCI)	4	$2,5\pm 0,1$	$246,5\pm 9,6^*$

\* $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado vs. euglicêmico.



**Figura 56.** No painel (A) é mostrado um traçado representativo do efeito da D-quirositol na resposta nitrérgica evocada por campo elétrico transmural (EFS; 20 V; 0,5 ms; 2-16 Hz) em tiras de corpos cavernosos de coelhos diabéticos por aloxana. Em (B) é mostrado o efeito do pinitol (me-DCI) no relaxamento induzido por campo elétrico transmural (2-16Hz) no corpo cavernoso de coelho diabético.

A



B

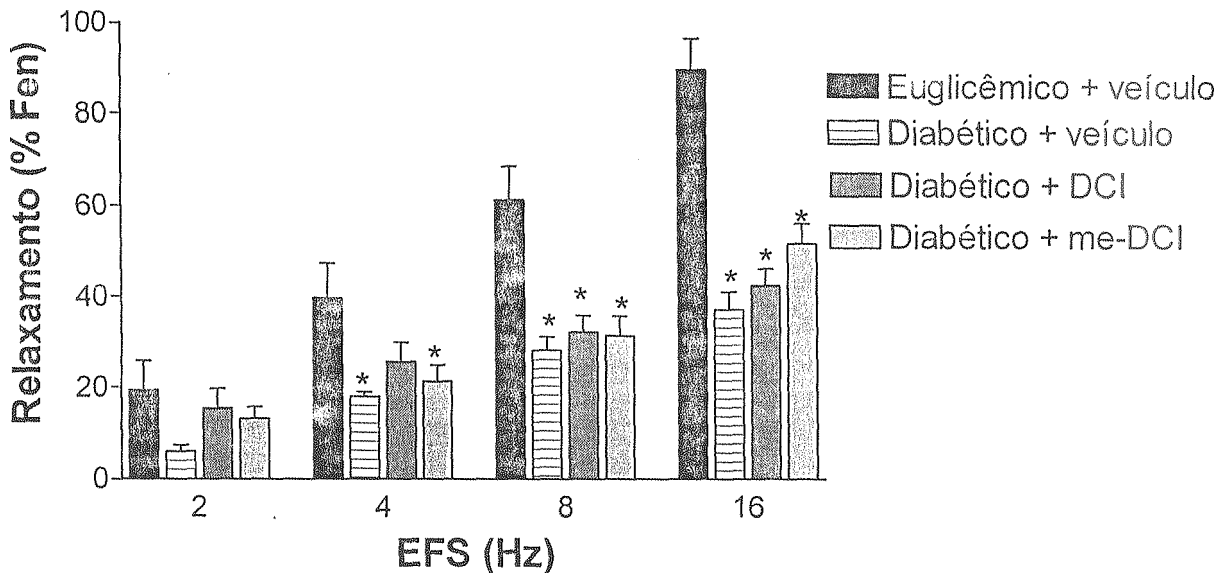


Figura 57. Efeito do D-quirositol e pinitol, ambos na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , no relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina (1  $\mu\text{M}$ ) ou no relaxamento endotélio-independente induzido por nitrato de sódio (pH 2,0; NO) no corpo cavernoso isolado de coelhos diabéticos por aloxana comparado com a resposta obtida em coelhos euglicêmicos (A). Em B é mostrado o efeito das mesmas concentrações destes inositóis no relaxamento nitrérgico induzido por estimulação transmural por campo elétrico (EFS). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4 unidades experimentais. \*  $p < 0,05$ , ANOVA seguida de Tukey vs. euglicêmicos.

#### 4.1.8. Efeito dos componentes do mediador putativo da insulina na resposta vasodilatadora induzida por óxido nítrico em anéis de aorta torácica e estudo do potencial “scavenger” de superóxido desses compostos

Em experimentos iniciais o incremento do tônus, de anéis de aorta pré-contraídos submaximalmente com fenilefrina (0,1  $\mu$ M), induzido por L-NAME (100  $\mu$ M) foi utilizado como medida indireta da função endotelial. O incremento induzido pelo L-NAME em tecidos obtidos de animais jovens foi  $111,3 \pm 12,3\%$  (ver figura 59 para ilustração) e nos tecidos obtidos de animais senescentes foi de  $41 \pm 3,4\%$  ( $p < 0,05$  vs. jovens) (Figura 58 e 59).

Nesses tecidos a resposta ao óxido nítrico (NO; 1  $\mu$ M) foi obtida duas vezes como controle interno (1NO e 2NO) e a seguir o tecido foi incubado com superóxido dismutase (15 u/mL) por 1 minuto e a resposta óxido nítrico repetida. A resposta ao óxido nítrico na segunda curva nos ratos senescentes foi de  $24,4 \pm 3,6\%$  comparada com  $43,4 \pm 4,2\%$  ( $p < 0,05$ ) obtida após incubação com SOD-1. A incubação dos tecidos com DCI nas concentrações de 1, 3 e 10  $\mu$ M foi capaz nas doses maiores de aumentar a resposta ao óxido nítrico para  $40,6 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,05$ ) e  $52,4 \pm 5,4\%$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente (Figura 60a). De maneira semelhante a incubação dos tecidos com SOD-1 nesse grupo incrementou a resposta relaxante do NO de  $31,3 \pm 4,6\%$  para  $52,6 \pm 5,4\%$  ( $p < 0,05$ ) e a incubação do me-DCI (3 e 10  $\mu$ M) incrementou para  $57 \pm 6,4\%$  ( $p < 0,05$ ) e  $63,1 \pm 6,4\%$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente (Figura 60b e 61).



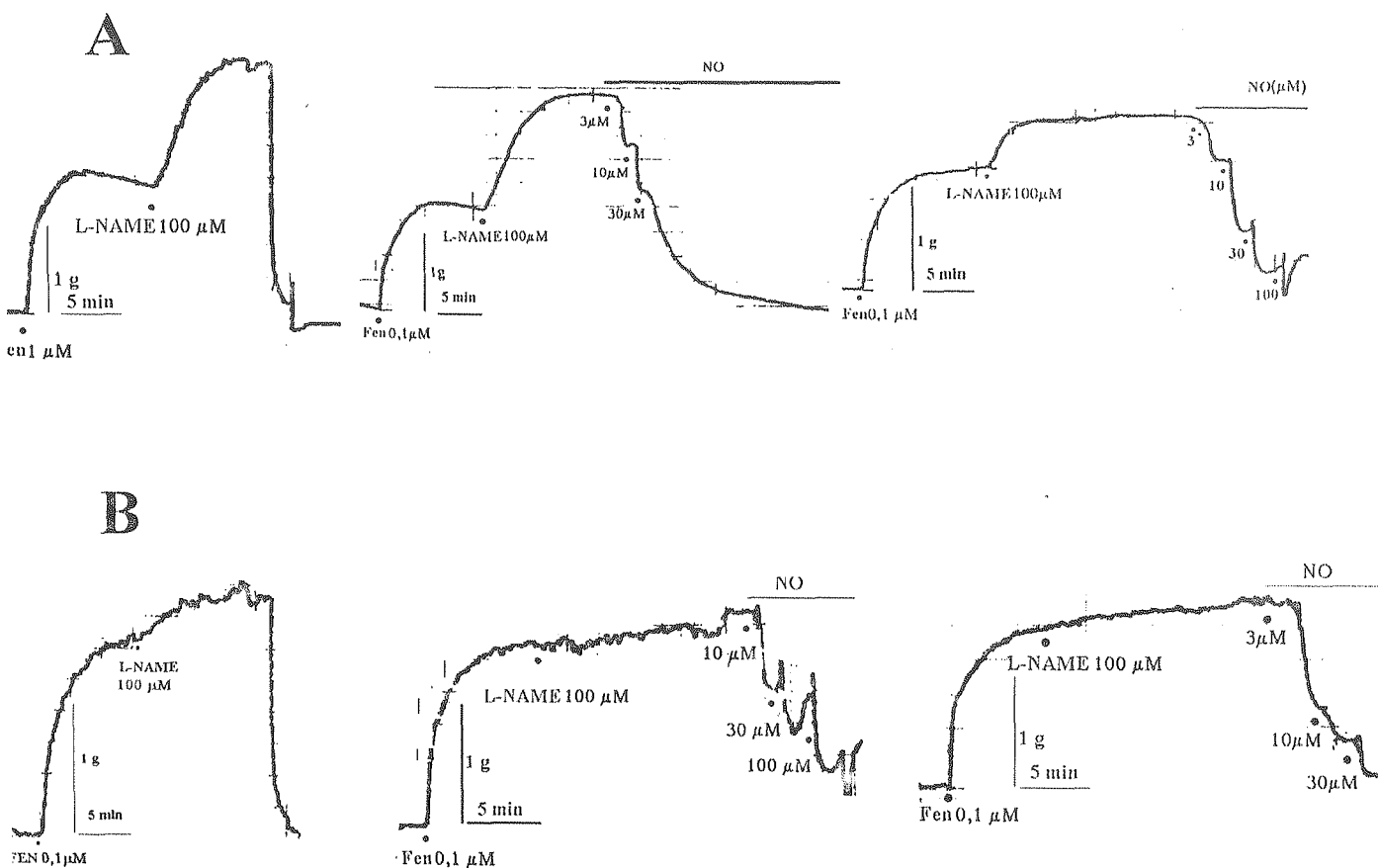
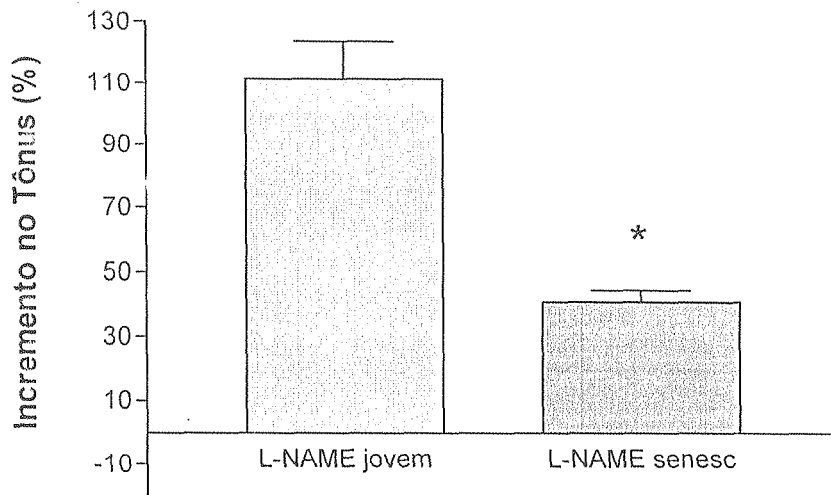


Figura 58. Registro poligráfico representativo do incremento no tónus da aorta de ratos jovens (A) ou senescentes (B) induzido por L-NAME (100  $\mu$ M) quando aplicado no platô da resposta contrátil à fenilefrina (0,1  $\mu$ M). Em alguns experimentos uma curva dose-resposta ao NO (nitrito de sódio em pH 2,0) foi realizada para experimentos posteriores de potenciação da resposta relaxante induzido por NO pela enzima superóxido dismutase.



**Figura 59.** Incremento no tônus da aorta de ratos jovens ou senescentes induzido por L-NAME (100  $\mu$ M) quando aplicado no platô da resposta contrátil à fenilefrina (0,1  $\mu$ M). \*  $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado.

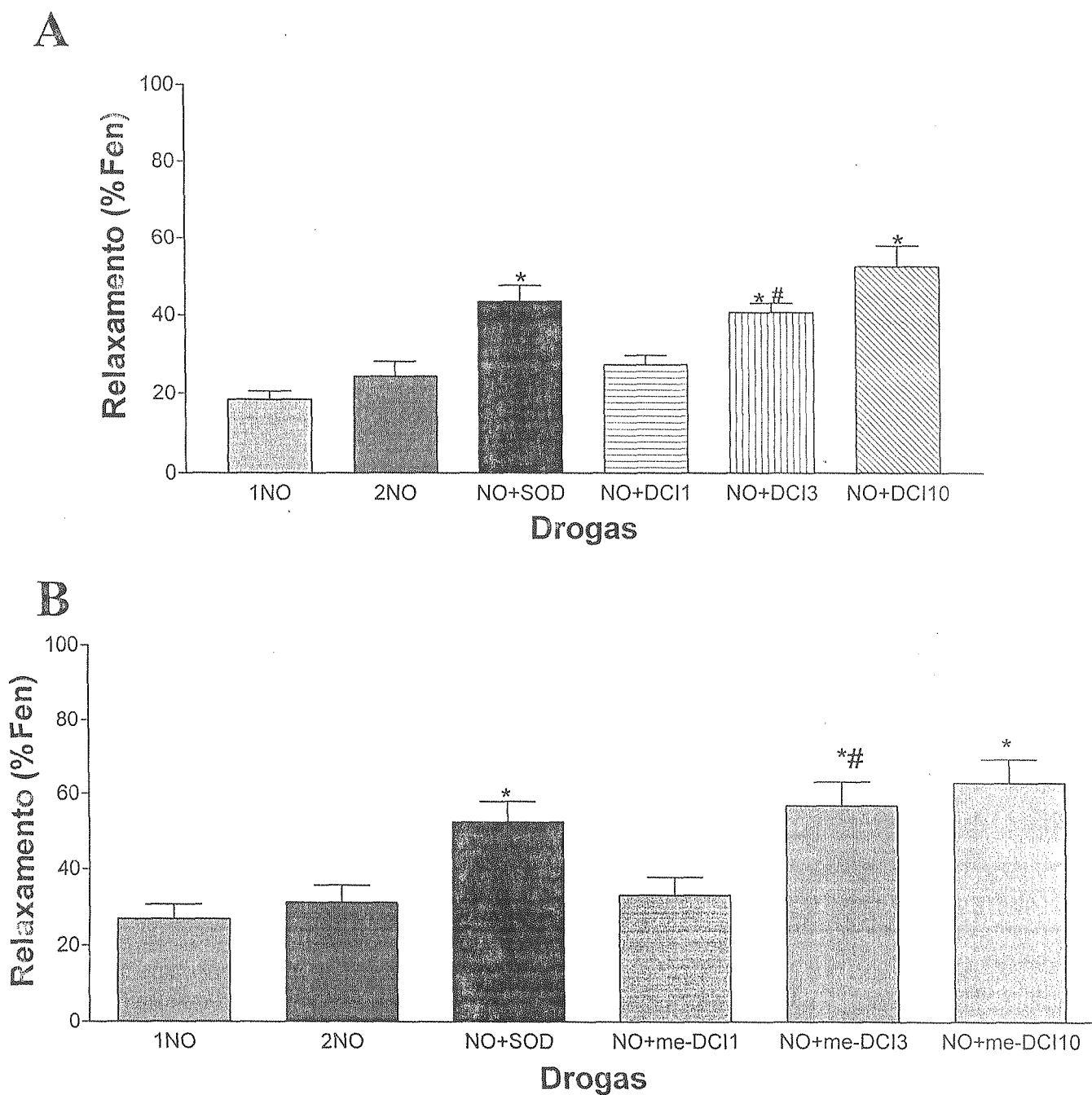
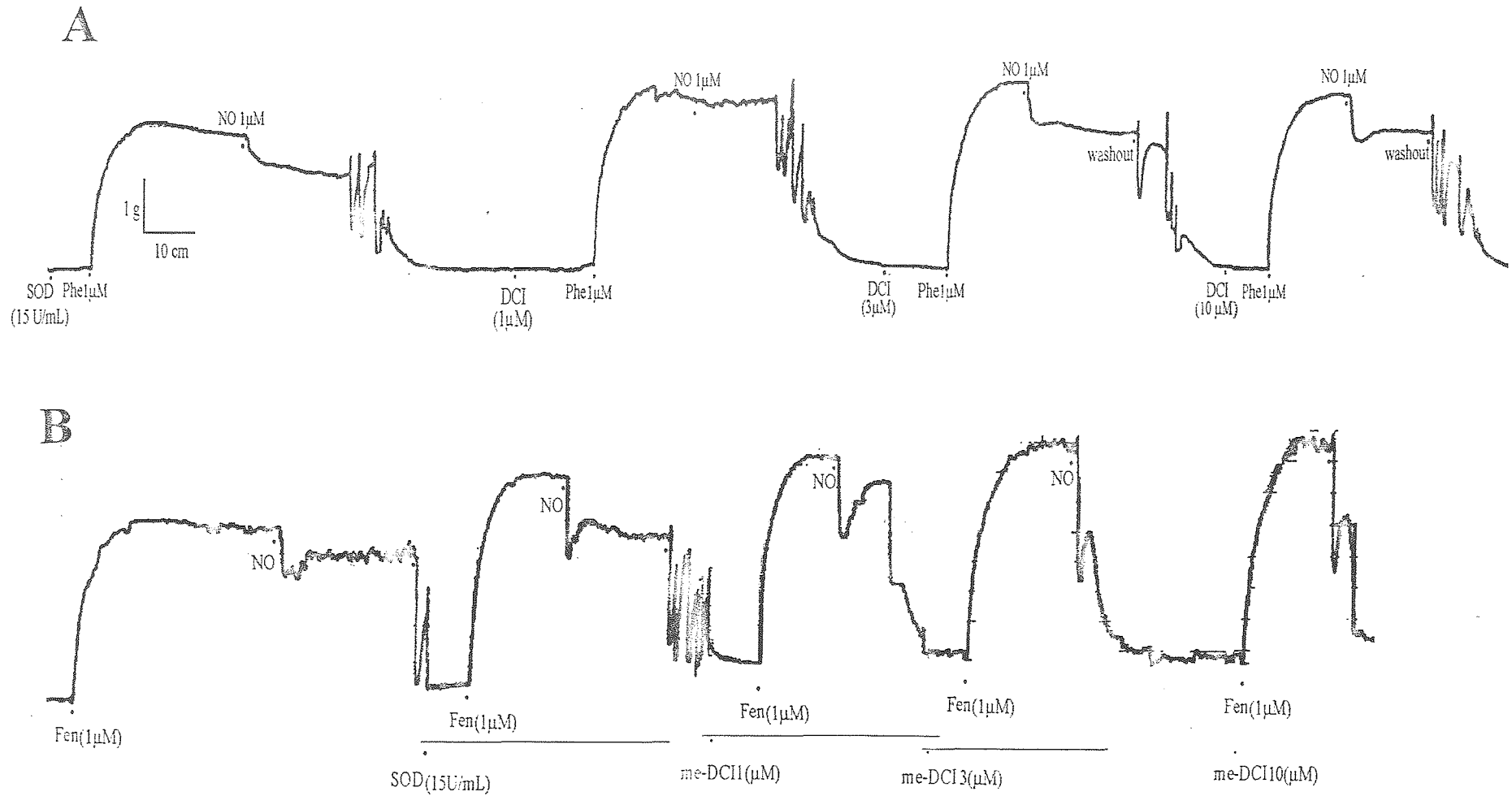


Figura 60. Efeito do D-quirositol (DCI), em A, ou pinitol (me-DCI), em B, na concentração de 1, 3 ou 10  $\mu\text{M}$  na resposta relaxante induzida por 1  $\mu\text{M}$  de nitrato de sódio (pH 2,0 NO) em anéis de aorta torácica de ratos idosos normotensos. Este efeito foi comparado com o da adição de superóxido dismutase (SOD; 15 u/mL). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 5 e 7 unidades experimentais, respectivamente. \*  $p < 0,05$  vs. 2NO, análise de variância ANOVA com correção de Tukey. #  $p < 0,05$  vs. dose anterior de me-DCI, análise de variância ANOVA com correção de Tukey.

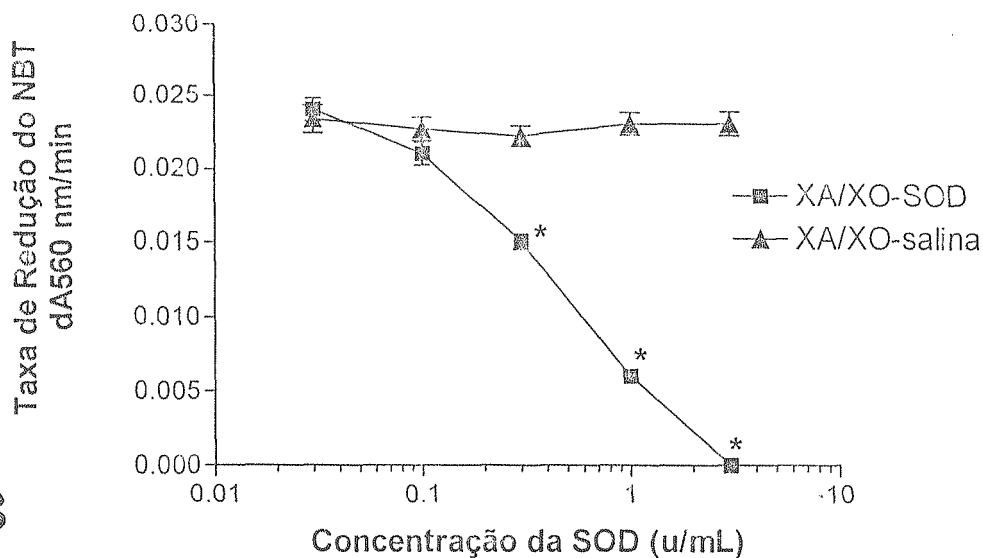


**Figura 61.** Efeito do D-chiro-inositol (A) ou metil-D-qui-ro-inositol (B) na resposta relaxante induzida por  $1\mu\text{M}$  de óxido nítrico adicionado no platô de uma contração submáxima para acetilcolina. DCI= D-chiro-inositol e me-DCI= metil-D-qui-ro-inositol.

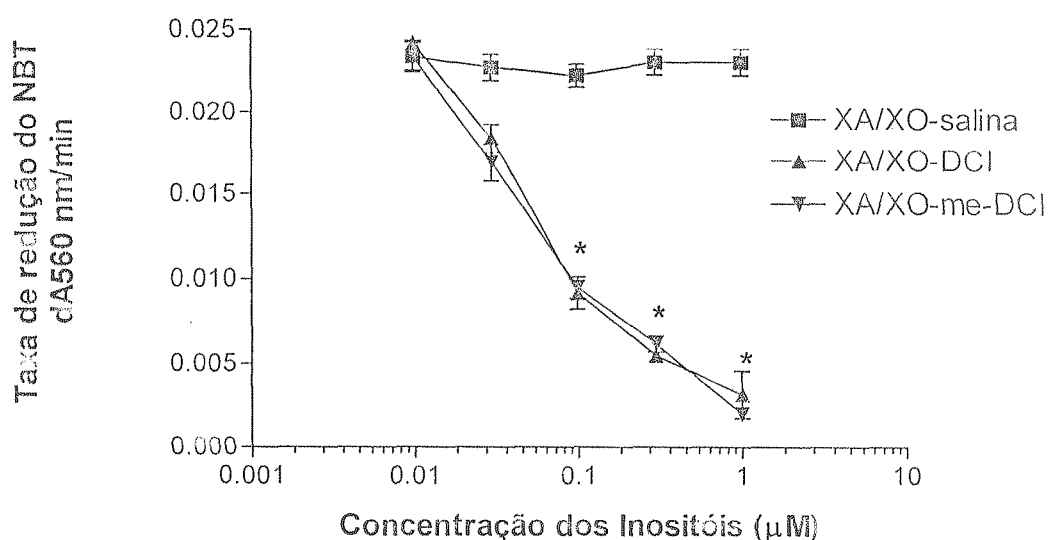
A potencial atividade *scavenger* de superóxido dos inositóis, DCI e me-DCI foi avaliada pela capacidade de inibir a redução do azul de nitrotetrazólio num sistema gerador de superóxido (xantina/xantina oxidase). Na concentração de 1 U/mL a taxa de redução do azul de nitrotetrazólio foi de  $0,006 \pm 0,0003$  comparado com  $0,023 \pm 0,0008$  ( $p < 0,05$ ) nos tubos onde a reação acontecia na ausência de SOD-1. A adição de SOD na concentração máxima utilizada (3 U/mL) zerou a reação de redução do azul de nitrotetrazólio (NBT), enquanto no mesmo período a taxa de reação nos tubos controle foi de  $0,023 \pm 0,0008$  ( $p < 0,05$ ) nos tubos onde a reação acontecia na ausência de SOD-1 (Figura 62a). A adição dos inositóis também foi capaz de diminuir a taxa de redução do NBT. Nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1  $\mu\text{M}$  estes compostos inibiram a reação de maneira significativa. A taxa de redução do NBT no controle foi de  $0,0227 \pm 0,0008$ ,  $0,0222 \pm 0,0008$  e  $0,023 \pm 0,0008$ . Nos tubos contendo DCI (0,1, 0,3 e 1  $\mu\text{M}$ ) as taxas respectivas foram de  $0,0095 \pm 0,0009$  ( $p < 0,05$ ),  $0,0055 \pm 0,00040$  ( $p < 0,05$ ) e  $0,0032 \pm 0,0014$  ( $p < 0,05$ ). Nos tubos contendo me-DCI as taxas foram respectivamente de  $0,0092 \pm 0,0009$  ( $p < 0,05$ ),  $0,0062 \pm 0,0005$  ( $p < 0,05$ ) e  $0,0020 \pm 0,0003$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 62b).

A potencial atividade *scavenger* de superóxido dos inositóis, DCI e me-DCI foi avaliada pela capacidade de inibir a redução do azul de nitrotetrazólio num sistema gerador de superóxido (xantina/xantina oxidase). Na concentração de 1 U/mL a taxa de redução do azul de nitrotetrazólio foi de  $0,006 \pm 0,0003$  comparado com  $0,023 \pm 0,0008$  ( $p < 0,05$ ) nos tubos onde a reação acontecia na ausência de SOD-1. A adição de SOD na concentração máxima utilizada (3 U/mL) zerou a reação de redução do azul de nitrotetrazólio (NBT), enquanto no mesmo período a taxa de reação nos tubos controle foi de  $0,023 \pm 0,0008$  ( $p < 0,05$ ) nos tubos onde a reação acontecia na ausência de SOD-1 (Figura 62a). A adição dos inositóis também foi capaz de diminuir a taxa de redução do NBT. Nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1  $\mu$ M estes compostos inibiram a reação de maneira significativa. A taxa de redução do NBT no controle foi de  $0,0227 \pm 0,0008$ ,  $0,0222 \pm 0,0008$  e  $0,023 \pm 0,0008$ . Nos tubos contendo DCI (0,1, 0,3 e 1  $\mu$ M) as taxas respectivas foram de  $0,0095 \pm 0,0009$  ( $p < 0,05$ ),  $0,0055 \pm 0,00040$  ( $p < 0,05$ ) e  $0,0032 \pm 0,0014$  ( $p < 0,05$ ). Nos tubos contendo me-DCI as taxas foram respectivamente de  $0,0092 \pm 0,0009$  ( $p < 0,05$ ),  $0,0062 \pm 0,0005$  ( $p < 0,05$ ) e  $0,0020 \pm 0,0003$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 62b).

A



B



**Figura 62.** Em (A) é mostrado o efeito do controle positivo a enzima superóxido dismutase (SOD) nas concentrações de 0,03 a 3 U/mL também comparado com veículo. Em (B) é mostrado o efeito dos inositóis D-quirositol (DCI) e pinitol (Me-DCI) na taxa de redução do nitrato de azul de tetrazólio (NBT- do inglês *nitroblue tetrazolium*) quando adicionados aos tubos de reação, em conjunto com os reagentes xantina e xantina oxidase (XA/XO), nas concentrações de 0,01 a 1 µM comparado com o efeito da adição isovolumétrica do veículo dos mesmos (A). \*  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer para medidas repetidas vs. veículo.

## 5. Discussão

O endotélio é um importante modulador do tônus e reatividade do músculo liso vascular (Furchgott e Zawadzi, 1980), e existe um consenso generalizado que a disfunção endotelial pode contribuir para complicações vasculares de fatores de risco cardiovascular, como diabetes, senescência, hipertensão, entre outros (Vriese *et al.*, 2000).

O modelo de diabetes aloxânica tanto no rato como no coelho, é caracterizado por significativa disfunção endotelial, medida como uma diminuição da resposta vasorelaxante endotélio-dependente na vigência de uma resposta inalterada para um agente agonista com ação direta no músculo liso vascular (Azadzoï e de Tejada, 1989, Tesfamariam, *et al.*, 1993, Costa e Forti e Fonteles, 1998).

Extensas experiências conduzidas em seres humanos apontam a disfunção endotelial como fenômeno precoce no curso de complicações vasculares como aterosclerose, por exemplo. (Ludmer, *et al.*, 1986).

No entanto, o que ainda não está totalmente estabelecido é quais leitos vasculares ou quais fatores endoteliais podem ser implicados nesta disfunção. Kiff e colaboradores, por exemplo, demonstraram que apesar do efeito de vasodilatadores endotélio-dependente e endotélio-independentes na pressão arterial de ratos diabéticos não anestesiados estar normal quando comparada com euglicêmicos, a resposta destes agonistas varia em diferentes leitos vasculares quando estudados isoladamente (Kiff *et al.*, 1991). Tais diferenças refletem, pelo menos em parte, diferenças na contribuição de vários fatores relaxantes derivados do endotélio em diferentes leitos vasculares (Nagao, Illiano e Vanhoutte, 1992; Zygmunt, Ryman e Högestätt, 1995). Por exemplo, o relaxamento endotélio-dependente à acetilcolina na artéria femoral é quase que totalmente dependente de óxido nítrico, enquanto outro fator relaxante derivado do endotélio, principalmente o EDHF, tem um papel importante na artéria mesentérica (Zygmunt, Ryman e Högestätt, 1995).

Os principais fatores de risco identificados nos nossos animais foram hiperglicemia persistente, leve dislipidemia com índice aterogênico aumentado, revelando maior concentração de apolipoproteínas contendo LDL, reconhecido fator de



risco para disfunção endotelial principalmente na forma oxidada. Pritchard e cols, (1995) e Vergnani e cols. (2000), demonstraram que, por exemplo que o LDL oxidado pode causar desacoplamentos do NOS e diminuir a captação de L-arginina.

Estes achados, dos fatores de risco encontrados em nossos animais, corroboram com os descritos por Kobayashi e Kamata (1999) que relatam aumento no colesterol LDL e diminuição da atividade da superóxido dismutase na aorta de ratos diabéticos já na quarta semana de diabetes. Estes fatores podem ser responsáveis pelo leve incremento pressórico observado nestes animais, uma vez que em conjunto com glicação não enzimática levam a desacoplamento da NOS e também consumação de óxido nítrico, com diminuição da síntese e liberação, além da disponibilidade e atividade desta molécula.

O tratamento oral com ácido lipóico, ou rutina bloqueia este incremento pressórico. Este efeito pode dever-se a dois fenômenos distintos, quais sejam, uma ação direta destes agentes sobre fatores causais importantes como ânion superóxidos, peroxinitrito, inibição de glicação avançada, etc. Achados similares foram descritos para ácido lipóico no modelo de hipertensão Doca-sal, na qual a administração oral de ácido lipóico bloqueia o desenvolvimento da hipertensão em modelos animais de resistência insulínica (Jacob *et al.*, 1996; Midaoui, 2003).

No caso da rutina, além de sua atividade antioxidante (Zhao *et al.*, 2003). Bloqueio da glicação não-enzimática (Nagasawa, *et al.*, 2003 a e b; Odetti *et al.*, 1990), atividade hipoglicemiante (Vessal *et al.*, 2003), inibição da via da aldose redutase (Nagasawa, *et al.*, 2003), possui também efeito vasorelaxante direto *in vitro* (Duarte, *et al.*, 1993 a e b). Além do mais, em animais diabéticos por estreptozotocina, a rutina foi capaz de inibir a glicação de proteínas no músculo esquelético, rim e plasma e este efeito foi correlacionado também com diminuição do estresse oxidativo nestes animais. A concentração de N(ε)-frutoselisina, um marcador precoce de glicação, no músculo e rim, está significativamente aumentada no diabetes e é diminuída de maneira significativa pelo tratamento dos ratos com rutina. Produtos de glicação avançada (AGEs) em proteínas do soro e rim também foram reduzidas em ratos tratados com rutina. A suplementação dietética com rutina também inibiu, de maneira menos potente, a atividade da aldose redutase nestes animais (Nagasawa *et al.*, 2003b). Gryglewski e

colaboradores (1984) demonstraram a atividade antitrombótica e trombolítica da quercetina e rutina as quais envolvem uma ação inibitória sobre a lipoxigenase e a ciclooxigenase.

O tratamento com rutina, também, diminui significativamente o índice aterogênico e os níveis glicêmicos, como também relatado por Versal e colaboradores (2003) e Nuraliev e Avezov, 1992. Vessal, Hemmati e Vasei (2003), relataram o efeito hipoglicemiante significativo da quercetina em ratos diabéticos por estreptozotocina sem afetar os níveis glicêmicos de animais normoglicêmicos além de melhorar a tolerância à glicose em testes específicos. Ademais diminui os níveis de colesterol e triglicérides significativamente. Estes dados corroboram com os achados prévios de Nuraliev e Avezov (1992) em animais diabéticos por aloxana, nos quais a quercetina além de efeito hipoglicemiante diminuiu os níveis de colesterol e LDL.

A resposta endotélio-dependente da aorta e leito mesentérico de ratos diabéticos está diminuída em nossos experimentos com taxas de disfunção acima de 50%, o que está de acordo com dados da literatura (Angulo *et al.*, 1998 e Vallejo *et al.*, 2000).

Nos anéis de aorta torácica a disfunção do endotélio foi prevenida pelo tratamento oral com rutina, mas não com ácido lipóico. Uma vez que os níveis glicêmicos destes animais eram comparáveis e não havia severa dislipidemia em nenhum dos grupos, este resultado nos sugere que a atividade antioxidante *per se* pode não ser condição *si ne qua non* para prevenção da disfunção endotelial. Uma peculiaridade da rutina em relação ao ácido lipóico, além das já citadas anteriormente, é a sua atividade antiinflamatória, uma vez que a doença macrovascular é considerada um processo inflamatório. (Shimokawa, 1999). O tratamento oral, com rutina, durante 4 semanas, foi capaz de prevenir a disfunção endotelial em ratos diabéticos por aloxana de maneira independente dos níveis glicêmicos desses animais.

Por outro lado, no leito vascular arteriolar mesentérico ambos os compostos foram eficazes na prevenção parcial do dano endotelial secundário ao diabetes revelando talvez uma maior importância do estresse oxidativo nos leitos de resistência.

A ausência de diferença entre as curvas de concentração-resposta do nitrovasodilatador revela que o mecanismo de ação destes agentes é específico e direcionado ao endotélio. Além do mais, permite concluir que o maquinário contrátil do músculo liso vascular não é afetado pelo diabetes mellitus, ou seja, não parece haver dano ao músculo liso vascular neste modelo experimental

De maneira similar no outro modelo de disfunção endotelial utilizado a senescência, houve um pequeno incremento pressórico no grupo senescente não tratado em comparação ao controle jovem de mesma idade e sexo. Esta leve hipertensão foi acompanhada de pequena elevação nos níveis glicêmicos, provável sinal de resistência insulínica senil.

O tratamento oral dos ratos por 1 mês com ácido lipóico ou rutina atenua parcialmente a disfunção endotelial tanto nos anéis de aorta como no leito vascular mesentérico dos ratos senescentes.

Por outro lado, apesar da atividade insulina-símile descrita para os inositóis (Larner e Huang, 1994) os animais tratados por via oral com estes compostos não apresentaram diminuição significativa de seus níveis glicêmicos. Isto provavelmente se deve ao fato da meia-vida da droga ser curta (<2 horas) e ao intervalo entre última dose e coleta de sangue ser muito longo (8-12 horas) e que os efeitos hipoglicemiantes destes duram no máximo três horas (Huang *et al.* 1993). Outra explicação provável é que o modelo de diabetes utilizados em nossos experimentos (diabetes tipo 1) não é o modelo para o qual estas drogas são indicadas, uma vez que sensibilizam os tecidos para a ação da insulina. Estes inositóis tem ação mais evidente na vigência da resistência insulínica (diabetes tipo 2), pois além do “bypass” do receptor da insulina e mimetização de algumas de suas ações, estes compostos também sensibilizam os tecidos a este hormônio (Ortmeyer *et al.*, 1991 e 1995; Nestler *et al.* 1999). Por exemplo, a administração de D-qui-ro-inositol a ratos com diabetes do tipo 2 induzida por estreptozotocina (Ortmeyer *et al.*, 1993), macacos Rhesus (Ortmeyer *et al.*, 1995) e humanos (Larner *et al.*, 1998; Larner, 2002) efetivamente diminui a hiperglicemia, trigliceridemia e melhora a utilização da glicose.

Apenas o DCI foi capaz de diminuir significativamente a hipertrigliceridemia apresentada em todos os grupos de animais diabéticos. A ausência de efeito do metil-D-quirositol, que *in vivo* é extensamente metabolizado em D-quirositol (Ostlund e Sherman, 1996), revela, em conjunto com a tendência do grupo controle diabético de retornar a níveis de controle não-diabético, que este efeito deve ter sido devido a uma recuperação espontânea da hipertrigliceridemia.

No entanto, ambos os compostos diminuíram os índices aterogênicos de maneira significativa. Este efeito pode estar associado à melhora do metabolismo da glicose induzida por estes compostos com ativação de enzimas limitantes do metabolismo oxidativo da glicose, indução de lipogênese e glicogênese e aumento da captação de ácidos graxos livres (Larner e Huang, 1999).

O tratamento dos ratos diabéticos pela aloxana com DCI não preservou significativamente a função endotelial nos anéis de aorta, apesar de apresentar uma tendência. Os ratos tratados com me-DCI no entanto, apresentaram uma disfunção endotelial significativa. Esta discrepância pode dever-se a uma amostragem pequena o suficiente para não permitir a distinção clara entre o grupo tratado e controle. Alternativamente, como o me-DCI é mais lipossolúvel talvez tenha sofrido maior absorção e biodisponibilidade, mesmo a nível intracelular.

Por outro lado, no leito vascular mesentérico ambos os compostos preveniram a disfunção endotelial talvez refletindo uma maior concentração no sítio de absorção e/ou maior sensibilidade deste tecido à ação destes compostos, uma vez que o grau de disfunção endotelial foi maior neste tecido em relação à aorta.

Novamente, a resposta aos nitrovasodilatadores não diferiu entre grupos, mostrando que o efeito preventivo na disfunção endotelial não está relacionado a uma melhora inespecífica da reatividade vascular.

Vale a pena ressaltar que em todos esses experimentos, de avaliação da função/disfunção endotelial *in vitro*, os tecidos foram mantidos em solução contendo indometacina (10 $\mu$ M) e que, portanto, a participação de prostanóides vasodilatadores no fenômeno é improvável. No entanto a possibilidade de que estes compostos, como a

rutina, por exemplo, que possui atividade inibitória da COX relatada (Gryglewski *et al.*, 1984), possam diminuir *in vivo* a síntese de prostanóides vasoconstritores (PGD<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>) e de superóxido derivado da atividade da COX (Witt *et al.*, 1993) e assim preservar a função endotelial não foi descartada.

A próxima etapa do estudo foi avaliar o efeito direto dos agentes antioxidantes e dos componentes do mediador putativo da insulina na resposta endotélio-dependente em animais com disfunção endotelial estabelecida. Nesse conjunto de experimentos os efeitos da rutina, biflavanol com atividade antioxidante mista (extra e intracelular) foi comparado com os da catequina uma monoflavona (flavan-3-ol) com atividade antioxidante extracelular semelhante à vitamina C (Fukuhara *et al.*, 2003).

A catequina não melhorou a resposta endotélio-dependente em nenhum dos tecidos estudados. Talvez porque, ao contrário da rutina, este composto sofre de auto-oxidação considerável em solução (Galati *et al.*, 2002), principalmente na presença de altas concentrações de oxigênio como as apresentadas na solução nutritora. Corroborando com esta hipótese, de que a catequina age como pró-oxidante, a disfunção endotelial no grupo pré-tratado com catequina foi maior do que no grupo não tratado.

Usando esta mesma abordagem, mostrou-se que nem o ácido lipóico e nem o GSH são capazes de reverter agudamente a disfunção endotelial dos tecidos estudados, i.e., anéis de aorta torácica e leito arteriolar mesentérico. No entanto, uma tendência a inibição foi observada sem, contudo mostrar significância estatística. Talvez em concentrações maiores ou com um número maior de observações seja possível observar diferenças significativas.

A rutina mostrou-se eficiente em reverter agudamente a disfunção endotelial nos tecidos estudados. Estes dados são reforçados pelos achados de Abeywardena e cols. (2001), que demonstraram proteção da resposta endotélio dependente em ratos hipertensos e bloqueio de vasoconstrição paradoxical induzida por acetilcolina.

A remoção mecânica do endotélio nos anéis de aorta torácica bloqueou o incremento da resposta induzida pela rutina. Desta forma, o sítio provável de ação da rutina é o próprio endotélio vascular.

A hiperpolarização endotélio dependente das células do músculo liso vascular por ação do EDHF, é abolida por concentrações extracelulares de potássio maiores que 25mM (Cheu e Suzuki, 1989). No entanto, a reversão da disfunção endotelial induzida pela rutina é a mesma num tecido pré-contraído com fenilefrina ou  $K^+$  60mM. Portanto, uma relação entre o efeito da rutina e incremento da via do EDHF (síntese, liberação, aumento da sensibilidade do tecido, proteção de degradação e /ou inativação, etc) é improvável. A resposta mediada pelo EDHF também é bloqueada pelo uso da combinação de apamina (inibidor de canais de potássio  $Ca^{2+}$ -sensíveis de baixa condutância) e caribdotoxina, que inibe canais de potássio  $Ca^{2+}$ -sensíveis de condutância intermediária e alta (Zygmunt e Hoggstatt,1996; Corriu *et al.*,1996). Reforçando o dado obtido em tecido pré-contraído com  $K^+$ 60mM, o pré-tratamento dos tecidos com apamina e caribdotoxina, em doses relatadas como eficazes no bloqueio da resposta mediada pelo EDHF, não altera o efeito da rutina quando comparado com grupos tratados apenas com rutina.

A incubação dos tecidos com L-NAME, inibidor da NOSe ou ODQ bloqueador da GC solúvel inibe a reversão da disfunção endotelial provocada pela rutina. Este dado corrobora com uma provável potenciação da via NO-GMPc como mecanismo de ação provável da rutina. Neste sentido este composto foi demonstrado aumentar a disponibilidade do NO e inibir inespecificamente fosfodiesterases (Buetz *et al.*,1990; Ajay *et al.*, 2003).

A possibilidade de aumento da síntese e liberação de prostaciclina participar do incremento da resposta endotélio-dependente induzida pela rutina foi descartada, pois todos os experimentos foram realizadas na presença de indometacina (10 $\mu$ M).

Por outro lado, a infusão de GSH ou ácido lipóico não foi eficaz em reverter a disfunção endotelial no leito arteriolar mesentérico. Apesar de haver tendência a melhora, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa.

Este dado reforça a idéia de que a rutina pode estar agindo por um mecanismo que independe de seu efeito antioxidante, uma vez que o ácido lipóico, também um antioxidante misto e quelante de metal, não teve eficácia na reversão aguda da disfunção

endotelial. Por outro lado revela que o estresse oxidativo deve ser muito mais importante para instalação da disfunção endotelial do que para a sua manutenção.

Os principais componentes do mediador putativo da ação da insulina, D-quiroinositol (DCI) e metil-D-quiro-inositol (me-DCI) também foram testados. Para avaliar uma provável ação direta na vasculatura que incrementasse a resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina.

Nos tecidos estudados inicialmente aorta e leito mesentérico, apenas o me-DCI foi capaz de reverter agudamente a disfunção endotelial observada nos tecidos não tratados. Todavia, o D-quiroinositol apresentou uma clara tendência à reversão da disfunção endotelial que não se mostrou significativa. A maior eficácia do me-DCI pode estar relacionada à sua maior lipossolubilidade e sua eficácia pode estar relacionada a adequação do metabolismo intracelular às altas concentrações de glicose e seu potencial efeito *scavenger* de superóxido, que culminam com desacoplamento da NOSe. Da mesma forma, o efeito do nitrovasodilatador, nitroprussiato de sódio não é afetado pelo pré-tratamento com os inositóis revelando o endotélio como sítio de ação mais provável.

Nos anéis de aorta e leito arteriolar mesentérico de ratos senescentes, o padrão de resposta foi similar aos observados nos animais diabéticos. Dentre os agentes utilizados, apenas a rutina reverteu significativamente a disfunção endotelial observada nos animais controle não tratados. Ácido lipóico e GSH apresentaram tendência a reversão que não foi estatisticamente significativa. Novamente, este efeito da rutina não deve ser dependente apenas de sua atividade antioxidante uma vez que GSH e ácido lipóico tiveram apenas um efeito parcial. Este efeito da rutina pode dever-se à facilitação do relaxamento endotélio-dependente através de mecanismos como inibição inespecífica de fosfodiesterases do AMPc e GMPC (Buetz *et al.*, 1980), inibição da proteína quinase C (Duarte *et al.*, 1993a e b). Ajay *et al.* (2003), por exemplo, relata um aumento na liberação de NO e prostaciclina induzida pela rutina. O aumento na liberação de prostaciclina não pode ser responsável pelo efeito da rutina, uma vez que os experimentos foram realizados com solução nutritiva enriquecida com indometacina (10 $\mu$ M). A resposta endotélio-independente, induzida pelo nitrovasodilatador não foi

endotelial. Por outro lado revela que o estresse oxidativo deve ser muito mais importante para instalação da disfunção endotelial do que para a sua manutenção.

Os principais componentes do mediador putativo da ação da insulina, D-quirositol (DCI) e metil-D-quirositol (me-DCI) também foram testados. Para avaliar uma provável ação direta na vasculatura que incrementasse a resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina.

Nos tecidos estudados inicialmente aorta e leito mesentérico, apenas o me-DCI foi capaz de reverter agudamente a disfunção endotelial observada nos tecidos não tratados. Todavia, o D-quirositol apresentou uma clara tendência à reversão da disfunção endotelial que não se mostrou significativa. A maior eficácia do me-DCI pode estar relacionada à sua maior lipossolubilidade e sua eficácia pode estar relacionada a adequação do metabolismo intracelular às altas concentrações de glicose e seu potencial efeito *scavenger* de superóxido, que culminam com desacoplamento da NOSe. Da mesma forma, o efeito do nitrovasodilatador, nitroprussiato de sódio não é afetado pelo pré-tratamento com os inositolis revelando o endotélio como sítio de ação mais provável.

Nos anéis de aorta e leito arteriolar mesentérico de ratos senescentes, o padrão de resposta foi similar aos observados nos animais diabéticos. Dentre os agentes utilizados, apenas a rutina reverteu significativamente a disfunção endotelial observada nos animais controle não tratados. Ácido lipóico e GSH apresentaram tendência a reversão que não foi estatisticamente significativa. Novamente, este efeito da rutina não deve ser dependente apenas de sua atividade antioxidante uma vez que GSH e ácido lipóico tiveram apenas um efeito parcial. Este efeito da rutina pode dever-se à facilitação do relaxamento endotélio-dependente através de mecanismos como inibição inespecífica de fosfodiesterases do AMPc e GMPC (Buetz *et al.*, 1980), inibição da proteína quinase C (Duarte *et al.*, 1993a e b). Ajay *et al.* (2003), por exemplo, relata um aumento na liberação de NO e prostaciclina induzida pela rutina. O aumento na liberação de prostaciclina não pode ser responsável pelo efeito da rutina, uma vez que os experimentos foram realizados com solução nutritiva enriquecida com indometacina (10 $\mu$ M). A resposta endotélio-independente, induzida pelo nitrovasodilatador não foi



alterada pela rutina revelando o endotélio como provável sítio de ação de coelhos diabéticos. A infusão de GSH aumentou a resposta mas não de maneira significativa.

Um mecanismo que pode participar da diminuição do relaxamento endotélio-dependente associado com o envelhecimento é a geração de excesso de radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio. Isto pode ser devido a uma redução na defesa antioxidante natural que parece estar associada com a senescência. A nível vascular a interação de NO com radicais livres contribui para a regulação do tônus vascular. Assim, peroxidação lipídica e produtos da peroxidação, os quais parecem aumentar com a idade, podem participar do desenvolvimento de doenças vasculares, tanto quanto do processo de envelhecimento. A lipoperoxidação e produtos da peroxidação que estão aumentados na senescência, podem ter papel importante nas alterações vasculares associadas a senescência. Pelo menos, um aumento do estresse oxidativo tem sido observado em tecidos e órgãos de animais e seres humanos senescentes e este fenômeno é geralmente associado com disfunção e morte celular (Anglade *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998; Lenaz, 1998; Naoi e Maruyama, 1999). Portanto a eficácia parcial de GSH e ácido lipóico e a prevenção da disfunção induzida por rutina podem dever-se as suas fortes atividade antioxidantes, pelo menos parcialmente.

Gryglewski, Palmer e Moncada demonstraram que o ânion superóxido rapidamente degrada NO diminuindo sua biodisponibilidade (Gryglewski *et al.*, 1986).

Os dois agentes, rutina e ácido lipóico, podem aumentar a disponibilidade de NO por diminuir o estresse oxidativo e consequente geração de superóxido e por preservar NADH e tetrahydrobiopterina no estado reduzido para servirem de cofator para a NOSe. O GSH apesar de ser potente agente redutor e poder gerar nitrosotióis, não penetra bem nas células, e promoveu uma melhora apenas parcial..

Recentemente, Prasad e cols. (1999), demonstram que o glutathion reverte a disfunção endotelial e aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico (Prasad *et al.*, 1999).

Os mecanismos potenciais pelos quais os antioxidantes ácido lipóico, GSH e rutina melhoraram a função vascular está provavelmente associada a seus efeitos

protetores sobre o NO e a atividade da enzima NOSe. GSH por exemplo, foi demonstrado aumentar a síntese de NO por células endoteliais em cultura (Ghigo *et al.*, 1993; Hecker *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 1990).

A disponibilidade de tetrahydropterina, cofator da NOSe, depende do estado redox intracelular, e deficiência deste cofator desacopla a NOSe e a mesma passa a produzir superóxido ao invés de NO. A incubação de GSH com anéis de aorta de ratos e coelhos a concentração de tióis intracelulares e potencia o relaxamento endotélio-dependente (Hecker *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1991; Mugge *et al.*, 1991; Ghigo *et al.*, 1993; Cooke *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1998). Alguns autores demonstraram também que o captopril melhora a resposta vascular endotélio-dependente e que esse fenômeno depende de seu conteúdo tiol, uma vez que o enaprilato, também um inibidor da ECA mas destituído de tiol não afeta a função vascular endotélio-dependente (Lawson *et al.*, 1991; Goldschmidt and Tallarida, 1991).

A S-nitrosilação de resíduos cisteína resulta da adição de um grupo  $\text{NO}^+$  modifica a atividade de uma série de moléculas (Davis *et al.*, 2001). NO entanto é improvável que o NO atue diretamente no resíduo cisteína, interagindo inicialmente com  $\text{O}_2$  ou  $\text{O}_2^-$  para produzir uma espécie reativa de nitrogênio (p.ex. peroxinitrito) capaz de nitrosilar resíduos de cisteína. A nitrosilação é uma reação química, não uma reação catalisada enzimaticamente. Vários antioxidantes podem reagir com peroxinitrito e inibir suas reações de oxidação e nitrosilação (Ducrocq *et al.*, 1999). Entre os antioxidantes relatados como removedores de peroxinitrito se incluem flavanóides, como a rutina (Haenen *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001; Heijnen *et al.*, 2001), e glutathione (Mayer *et al.*, 1998). Em adição ao efeito antioxidante, o glutathione ao reagir com o peroxinitrito pode gerar compostos com propriedades citoprotetoras, nitrosotióis de baixo peso molecular com propriedade de doadores de NO de longa meia-vida (Moro *et al.*, 1995).

Tióis endógenos, compostos com um grupo sulfidril (-SH), como o GSH, podem formar derivados do NO biologicamente ativos em vários sistemas biológicos. Esses nitrosotióis têm meia-vida consideravelmente mais longas que o NO e são capazes de ativar potentemente a guanilil ciclase e parecem ser importantes intermediários na ação do NO. A Glutathione também tem participação importante na

defesa cardiovascular por suas propriedades antioxidantes. Alguns autores demonstraram também que GSH melhora a resposta de agonistas vasodilatadores endotélio-dependente e potencia também a ação antiagregantes plaquetária desses

Uma vez que as espécies reativas que caracterizam o estresse oxidativo da diabetes e senescência podem reagir e inativar o NO e também causar desacoplamento do NOSe, essa ação antioxidante do GSH é potencialmente benéfica. Uma vez que o GSH não é transportado intracelularmente inalterado, o GSH administrado de maneira exógena aumenta o potencial antioxidante extracelular e aumentar a disponibilidade de NO.

Em adição a sua atividade de “scavenger” de radicais livres, AL pode modular a bioatividade do NO endógeno pôr sua conhecida habilidade de aumentar os níveis intracelulares de glutatona (Sen *et al.*, 1997). Apesar do mecanismo ainda não estar bem esclarecido, o aumento da disponibilidade da glutatona tem mostrado aumentar a síntese de NO dentro das células endoteliais (Ghigo *et al.*, 1993). A glutatona exerce papel central na regulação do estado redox intracelular . Neste contexto, há evidências de que o estado redox intracelular tem substancial influência na atividade da NO-sintase endotelial pôr modular a disponibilidade de cofatores como a tetrahydrobiopiterina, que quando deficiente pode causar um desacoplamento (*uncoupling*) da NOS endotelial, passando a mesma a gerar ânion superóxido . Assim, por melhorar o estado redox intracelular, AL pode proteger a tetrahydrobiopiterina da oxidação, aumentando a capacidade da célula endotelial de produzir NO.

O leito vascular renal de coelhos diabéticos por aloxana apresentou resposta diminuída para os agonistas endotélio-dependentes acetilcolina e bradicinina. Estes achados confirmam os de Costa e Forti e Fonteles (1998), que encontraram disfunção endotelial já nas três primeiras semanas após a indução.

A vasodilatação endotélio-dependente está diminuída em modelos animais de diabetes experimental em artérias renais isoladas (Dai *et al.*, 1993) e no rim isolado de coelho e de rato e perfundido (Costa e Forti e Fonteles, 1998; Kamata e Hurokawa, 1997) e nas arteríolas aferentes de coelhos (Schanackenberg e Wilcox, 2001).

A infusão de rutina e ácido lipóico por uma hora reverteu a disfunção endotelial nos rins isolados. A quercetina, a forma como a rutina é absorvida, é capaz de atenuar disfunção renal e estresse oxidativo em ratos diabéticos (Anjaneyulu e Chopra, 2004). A nefropatia diabética é uma complicação microvascular importante e uma das principais causas de doença renal terminal.

Altas concentrações de glicose na solução de perfusão renal (após três horas) induzem disfunção endotelial no rim de coelho perfundido (Affonso *et al.*, 2003). Neste trabalho, de Affonso e cols., a resposta ao agonista endotélio-independente permanece inalterada, o que corrobora com nossos achados. Este efeito coloca o endotélio como provável sítio de ação da rutina e ácido lipóico.

Por outro lado Wang e colaboradores (2003) demonstraram que a vasodilatação induzida pela acetilcolina nas arteríolas renais depende tanto de NO agindo via guanilato ciclase solúvel como de um EDHF agindo via canais de  $K^+$ - $Ca^{2+}$ -sensíveis (Wang *et al.*, 2003).

A perfusão de rim de coelhos diabéticos com solução contendo 60mM de  $K^+$  extracelular para incrementar o tônus não altera a resposta inibitória da disfunção endotelial induzida pela rutina quando comparada com a obtida em tecidos pré-contráidos com fenilefrina. Por outro lado, tanto o bloqueio da NOS como da guanilato ciclase solúvel bloqueiam significativamente a melhora da resposta endotélio-dependente induzida pela rutina. Estes dados reforçam a idéia de que a melhora da função endotelial induzida pela rutina é dependente da via NO-GMPc, talvez pelo aumento da síntese, disponibilidade e bioatividade do NO.

A rutina também restaurou a resposta endotélio com anéis de aorta torácica de coelhos diabéticos. A disfunção endotelial na aorta de coelhos diabéticos por aloxana foi descrita primeiramente por Abiru e colaboradores (1990) e foi associada à diminuição de níveis de nucleotídeos cíclicos na aorta. A resposta ao doador de NO, nitroprussiato de sódio não foi alterada pelo diabetes e portanto, uma diminuição significativa da via GMPc dependente e improvável.

Estes fenômenos de aumento do estresse oxidativo acontecem de maneira associada à diminuição da capacidade do organismo diabético de se contrapor aos mesmos. Por exemplo, Yue e colaboradores (2003) demonstraram que as concentrações do principal agente redutor intracelular, o GSH está reduzida significativamente tanto na aorta como nos tecidos oculares de ratos diabéticos e que esta redução acontece logo após 1 semana da indução da diabetes e se mantém até a oitava semana (Yue *et al.*, 2003).

Por outro lado, o dano oxidativo foi sugerido como um fator que contribui no desenvolvimento e complicações do diabetes. (Wohaleb e Godin, 1987; Baynes, 1991; Tesfamariam, 1994; Giugliano, Ceriello e Paolisso, 1996). Por exemplo, alguns estudos relataram a atividade diminuída de enzimas antioxidantes, níveis diminuídos de glutathione (GSH) intracelular e sérico, aumento nos marcadores celulares de peroxidação de lipídio no córtex renal de animais diabéticos e reversão destas alterações através da suplementação dietética com Vitamina E, ácido  $\alpha$ -lipóico ou GSH reduzido (Jachec *et al.*, 2002, Dincer *et al.*, 2002, Ueno *et al.*, 2002). Uma relação causal entre stress oxidativo e a disfunção endotelial durante o diabetes é apoiada pelos resultados de transferência de gene e expressão aumentada de isoformas de superóxido dismutase reverterem a disfunção endotelial na aorta diabética (Zanetti *et al.*, 2001) e pelo fato da disfunção endotelial ser acompanhada pela expressão diminuída de SOD em aortas de ratos diabéticos. (Kobayashi e Kamata, 1999). Além disso, Ohishi e Carmines (1995) demonstraram que a SOD-1 restaura a resposta ao óxido nítrico em arteríolas renais. Da mesma forma, alguns autores relataram recentemente que radicais de oxigênio contribuem no aumento do tônus vascular basal, na retroalimentação tubuloglomerular, na infiltração de monócito/macrófagos e no relaxamento endotélio-dependente prejudicado no rim diabético (Park *et al.*, 2001; Schnackenberg, 2001).

Outro fenômeno agravante no diabetes é a diminuição das defesas antioxidantes. Vários autores tem mostrado uma marcante diminuição nos mecanismos de defesa antioxidantes no diabetes. Esses incluem glutathione, superóxido dismutase, ácido ascórbico, ácido úrico e vitamina E (Wolff e Dean, 1987; Arai *et al.*, 1987; Jain, 1989; Del Boccio, 1990). Essa diminuição na atividade dos sistemas antioxidantes pode significar um aumento na sensibilidade da célula endotelial ao estresse oxidativo.

Heitzel e colaboradores (2001) demonstraram que doses terapêuticas de AL atenuam a disfunção endotelial em pacientes diabéticos pôr aumento da vasodilatação mediada pôr óxido nítrico (NO) produzido no endotélio. No entanto AL não obteve efeitos significantes na vasodilatação endotélio-independente induzida por nitroprussiato de sódio. Além disso, os efeitos banéficos de AL foram bloqueados pelo inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), L-NMMA, indicando que na presença de AL a atividade da via L-arginina-NO está aumentada (Heitzel *et al.*, 2001).

Obrosova e colaboradores (2003) demonstraram que o ácido lipóico preveniu parcialmente ou completamente as mudanças induzidas pelo diabetes na fisiologia renal. O ácido  $\alpha$ -lipóico causou uma diminuição de marcadores de lipoperoxidação no córtex renal, e preveniu parcialmente a acumulação de malondialdeído (MDA, marcador de lipoperoxidação), reverteu a depleção de GSH e ácido ascórbico (AA) induzida pela diabetes e aumentou as taxas de GSSH/GSH e de DHAA/AA. Estudos prévios dos efeitos do ácido  $\alpha$ -lipóico nas concentrações de MDA e GSH no córtex renal, também confirmam estes achadas (Melhem *et al.*, 2002; Trachtman *et al.*, 1995). O efeito antioxidante do ácido  $\alpha$ -lipóico é também manifestado pela de diminuição atividade extramitocondrial da NADH-oxidase e por uma supraregulação das enzimas da defesa antioxidante, i.e., SOD, GSSG redutase, e GSH transferase. O efeito na NADH-oxidase provavelmente está relacionado ao importante papel do ácido  $\alpha$ -lipóico na sinalização redox (Roy *et al.*, 1997; Sen, 1998).

A adição de *scavengers* de superóxido como SOD ou tempol são capazes de restaurar a resposta endotélio-dependente na aorta (Hattori *et al.*, 1991) e nas arteríolas renais (Schnackenberg e Wilcox, 2001) Portanto, a rutina e o ácido lipóico por sua capacidade de antioxidante mista (extra e intracelular) podem eficientemente reduzir o estresse e melhorar a resposta endotélio-dependente. O GSH por sua limitada capacidade de entrar na célula tem eficiência apenas parcial.

A melhora da resposta endotélio dependente na aorta de coelho é independente do aumento da síntese do EDHF uma vez que permanece inalterado em meio contendo 60mM [K<sup>+</sup>] e/ou na presença da mistura caribdotoxina-apamina.

Por outro lado, a infusão de L-NAME ou ODQ bloqueia a melhora da resposta endotélio-dependente induzida por rutina revelando a dependência da via NO-GMPc nesse fenômeno. Pelo menos, a participação de outros mediadores derivados do endotélio como prostaciclina ou EDHF na reversão da disfunção endotelial está descartada, uma vez que nesta situação, i.e., bloqueio da NOS ou GC, as vias do EDHF e prostaciclina estão liberadas.

Nossos achados corroboram com a idéia de que a rutina potencie a resposta endotélio-dependente via mecanismo NO-GMPc uma vez que este fenômeno é sensível ao bloqueio desta via por L-NAME e ODQ, respectivamente. A participação de canais de potássio, quer cálcio-dependente quer ATP-dependente parece não ser importante uma vez que nem a combinação carabdotoxina-apamina, nem glibenclamida, nem meio contendo altas concentração de potássio afetam este fenômeno.

A infusão de D-qui-ro-inositol ou me-DCI reverte a disfunção endotelial no leito vascular renal de coelhos diabéticos. Novamente, o me-DCI tem uma eficiência melhor e que pode ser atribuída à sua melhor permeabilidade celular.

Por outro lado, a resposta relaxante do corpo cavernoso a estímulo por campo elétrico transmural, é de natureza neuronal e o mediador liberado é o óxido nítrico. A acetilcolina agindo em receptores M2 promove relaxamento das artérias de resistência via liberação de NO endotelial.

A diabetes diminui a resposta nitrérgica neuronal Azadzoi e Saenz de Tejada, 1989) e endotélio dependente no coelho diabético por aloxana (Saenz de Tejada *et al.* 1984). A resposta dependente de EDHF também está prejudicada no diabetes (Angulo *et al.*,2003). A resposta endotélio-dependente e nitrérgica, no nosso estudo, foi significativamente inibida após quatro semanas de diabetes aloxânica.

A incubação dos tecidos com ácido lipóico ou GSH não alterou a resposta nitrérgica em nenhuma das frequências de estímulo estudadas. Estes dados confirmam os achados de Keegan, Cotter e Cameron, 2001, que demonstraram que o ácido lipóico não reverteu a resposta nitrérgica deficitária em ratos diabéticos.No entanto, estes



compostos aumentaram significativamente a resposta endotélio-dependente a acetilcolina.

A rutina potenciou a resposta nitrérgica em todas as frequências utilizadas e a resposta endotélio-dependente induzida por acetilcolina. Estes processos são dependentes da liberação do óxido nítrico e portanto, os dados discutidos até agora sustentam um incremento da disponibilidade e/ou bioatividade do NO como mecanismo potencial de ação da rutina.

Por outro lado, o *status* diabético induzido pela estreptozotocina em ratos e induzido por aloxana em coelhos resulta em marcada inibição da síntese de PGI<sub>2</sub> (Jeremy *et al.*, 1985; Sullivan *et al.*, 1998). A síntese de PGI<sub>2</sub> é estimulada pela acetilcolina em receptores muscarínicos em ratos e no homem (Jeremy *et al.*, 1986a; Jeremy *et al.*, 1986b) tanto no músculo liso dos corpos cavenosos como nos vasos sinusóides e helicinais. No entanto, uma provável potenciação desta via foi descartada, uma vez que nossos experimentos foram realizados na presença de indometacina

O bloqueio do relaxamento neurogênico e endotélio-dependente relatado em pacientes humanos diabéticos (Saenz de Tejada *et al.*, 1989) foi também observado em coelhos diabéticos por aloxana (Azadzo e Saenz de Tejada, 1992).

No modelo de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) uma série de explicações para a diminuição da função erétil no diabetes tem sido demonstrados experimentalmente, entre eles: disfunção de nervos autonômicos (Fishel *et al.*, 2001); diminuição das propriedades condutoras nervosas; alteração na liberação ou ação pós-sináptica de neurotransmissores como o óxido nítrico, p.ex. (Vernet *et al.*, 1995); funções do músculo liso alteradas (Burchardt *et al.*, 2000), disfunção endotelial (Keegan, Cotter e Cameron, 2001; Angulo *et al.*, 2003), entre outras.

A incubação com os mediadores putativos da insulina não alterou a resposta ao óxido nítrico exógeno e nem a resposta relaxante induzida pelo estímulo nitrérgico. Contudo havia uma tendência global ao incremento das respostas. O mesmo fenômeno aconteceu na resposta nitrérgica (Mian e Martin, 1995)



Estes compostos, que potenciaram a resposta endotélio-dependente em vários leitos vasculares foram avaliados para sua potencial atividade de scavenger.

Em experimentos pilotos, o incremento de tónus de anéis de aorta contraído submaximalmente induzido pelo L-NAME, foi utilizado como um medida indireto da atividade da NOS, em aorta de ratos senescentes e demonstrou-se que as mesmas foram significativamente menor de que aquela obtida em aorta de ratos jovens. Demonstrando um déficit na atividade da NOS ou ainda que neste estado a enzima já está parcialmente inibida.

Por outro lado, a incubação de tecidos com SOD potencia a resposta relaxante do NO exógeno (Palmer et al., 1987; Hattori et al., 1991. Mügge et al., 1991). Quanto maior o estresse oxidativo, menor a resposta ao NO exógeno e maior a potenciação induzida pela SOD (Hattori et al., 1991)

Os inositóis aumentam a resposta relaxante do NO exógeno de maneira semelhante a SOD (15 U/ml) e de maneira relacionada a concentração. Este efeito revela uma possível atividade *scavenger* de superóxido destes compostos.

A diminuição da taxa de redução do azul de nitrotetrazólio *in vitro* indica que este composto tem capacidade de remover ânions superóxido o que pode explicar parte de sua atividade vasoprotetora e a potenciação do relaxamento induzido pelo NO exógeno.

Estes achados são corroborados pelas recentes demonstrações do grupo do prof. Michael Brownlee, que estes inositóis diminuem a produção de superóxido mitocondrial e conseqüentes aumentos nas taxas das vias da hexosamina, aldose redutase e PKC (comunicação pessoal)

O grupo do prof. Brownlee demonstrou que a normalização da produção de superóxido mitocondrial bloqueou o dano induzido pela hiperglicemia em células do endotélio vascular (Nishikawa et al., 2000b). Nishikawa e cols. (2000b) demonstraram que altas concentrações de glicose aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio em cultura de células endoteliais da aorta de bovinos. NO reage com o  $O_2^{\bullet-}$  produzindo o forte oxidante, peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) (Huie e Padmaja, 1993).  $ONOO^{\bullet}$

pode agir como um agente que promove nitração ou oxidação e pode assim modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos.

Portanto, uma vez que o incremento da produção mitocondrial de superóxido parece ser um evento central comum na epigênese das complicações macro e microvasculares associados a uma série de fatores de risco é racional supor que compostos como os inositóis que sensibilizam os tecidos à ação da insulina e ao mesmo tempo tem atividade vasoprotetora direta possam ter efeitos benéficos no tratamento adjuvante do diabetes tipo 2. Ainda mais, compostos derivados de flavonóides com capacidade antiinflamatória, antitrombótica, inibidora da glicação não enzimática, inibidora da aldose redutase, inibidora da enzima conversora, hipoglicemiante e hipolipemiante, poderosos antioxidantes possam ser desenvolvidos para prevenir ou mesmo reverter a disfunção endotelial associada a fatores de risco cardiovasculares.

## 6. CONCLUSÕES

- O modelo de diabetes aloxânica, 4 semanas a partir da indução e a senescência apresentam disfunção endotelial nos vasos de resistência e condutância com percentual de disfunção endotelial maior que 50%;
- O tratamento oral com rutina e ácido lipóico diminuem o índice aterogênico e incremento pressórico nestes animais;
- A rutina previne a disfunção endotelial em ratos diabéticos e senescentes independente dos níveis glicêmicos nestes últimos;
- Os outros agentes antioxidantes, ácido lipóico, GSH previnem parcialmente a disfunção endotelial nos tecidos estudados
- A rutina reverte a disfunção endotelial de maneira aguda *in vitro* e este efeito é endotélio-dependente.
- A reversão da disfunção endotelial induzida pela rutina independe de incremento da via da prostaciclina ou do EDHF
- O ácido lipóico reverteu significativamente a disfunção endotelial diabética na aorta e leito mesentérico
- O me-DCI previniu após administração oral e reverteu agudamente a disfunção endotelial *in vitro* nos vasos obtidos de animais diabéticos.
- A rutina potencia a resposta nitrérgica induzida pelo choque de maneira NOS e guanilil ciclase dependente e potencia também a resposta endotélio-dependente.
- Os inositóis agem como *scavenger* de superóxido
- Os inositóis incrementam o relaxamento induzida pelo óxido nítrico de maneira significativa e dose-relacionado.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABEL, E.D.; PERONI, O.; KIM, J.K.; KIM, Y.B.; BOSS, O.; HADRO, E.; MINNEMANN, T.; SHULMAN, G.I.; KAHN, B.B. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature.*, v.409, n. 6821, p. 729-33, 2001.
- ABEYWARDENA, M.Y.; HEAD, R. Dietary polyunsaturated fatty acid and antioxidant modulation of vascular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *J.Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.65,n.2 ,p.91 - 97, 2001.
- ABIRU, T., KAMATA, K., MIYATA, N., KAZUYA, Y. Differences in vascular responses to vasoactive agents of basillary artery and aorta from rabbits with alloxan-induced diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.68, p.882 - 888, 1990.
- ABORDO EA, WESTWOOD ME, THORNALLEY PJ. Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human monocytic THP-1 cells induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunol Lett.*v. 53(1):7-13, 1996.
- ABRAMS, W.B. Pathophysiology of hypertension in older patients. *Am. J. Med.*, v.85, p.7 - 13, 1988.
- ADEAGBO, A.S. AND HENZEL, M.K. Calciumdependent phospholipase A2 mediates the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor in perfused rat mesenteric prearteriolar bed. *J. Vasc. Res.*, v.35, p.27 – 35, 1998.
- ADEAGBO, A.S. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: characterization as a cytochrome P450 1A-linked metabolite of arachidonic acid in perfused rat mesenteric prearteriolar bed. *Am. J. Hypertens*,v.10, p.763 – 771, 1997.
- AJAY, M.; GILANI, A.U.; MUSTAFA, M.R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.*, v.74, n.5, p.603-12, 2003.
- AKAMINE, E.H.; HOHMAN, T.C.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.; CASSIA, D.E.; TOSTES, R.; FORTES, Z.B. Minalrestat, an aldose reductase inhibitor, corrects the impaired microvascular reactivity in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.*, v.304, n.3, p.1236–1242, 2003.
- AKARASEREENONT, P.; MITCHELL, J.A.; BAKHLE, Y.S.; THIEMERMANN, C.; VANE, J.R. Comparison of the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. *Eur J Pharmacol.*, v.273, p.121-128, 1995.
- ALBERTINI, M.; VANELLI, G.; CLEMENT, M.G. PGI2 and nitric oxide involvement in the regulation of systemic and pulmonary basal vascular tone in the pig. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.54, p.273-278, 1996.

ALBRIGHT, A.; FRANZ, M.; HORNSBY, G.; KRISKA, A.; MARRERO, D.; ULLRICH, I.; VERITY, L.S. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. **Med Sci Sports Exerc.**, v.32, n.7, p.1345-60, 2000.

ALLEN, R.G.; TRESINI, M.; KEOGH, B.P.; DOGGETT, D.L.; CRISTOFALO, V.J. Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). **J Cell Physiol.**, v.180, n.1, p.114-22, 1999.

AMERINI, S.; MANTELLI, L.; FILIPPI, S.; LEDDA, F. Effects of aging and hypertension on vasorelaxant activity of calcitonin gene-related peptide: A comparison with other vasodilator agents. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.23, p.432-437, 1994.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.90, n.17, p.7915-22, 1993.

AMOS, A.F.; MCCARTY, D.J.; ZIMMET, P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. **Diabet Med.**, v.14, n.5, p.81-85, 1997.

ANDERSON AJ. A method for the isolation of urinary mucoproteins. **Process Biochem.** 12;56(324th Meeting),1953.

ANDERSSON DA, ZYGMUNT PM, MOVAHED P, ANDERSSON TL, HOGESTATT ED. Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na(+)/K(+) ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. **Br J Pharmacol.** v.129(7):1490-6, 2000.

ANDERSSON, K.E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol Rev.**, v.53, n.3, p.417-50, 2001.

ANDERSSON, K.E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiol Rev.**, v.75, p.191-236, 1995.

ANGLADE, P.; VYAS, S.; HIRSCH, E.C.; AGID, Y. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. **Histol Histopathol.** v.12, n.3, p.603-10, 1997.

ANGULO J, RODRIGUEZ-MANAS L, PEIRO C, NEIRA M, MARIN J, SANCHEZ-FERRER CF. Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, 358(5):529-37, 1998.

ANGULO J, CUEVAS P, FERNANDEZ A, GABANCHO S, ALLONA A, MARTIN-MORALES A, Moncada I, Videla S, Saenz de Tejada I. Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. **Biochem Biophys Res Commun.** Dec 26;312(4):1202-8, 2003.

ANGUS, J.A.; COCKS, T.M. Endothelium-derived relaxing factor. **Pharmacol. Ther.**, v.41, p.303-351, 1989.

ARAI, K.; LIZUKA, S.; TADA, Y.; OIKAWA, K.; TANIGUCHI, N. Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. **Biochim Biophys Acta**, v.24, p.292-296, 1987.

ARCHER SL, HUANG JM, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.2 n.91(16) p.7583-7, 1994.

ARIVAZHAGAN, P.; JULIET, P.; PANNEERSELVAM, C. Effect of dl-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. **Pharmacol Res.**, v.41, n.3, p.299-303, 2000.

ARIVAZHAGAN, P.; RAMANATHAN, K.; PANNEERSELVAM, C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. **Chem Biol Interact.**, v.138, n.2, p.189-198, 2001.

ARMSTNG, M.D.; ADUELA, U. A study of plasma free amino acid levels: II- Normal values for ehildren and adulta. **Metabolism**, v.22, p.561-569, 1973.

ARRIBAS, S.; MARIN, J.; PONTE, A.; BALFAGON, G.; SALAICES, M. Norepinephrine-induced relaxations in rat aortae mediated by endothelial b-adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.270, n.2, p.520-527, 1994.

ATKINSON, J.; TATCHUM-TALOM, R.; CORMAN, B. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging process. III. Endothelial function of mesenteric arterial bed of rat. **Am. J. Physiol.**, v.267, p.136-143, 1994.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet.**, v.358, p.9277, p.221-229, 2001.

AYO SH, RADNIK RA, GARONI JA, GLASS WF 2ND, KREISBERG JI. High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. **Am J Pathol**, 136(6):1339-48. Erratum in: **Am J Pathol**, 137(2):preceding 225, 1990.

AZADZOI, K.M.; SAENZ DE TEJADA, I. Diabetes mellitus impairs neurogenic and endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. **J Urol**. v.148, n.5, p.1587-1591, 1992.

AZIZ, A.A.; EDWARDS, C.A.; LEAN, M.E.; CROZIER, A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. **Free Radic Res.**, v.29, p.3, p.:257-269, 1998.

BACHSCHMID, M.; THURAU, S.; ZOU, M.H.; ULLRICH, V. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. **FASEB J.**, v.17 ,n.8, p.914-916, 2003.

BALDASSARE JJ, TARVER AP, HENDERSON PA, MACKIN WM, SAHAGAN B, FISHER GJ. Reconstitution of thromboxane A2 receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in isolated platelet membranes: involvement of phosphoinositide-specific phospholipase C-beta and GTP-binding protein Gq. **Biochem J.** 1,291 ( Pt 1):235-40, 1993.

BALLATORI, N. Glutathione mereaptides as transport forms of metals. **Adv Pharmacol.**, v.27, p.271-298, 1994.

BARKER, J.E.; BAKHLE, Y.S.; ANDERSON, J.; TREASURE, T.; PIPER, P.J. Reciprocal inhibition of nitric oxide and prostacyclin synthesis in human saphenous vein. **Br J Pharmacol.**, v.118, p.643-648, 1996.

BARLOW RS, EL-MOWAFY AM, WHITE RE. H(2)O(2) opens BK(Ca) channels via the PLA(2)-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.279, n.2 p. H475-83, 2000.

BARON A, FRIEDEN M, BENY JL. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca(2+)-dependent K + channel on pig coronary artery endothelial cells. **J Physiol.** 1,504 ( Pt 3):537-43, 1997.

BARROSO, I.; GURNELL, M.; CROWLEY, V.E.; AGOSTINI, M.; SCHWABE, J.W.; SOOS, M.A.; MASLEN, G.L.; WILLIAMS, T.D.; LEWIS, H.; SCHAFER, A.J.; CHATTERJEE, V.K.; O'RAHILLY, S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. **Nature**, v.402, n.6764, p.880-883, 1999.

BARTON, M.; CONSENTINO, F.; BRANDES, R.P.; MOREAU, P.; SHAW, S.; LUSCHER, F.T. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. **Hypertension**, v.30, n.4, p.817-824, 1997.

BAST A.; HAENEN GR. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. **Biochim Biophys Acta.**, v.963, n.3, p.558-561, 1988.

BASTIAN, N.R.; HIBBS, J.B. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase, **Curr. Opin. Immunol.**, v. 6, n.1, p.131-139, 1994.

BAUERSACHS J, HECKER M, BUSSE R. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. **Br J Pharmacol.**, 113(4):1548-53, 1994.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v.40, p.405-412, 1991.

BECKER, A.J.; UCKERT, S.; STIEF, C.G.; TRUSS, M.C.; HARTMAN, U.; SOHN, M.; JONAS, U. Systemic and cavernous plasma levels of endothelin 1 in healthy males during different functional conditions of the penis. **World J Urol.**, v.3, p.227-231, 2000.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.87, n.4, p.1620-1624, 1990.

BEHRENDT, D.; GANZ, P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. **Am J Cardiol.**, v.90, n.10C, p.40L-48L, 2002.

BELMIN, J.; CORMAN, B.; MERVAL, R.; TEDGUI, A. Age-related changes in endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta. **Am J Physiol.**, v.264, n.3 Pt 2, p.H679-685, 1993.

BENETOS, A.; HUGET, F.; ALBALADEJO, P.; BRISAC, A.M.; PAPPO, M.; SAFAR, M.E.; LEVY, B. I. Role of adrenergic tone in mechanical and functional properties of carotid artery during aging. **Am J Physiol.**, v.265, p.H1132-H1138, 1993.

BENY JL, BRUNET PC. Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta. **J Physiol.** v. 398:277-89, 1988.

BENY, J.L.; DER WEID, P.Y. Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 176, p.378-384, 1991.

BERETZ A, JOLY M, STOCLET JC, ANTON R. Inhibition of 3',5'-AMP phosphodiesterase by biflavonoids and xanthenes. **Planta Med.** 36(3):193-5, 1979.

BEVERELLI, F.; BEA, M.L.; PUYBASSET, L.; GIUDICELLI, J.F., BERDEAUX, A. Chronic inhibition of NO synthase enhances the production of protacyclin in coronary arteries through upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform. **Fundam Clin Pharmacol.**, v.11, p.252-259, 1997.

BIVALACQUA, T.J., CHAMPION, H.C., HELLSTROM, W.J., KADOWITZ, P.J.. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. **Trends Pharmacol Sci.**, v.12, p.484-489, 2000.

BIVALACQUA, T.J.; HELLSTROM, W.J.; KADOWITZ, P.J.; CHAMPION, H.C. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.283, n.4, p.923-927, 2001.

BIVALACQUA, T.J.; USTA, M.F.; CHAMPION, H.C.; ADAMS, D.; NAMARA, D.B.; ABDEL-MAGEED, A.B.; KADOWITZ, P.J.; HELLSTROM, W.J. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase partially restores nitric oxide synthesis and erectile function in streptozotocin diabetic rats. **J Urol.**, v.169, n.5, p.1911-1917, 2003.



BLANCO, R.; SAENZ DE TEJADA, I.; GOLDSTEIN, I.; KRANE, R.J.; WOTIZ, H.H.; COHEN, R.A.. Dysfunctional penile cholinergic nerves in diabetic impotent men. **J Urol.**, v.144, n.2 Pt 1, p.:278-280, 1990.

BLANN, A.D.; TABERNER, D.A. A reliable marker of endothelial dysfunction: does it exist?. **Br J Haematol.**, v.90, n.2, p.244-248, 1995.

BOKKENHEUSER, V. D.; WINTER J. **Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria.** In Progress in Clinical and Biological Research. Cody, V.; Middleton Jr. E.; Harborne Alan J. B.; Liss R. (Eds). New York., , v. 280, p. 142-145, 1988.

BOLOTINA VM, NAJIBI S, PALACINO JJ, PAGANO PJ, COHEN RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994 Apr 28;368(6474):850-3.

BOLTON, T.B.; LANG, R.J.; TAKEWAKI, T. **Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth.** Harwood Academic Publishers. Amsterdam. p.91-95, 1984.

BONNER, F.T. Nitric oxide gas. **Methods Enzymol.**, v.268, p.50-57, 1996.

BOOLELL, M.; ALLEN, M.J., BALLARD, S.A., GEPI-ATTEE, S.; MUIRHEAD, G.J.; NAYLOR, A.M., OSTERLOH, I.H., GINGELL, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **Int J Impot Res.**, v.2, p.47-52, 1996.

BORCEA, V.; NOUROOZ-ZADEH, J.; WOLFF, S.P.; KLEVESATH, M.; HOFMANN, M.; URICH, H.; WAHL, P.; ZIEGLER, R.; TRITSCHLER, H.; HALLIWELL, B.; NAWROTH, P.P. Alpha-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. **Free Radic Biol Med.**, v.26, n.11-12, p.1495-1500, 1999.

BORENSHTEIN, D.; OFRI, R.; WERMAN, M.; STARK, A.; TRITSCHLER, H.J.; MOELLER, W.; MADAR, Z. Cataract development in diabetic sand rats treated with alpha-lipoic acid and its gamma-linolenic acid conjugate. **Diabetes Metab Res Rev.** v.17, n.1, p.44-50, 2001.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Radical chemistry of flavonoid antioxidants. **Adv Exp Med Biol.**, v.264, p.165-170, 1990.

BOUISSOU H, MAUREL E.. Collagens of the internal saphenous vein, normal and varicose, as a function of age. **Bull Acad Natl Med.**, v.175, n.4, p.603-606; 1991.

BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L.F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. **Adv. Enzymol.**, v. 32, p.173-219, 1969.

BRANDES RP, SCHMITZ-WINNENTHAL FH, FELETOU M, GODECKE A, HUANG PL, VANHOUTTE PM, FLEMING I, BUSSE R. An endothelium-derived

hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;97(17):9747-52, 2000.

BRANDFONBRENER, M.; LANDOWNE, M, SHOCK, N.W. Changes in cardiac output with age. *Circulation*, v.12, n.4, p.557-66, 1955.

BREDDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.*, v.1, p.3-11, 1992.

BREDDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.87, n.2, p.682-685, 1990.

BRETT J, SCHMIDT AM, YAN SD, ZOU YS, WEIDMAN E, PINSKY D, NOWYGRD R, NEEPER M, PRZYSIECKI C, SHAW A, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* v.143(6):1699-712, 1993.

BROUET, A.; SONVEAUX, P.; DESSY, C.; MONIOTTE, S.; BALLIGAND, J.L.; FERON, O. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res.*, v.89, n.10, p.866-873, 2001.

BROWN, J. P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research*, v.75, p.243-277, 1980.

BROWN, J.E.; KHODR, H.; HIDER, R.C.; RICE-EVANS, C.A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.*, v.330, n. Pt 3, p.1173-1178, 1998.

BROWNLEE M, VLASSARA H, KOONEY A, ULRICH P, CERAMI A.. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 27;232(4758):1629-32, 1986.

BROWNLEE M, CERAMI A, VLASSARA H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.*, 19;318(20):1315-21, 1988.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v.414, n.6865, p.:813-820, 2001.

BRUNING, J.C.; MICHAEL, M.D.; WINNAY, J.N.; HAYASHI, T.; HORSCH, D.; ACCILI, D.; GOODYEAR, L.J.; KAHN, C.R. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell.*, v.2, n.5, p.559-569, 1998.

BUCALA R, VLASSARA H. Advanced glycosylation endproducts in diabetic renal disease: clinical measurement, pathophysiological significance, and prospects for pharmacological inhibition. *Blood Purif.*;13(3-4):160-70, 1995.

BUCALA R, MAKITA Z, KOSCHINSKY T, CERAMI A, VLASSARA H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;90(14):6434-8, 1993.

BUCALA R, MAKITA Z, VEGA G, GRUNDY S, KOSCHINSKY T, CERAMI A, VLASSARA H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27;91(20):9441-5, 1994.

BUCALA R., TRACEY, K., CERAMI, A. Advanced glycosylation end products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.*, 87: 432-438, 1991.

BUCALA, R.; CERAMI, A. Advanced glycosylation: chemistry, biology and implications for diabetes and aging. *Adv. Pharmacol.*, v.23, p.31-34, 1992.

BUGA GM, IGNARRO LJ. Electrical field stimulation causes endothelium-dependent and nitric oxide-mediated relaxation of pulmonary artery. *Am J Physiol.* 262(4 Pt 2):H973-9, 1992.

BUNTING, S.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The prostacyclin-thromboxane A<sub>2</sub> balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull*, v.39, p.271-276, 1983.

BURCHARDT, T.; BURCHARDT, M.; KARDEN, J.; BUTTYAN, R.; SHABSIGH, A.; DE LA TAILLE, A.; NG P.Y.; ANASTASIADIS, A.G.; SHABSIGH, R. Reduction of endothelial and smooth muscle density in the corpora cavernosa of the streptozotocin induced diabetic rat. *J Urol.*, v.164, n.5, p.1807-1811, 2000.

BURNETT, A.L.; LOWENSTEIN, C.J.; BREDT, D.S.; CHANG, T.S.; SNYDER, S.H.; 13-Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, v.257, n.5068, p.401-403, 1992.

BURNHAM MP, BYCHKOV R, FELETOU M, RICHARDS GR, VANHOUTTE PM, WESTON AH, EDWARDS G. Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol.* 135(5):1133-43, 2002.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem.*, v.268, n.12, p.8410-8413, 1993.

BUSH, P.A.; ARONSON, W.J.; BUGA, G.M.; RAJFER, J.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.*, v.147, n.6, p.1650-165, 1992.

BUSH, P.A.; GONZALEZ, N.E.; IGNARRO, L.J. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.186, n.1, p.308-314, 1992.

BUSSE R, LUCKHOFF A, WINTER I, MULSCH A, POHL U. Fendiline and calmidazolium enhance the release of endothelium-derived relaxant factor and of prostacyclin from cultured endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 337(1):79-84, 1988.

BUSSE, E.; ZIMMER, G.; SCHOPOHL, B.; KORNHUBER, B. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*, v.42, n.6, p.829-831, 1992.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.*, v.29, n.3-4, p.222-230, 2000.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, v.87, p.840-844, 2000 .

CALVER, A, COLLIER, J, VALLANCE, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.*, v.90, p.2548-2554, 1992.

CAMERON NE, COTTER MA, MAXFIELD EK. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* 36(4):299-304, 1993.

CAMERON, N.E.; COTTER, M.A.; LOW, P.A. Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. *Am J Physiol.*, v.261, n.1 Pt 1, p.E1-8, 1991.

CAMERON, NE; COTTER, MA; ARCHIBALD, V; DINES, KC; MAXFIELD, EK. Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* , v.37, n.5, p.449-459, 1994.

CAMPBELL, W.B.; GEBREMEDHIN D.; PRATT P.F.; HARDER D.R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.*, v,78, n.3, p.415-23, 1996.

CAMPO, C.; LAHERA, V.; GARCIA-ROBLES, R.; CACHOFEIRO, V.; ALCAZAR, J.M.; ANDRES, A.; RODICIO, J.L.; RUILOPE, L.M. Aging abolishes the renal response to L-arginine infusion in essential hypertension. *Kidney Int Suppl.*, v.55, p.S126-S128, 1996.

CARREAU, J.P. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymol.*, v.62, p.152-158, 1979.

CARVALHO, M.H.C; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens.*, v.8, p. 76-88, 2001.

CAUGHEY, G.E.; CLELAND, L.G.; GAMBLE, J.R.; JAMES, M.J. Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. *J. Biol. Chem.*, v.276, v.37, p. 839-845, 2001.

CAVAGHAN MK, EHRMANN DA, POLONSKY KS. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J Clin Invest.* 106(3):329-33, 2000.

GAVRILOVA O, MARCUS-SAMUELS B, GRAHAM D, KIM JK, SHULMAN GI, CASTLE AL, VINSON C, ECKHAUS M, REITMAN ML. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest.* 105(3):271-8. 2000.

CELERMAJER, D.S.; SORENSEN, K.E.; SPIEGELHALTER, D.J.; GEORGAKOPOULOS, D.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J.E. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.24, n.2, p.471-476, 1994.

CERAMI A, VLASSARA H, BROWNLEE M. Role of nonenzymatic glycosylation in atherogenesis. *J Cell Biochem.*, 30(2):111-20 1986.

CESARONE, M.R.; LAURORA, G.; RICCI, A.; BELCARO, G.; POMANTE, P.; CANDIANI, C.; LEON, M.; NICOLAIDES, A.N. Acute effects of hydroxyethylrutin on capillary filtration in normal volunteers, patients with venous hypertension and in patients with diabetic microangiopathy (a dose comparison study). *Vasa*, v.21, n.1, p.76-80, 1992.

CHAKIR, M.; PLANTE, G.E. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.54, n.1, p.45-51, 1996.

CHALLAH M, NADAUD S, PHILIPPE M, BATTLE T, SOUBRIER F, CORMAN B, MICHEL JB. Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 2):H1941-8, 1997.

CHANG, R.L.; HUANG, M.T.; WOOD, A.W.; WONG, C.Q.; NEWMARK, H.L.; YAGI H.; SAYER J.M.; JERINA D.M.; CONEY A.H. Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo(a)pyrene and (+)-7 $\beta$ ,8-dihydroxy-9-,10--epoxy-7,8,9,10-tetrabenzo(a)pyrene on mouse skin and in newborn mouse. *Carcinogenesis*, v. 6, p.1127-1133, 1985.

CHATAIGNEAU T, FELETOU M, THOLLON C, VILLENEUVE N, VILAINE JP, DUHAULT J, VANHOUTTE PM. Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol.* 123(5):968-74, 1998.

CHATAIGNEAU, T.; FÉLÉTOU, M.; HUANG, P.L.; FISHMAN, F.C.; DUHAULT, J.; VANHOUTTE, P.M. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol*, v.126, p.219-226. 1999.

CHAUHAN SD, NILSSON H, AHLUWALIA A, HOBBS AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Feb 4;100(3):1426-31, 2003.

CHAUHAN, A.; MORE, RS, MULLINS, P.A.; TAYLOR, G.; PETCH, C.; SCHOFIELD, P.M. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.28, v.7, p.1796-1804, 1996.

CHAUHAN, S. D.; NILSSON, H.; AHLUWALIA, A.; HOBBS, A. J. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.1426-1431, 2003.

CHAYTOR AT, EVANS WH, GRIFFITH TM. Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. **J Physiol**. 15;508 ( Pt 2):561-73, 1998.

CHAYTOR AT, MARTIN PE, EDWARDS DH, GRIFFITH TM. Gap junctional communication underpins EDHF-type relaxations evoked by ACh in the rat hepatic artery. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 280(6):H2441-50, 2001.

CHEN, G.; SUZUKI, H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarisation recorded from rat arterial smooth muscle cells. **J. Physiol.**, v.410, p.91-106, 1989.

CHEN, H.H.; BURNETT JR., J.C. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.32, n.3, p.S22-S28, 1998.

CHEN, Y.Q.; SU, M.; WALIA, R.R.; HAO, Q.; COVINGTON, J.W.; VAUGHAN, D.E. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.** , v.273, n.14, p.:8225-8231, 1998.

GHIGO D, ALESSIO P, FOCO A, BUSSOLINO F, COSTAMAGNA C, HELLER R, GARBARINO G, PESCARMONA GP, BOSIA A. Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells. **Am J Physiol**. 265(3 Pt 1):C728-32, 1993.

CHITALEY, K.; WEBB, R.C.; MILLS, T.M. RhoA/Rho-kinase: a novel player in the regulation of penile erection. **Int J Impot Res.**, v.13, n.2, p.67-72, 2001.

CHRIST GJ, SPRAY DC, EL-SABBAN M, MOORE LK, BRINK PR. Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. **Circ Res**. 79(4):631-46, 1996.

CHRIST, G.J. The penis as a vascular organ. The importance of corporal smooth muscle tone in the control of erection. **Urol. Clin. North. Am.**, v.22, n.4, p.727-745, 1995.

CHRIST, G.J.; WANG, H.Z.; VENKATESWARLU, K.; ZHAO, W.; DAY, N.S.; CHANNELS, I.O.N. Their Role in Erectile Physiology, Dysfunction, and Future Therapy. *Mol. Urol.*, v.3, n.2, p.61-73, 1999.

CLANEY, R.M.; LAVARTOVSKY, O.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; YEGUDIN, J.; ABRAMSON, S.B. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: Evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.9, n.3, p.650-368, 1994.

CLAPP LH, TURCATO S, HALL S, BALOC M. Evidence that  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels play a major role in mediating the vascular effects of iloprost and cicaprost. *Eur. J. Pharmacol.*, v.356, p.215-24, 1998.

CLESHAM G, PARSAAE H, JOSEPH S, MCEWAN JR, MACDERMOT J. Activation of bovine endothelial thromboxane receptors triggers release of prostacyclin but not EDRF. *Cardiovasc Res*, 26(5):513-7, 1992.

COCHRANE SM, ROBINSON GB. In vitro glycation of glomerular basement membrane alters its permeability: a possible mechanism in diabetic complications. *FEBS Lett.* 13;375(1-2):41-4, 1995.

COHEN, R.A. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v.38, n.2, p.105-28, 1995.

COHEN, RA. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes Mellitus. *Circulation*, v.87, n.v, p.67-68, 1993.

COLEMAN, H.A.; TARE, M.; PARKINGTON, H.C. EDHF is not  $K^+$  but may be due to spread of current from the endothelium in guinea-pig arterioles. *Am. J. Physiol.*, v.280, p.H2478-H2483, 2001.

COLES, B. AND B. KETTERER. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Molecular Biol.*, 25, 47-70. 1990.

COOK NC, SAMMAN S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*;7:66-76, 1996.

COOKE, J.P.; STAMLER J.; ANDON, N.; DAVIES, P.F; MCKINLEY, G.; LOSCALZO J. Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol, *Am. J. Physiol.*, v. 259, p.H804-H812, 1990.

COOPER ME, BONNET F, OLDFIELD M, JANDELEIT-DAHM K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens.* 14(5 Pt 1):475-86. 2001.

COOPER, M.E. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*, v.44, n.11, 1p.957-972, 2001.

CORKEY RF, CORKEY BE, GIMBRONE MA JR. Hexose transport in normal and SV40-transformed human endothelial cells in culture. *J Cell Physiol.*, 106(3):425-34, 1981.

CORRETTI, M.C.; PLOTNICK, G.D.; VOGEL, R.A. The effects of age and gender on brachial artery endothelium-dependent vasoactivity are stimulus-dependent. *Clin. Cardiol.*, v.18, n.8, p.471-476, 1995.

CORRIU C, FELETOU M, CANET E, VANHOUTTE PM. Inhibitors of the cytochrome P450-mono-oxygenase and endothelium-dependent hyperpolarizations in the guinea-pig isolated carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, v.117, n.4, p.607-10, 1996a.

CORRIU C, FELETOU M, CANET E, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 119(5):959-64, 1995.

COSENTINO, F.; KATUSIC, Z.S. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*, v.91, n.1, p.139-44, 1995.

COSENTINO, F.; SILL, J.C.; KATUSIC, Z.S. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension*, v.23, n.2, p.229-235, 1994.

COSTA E FORTI, A.; FONTELES, M.C. Decreased endothelium dependent relaxation (nitric oxide) in diabetic kidneys. *Horm Metab Res*, v.30, p.55-7., 1998.

COTTER, M.A.; CAMERON, N.E. Effect of the NADP-H oxidase inhibitor, apocynin, on peripheral nerve perfusion and function in diabetic rats. *Life Sci.*, v.73, n.14, p.1813-1824, 2003.

COX, R.H. Effect of age on the mechanical properties of rat carotid artery. *Am. J. Physiol.*, v.233, p.H256-H263, 1977.

CRAVEN PA, DERUBERTIS FR. Role for local prostaglandin and thromboxane production in the regulation of glomerular filtration rate in the rat with streptozocin-induced diabetes. *J Lab Clin Med.* 113(6):674-81, 1989.

CRAVEN PA, DAVIDSON CM, DERUBERTIS FR. Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes.* 39(6):667-74, 1990.

CRAVEN PA, STUDER RK, DERUBERTIS FR. Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest.* 93(1):311-20, 1994.

CREIGHTON DJ, HAMILTON DS. Brief history of glyoxalase I and what we have learned about metal ion-dependent, enzyme-catalyzed isomerizations. *Arch Biochem Biophys.* 1;387(1):1-10, 2001.



CURRAN, R.D.; BILLIAR, T.R.; STUEHR, D.J.; HOFMANN, K.; SIMMONS, R.L. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J. Exp. Med.*, v.170, n.5, p.1769-1774, 1989.

CYRUS, T.; TANG, L.X.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G.A. Pratico D. Lipid peroxidation and platelet activation in murine atherosclerosis. *Circulation*, v.104, n.16, p.1940-1945, 2001.

DANIELSON, L.A.; CONRAD, K.P. Prostaglandins maintain renal vasodilation and hyperfiltration during chronic nitric oxide blockade in conscious pregnant rats. *Circ. Res.*, v.79, p.1161-1166, 1996.

DAUGHADAY, W.H.; LARNER, J. The renal excretion of inositol in normal and diabetic human beings. *J Clin Invest.*, v.33, n.3, p.326-332, 1954.

DAUGHADAY, W.H.; LARNER, J.; HARTNETT, C. The synthesis of inositol in the immature rat and chick embryo. *J Biol Chem.*, v.212, n.2, p.869-875, 1955.

DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV, MURAD F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41:203-36. 2001.

DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R.J.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.85, p.2334-2338, 1988.

DE VRIESE AS; VAN DE VOORDE J; BLOM HJ; VANHOUTTE PM; VERBEKE M; LAMEIRE NH. The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin-induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia*, v.43, n.9, p.1116-1125, 2000.

DE VRIESE AS, VERBEUREN TJ, VAN DE VOORDE J, LAMEIRE NH, VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 130(5):963-74, 2000.

DEAN-JOHNSON M.; HENRY, S.A. Biosynthesis of inositol in yeast. Primary structure of myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) and functional analysis of its structural gene; the INO1 locus. *J Biol Chem*, v.264, n.2, p.1274-1283, 1989.

DEGENHARDT, T.P.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol.*, v.44, p.1139-1145, 1998.

DEISCHER, T.A.; MANKANI, S.; HOFFMAN, B.B. Role of cyclic AMP-dependent protein kinase in the diminished beta adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle with increasing age. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v.249, p.812-819, 1989.

DEL BOCCIO, G.; LAPENNA, D.; PORRECA, E.; PENNELLI, A.; SAVINI, F.; FELICIANI, P.; RICCI, G.; CUCCURULLO, F. Aortic antioxidant defense mechanisms: Time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, v.81, p.127-135, 1990.

CURRAN, R.D.; BILLIAR, T.R.; STUEHR, D.J.; HOFMANN, K.; SIMMONS, R.L. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J. Exp. Med.*, v.170, n.5, p.1769-1774, 1989.

CYRUS, T.; TANG, L.X.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G.A. Pratico D. Lipid peroxidation and platelet activation in murine atherosclerosis. *Circulation*, v.104, n.16, p.1940-1945, 2001.

DANIELSON, L.A.; CONRAD, K.P. Prostaglandins maintain renal vasodilation and hyperfiltration during chronic nitric oxide blockade in conscious pregnant rats. *Circ. Res.*, v.79, p.1161-1166, 1996.

DAUGHADAY, W.H.; LARNER, J. The renal excretion of inositol in normal and diabetic human beings. *J Clin Invest.*, v.33, n.3, p.326-332, 1954.

DAUGHADAY, W.H.; LARNER, J.; HARTNETT, C. The synthesis of inositol in the immature rat and chick embryo. *J Biol Chem.*, v.212, n.2, p.869-875, 1955.

DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV, MURAD F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41:203-36. 2001.

DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R.J.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.85, p.2334-2338, 1988.

DE VRIESE AS; VAN DE VOORDE J; BLOM HJ; VANHOUTTE PM; VERBEKE M; LAMEIRE NH. The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin-induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia*, v.43, n.9, p.1116-1125, 2000.

DE VRIESE AS, VERBEUREN TJ, VAN DE VOORDE J, LAMEIRE NH, VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 130(5):963-74, 2000.

DEAN-JOHNSON M.; HENRY, S.A. Biosynthesis of inositol in yeast. Primary structure of myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) and functional analysis of its structural gene; the INO1 locus. *J Biol Chem*, v.264, n.2, p.1274-1283, 1989.

DEGENHARDT, T.P.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol.*, v.44, p.1139-1145, 1998.

DEISCHER, T.A.; MANKANI, S.; HOFFMAN, B.B. Role of cyclic AMP-dependent protein kinase in the diminished beta adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle with increasing age. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v.249, p.812-819, 1989.

DEL BOCCIO, G.; LAPENNA, D.; PORRECA, E.; PENNELLI, A.; SAVINI, F.; FELICIANI, P.; RICCI, G.; CUCCURULLO, F. Aortic antioxidant defense mechanisms: Time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, v.81, p.127-135, 1990.

DELEVE, L.D.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepato toxicity. *Pharmacol. Ther.*, v.52, p.287-305, 1991.

DENG, L.Y.; LI, J.S.; SCHIFFRIN, E.L. Endothelium-dependent relaxation of small arteries from essential hypertensive patients: mechanisms and comparison with normotensive subjects and with responses of vessels from spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.*, v.88, n.6, p.611-622, 1995.

DE RUBERTIS FR, CRAVEN PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*. 43(1):1-8, 1994.

DEVANE WA, BREUER A, SHESKIN T, JARBE TU, EISEN MS, MECHOULAM R. A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 29;35(11):2065-9, 1992.

DI MARZO V, FONTANA A, CADAS H, SCHINELLI S, CIMINO G, SCHWARTZ JC, PIOMELLI D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 15;372(6507):686-91, 1994.

DIAZ, M.N.; FREI, B.; VITA, J.A.; KEANEY, JR., J.F. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.*, v.337, n.6, p.408-416, 1997.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, v.399, n.6736, p.601-605, 1999.

DINCER, Y., AKCAY, T., ALADEMIR, Z., ILKOVA, H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.*, v.51, p.1360-1362, 2002.

DINERMAN JL, DAWSON TM, SCHELL MJ, SNOWMAN A, SNYDER SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.91, n.10, p.4214-4218, 1994.

DOBASHI, K.; ASAYAMA, K.; HAYASHIBE, H.; UCHIDA, N.; KOBAYASHI, M.; KAWAOI, A.; KATO, K. Effect of diabetes mellitus induced by streptozotocin on renal superoxide dismutases in the rat. A radioimmunoassay and immunohistochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, v.60, n.1, p.67-72, 1991.

DOCHERTY, J.R. Aging and the cardiovascular system. *J. Auton. Pharmacol.*, v.6, p.77-84, 1986.

DOCHERTY, J.R. Cardiovascular responses in ageing: a review. *Pharmacol Rev.*, v.42, n.2, p.103-125, 1990.

DOHI Y, THIEL MA, BUHLER FR, LÜSCHER TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. **Hypertension**, v.16, n.2, p.170-179, 1990.

DOHI, Y.; LÜSCHER, T.F. Aging differentially affects direct and indirect actions of endothelin-1 in perfused mesenteric arteries of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.100, p.889-893, 1990.

DOUGHTY JM, PLANE F, LANGTON PD. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. **Am J Physiol**. 1999 Mar;276(3 Pt 2):H1107-12.

DONI, M.G.; WHITTLE, B.J.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. **Eur. J. Pharmacol**, v.151, p.19-25, 1988.

DONOSO, MV;; FOURNIER, A.; PESCHKE, H.; FAUNDEZ, H.; DOMENECH, R.; HUIDOBRO-TORO, J.P. Aging differentially modifies arterial sensitivity to endothelin-1 and 5-hydroxytryptamine: studies in dog coronary arteries and rat arterial mesenteric bed. **Peptides**, v.15, n.8, p.1489-1495, 1994.

DORA KA, DOYLE MP, DULING BR. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. **Proc Natl Acad Sci USA**. 10;94(12):6529-34, 1997

DORA, K.; GARLAND, C.J. Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K<sup>+</sup> in the rat isolated mesenteric artery. **Am. J. Physiol.**, v.280, p.H2424-H2429, 2001.

DORMANDY, J.A. Prostanoid drug therapy for peripheral arterial occlusive disease—the European experience. **Vasc. Med.**, v.1, p.155-158, 1996.

DOUGHTY JM, BOYLE JP, LANGTON PD. Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries. **Br J Pharmacol**. 130(5):1174-82. 2000.

DOUGHTY JM, BOYLE JP, LANGTON PD. Blockade of chloride channels reveals relaxations of rat small mesenteric arteries to raised potassium. **Br J Pharmacol**. 132(1):293-301, 2001.

DU XL, EDELSTEIN D, ROSSETTI L, FANTUS IG, GOLDBERG H, ZIYADEH F, WU J, BROWNLEE M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Spl glycosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 24;97(22):12222-6, 2000.

DU XL, EDELSTEIN D, DIMMELER S, JU Q, SUI C, BROWNLEE M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. **J Clin Invest.**, 108(9):1341-8, 2001.

- DU, X.L.; STOCKLAUSER-FARBER, K.; ROSEN, P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase ?. *Free Radic. Biol. Méd.*, v.27, p.752-63, 1999.
- DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; UTRILLA, P.; JIMENEZ, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle: structure- activity relationships. *General Pharmacology*, v.24, p.857-862, 1993a.
- DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELLO, A.; JIMENEZ, J.; TAMARGO, J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, v. 239, p.1-7, 1993b.
- DUCROCQ C, BLANCHARD B, PIGNATELLI B, OHSHIMA H. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol Life Sci.* 55(8-9):1068-77, 1999.
- DUFFY, S.J.; CASTLE, S.F.; HARPER, R.W.; MEREDITH, I.T. Contribution of vasodilator prostanoids and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilation, and flow-mediated dilation in human coronary circulation. *Circulation*, v.100, p.1951-1957, 1999.
- DUFOUR E, BOULAY J, RINCHEVAL V, SAINSARD-CHANET A. A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11;97(8):4138-43, 2000.
- DUKE, R.C.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J.D.E. Cell suicide in health and disease. *Scientific American*, p.79-87, 1996.
- DUN, N.J.; DUN, S.L.; FORSTERMANN, U.; TSENG, L.F. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, v.147, n.2, p.217-20, p.1992.
- DUN, N.J.; DUN, S.L.; WU, S.Y.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci. Lett.*, v.158, n.1, p.51-54, 1993.
- DUNN JA, PATRICK JS, THORPE SR, BAYNES JW. Oxidation of glycosylated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry.* 28;28(24):9464-8, 1989.
- DUNN, J.A.; MCCANCE, D.R.; THORPE, S.R.; BAILIE, K.E.; LYONS, T.J.; BAYNES, J.W. Age-dependent accumulation of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine and N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry*, v.30, p.1205-1210, 1991.
- DUPRE S; SPOTO G; MATARESE RM; ORLANDO M; CAVALLINI D. Biosynthesis of lipoic acid in the rat: incorporation of 35S- and 14C-labeled precursors. *Arch Biochem Biophys.*, v.202, n.2, p.361-365, 1980.
- DURANTE, W.; SEN, A.K.; SUNAHARA, F. . Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br. J. Pharmacol*, v.94, p.463-468, 1988.

DYER, D.G.; DUNN, J.A.; THORPE, S.R.; BAILIE, K.E.; LYONS, T.J.; MCCANCE, D.R.; BAYNES, J.W. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.*, v.91, p.2463-2469, 1993.

EBARA, T.; CONDE, K.; KAKO, Y.; LIU, Y.; XU, Y.; RAMAKRISHNAN, R.; GOLDBERG, I.J.; SHACHTER, N.S. Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *J. Clin. Invest.*, v.105, n.12, p.1807-1818, 2000.

EDWARDS G, GARDENER MJ, FELETOU M, BRADY G, VANHOUTTE PM, WESTON AH. Further investigation of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in rat hepatic artery: studies using 1-EBIO and ouabain. *Br J Pharmacol.* 128(5):1064-70, 1999.

EDWARDS G, THOLLON C, GARDENER MJ, FELETOU M, VILAINE J, VANHOUTTE PM, WESTON AH. Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol.* 129(6):1145-54, 2000.

EDWARDS, M.; RASSIN, D.K.; IZUMI, T.; MITRA, S.; PEREZ-POLO JR. APE/Ref-1 responses to oxidative stress in aged rats. *J. Neurosci. Res.*, v.54, n.5, p.635-638, 1998.

EMERIT, J.; BONNEFONT, D.; GALLI, A. Role of lipid peroxidation in the formation of atheroma, *Presse Med.*, v.18, n.16, p.832-836, 1989.

EMERSON, G.G.; SEGAL, S.S. Electrical activation of endothelium evokes vasodilatation and hyperpolarization along hamster feed arteries. *Am. J. Physiol.*, v.280, p.H160-CH167, 2001.

EMERSON, G.G.; SEGAL, S.S. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ. Res.*, v.87, p.474-479, 2000.

ENGERMAN, R.L.; KERN, T.S.; LARSON, M.E. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia*, v.37, n.2, p.141-144, 1994.

ERMAK, G.; DAVIES, K.J.A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.*, v.38, p.713-721, 2002.

ESPOSITO C, GERLACH H, BRETT J, STERN D, VLASSARA H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 1;170(4):1387-407, 1989.

ESTRADA, D.E.; EWART, H.S.; TSAKIRIDIS, T.; VOLCHUK, A.; RAMLAL, T.; TRITSCHLER, H.; KLIP, A. Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes*, v.45, p.1798-804, 1996.

EVANS, J.L.; GOLDFINE, I.D. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther.*, v.2, n.3, p.401-413, 2000.

FAJANS, S.S.; BELL, G.I.; POLONSKY, K.S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med.*, v.345, n.13, p.971-80, 2001.

FAUST, M.; ALTENBURGER, R.; BOEDEKER, W.; GRIMME, L.H. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull Environ Contam Toxicol.*, v.53, n.1, p.134-141, 1994.

FEENER EP, KIA P, INOBUCHI T, SHIBA T, KUNISAKI M, KING GL. Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contrib Nephrol.*, 118:180-7, 1996.

FELDMAN HA, GOLDSTEIN I, HATZICHRISTOU DG, KRANE RJ, MCKINLAY JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol.*, 151(1):54-61, 1994

FELDMAN, R. D.; TAN, C. M.; CHORAZYCZEWSKI, J.G. Protein alteration in hypertension and aging. *Hypertension*, v.26, p.725-732, 1995.

FÉLÉTOU, M., VANHOUTTE, P. M. Endothelial Dysfunction: a Novel Therapeutic Target. The Alternative: EDHF. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v.3, p.15-22, 1999.

FISHEL, B.; CHEN, J.; ALON, M.; ZHUKOVSKY, G.; MATZKIN, H. Pudendal nerve conduction to evaluate organic erectile dysfunction. *Am J Phys Med Rehabil.*, v.80, n.12, p.885-888, 2001.

FISSLTHALER B, POPP R, KISS L, POTENTE M, HARDER DR, FLEMING I, BUSSE R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 30;401(6752):493-7, 1999.

FLEISCH, J.H. Age-related changes in the sensitivity of blood vessels to drugs. *Pharmacol. Ther.*, v.8, n.2, p.477-487, 1980.

FLEMING I, MICHAELIS UR, BREDEKOTTER D, FISSLTHALER B, DEHGHANI F, BRANDES RP, BUSSE R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res.* 19;88(1):44-51, 2001.

FOGELMAN AM, SHECHTER I, SEAGER J, HOKOM M, CHILD JS, EDWARDS PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(4):2214-8, 1980.

FOLKOW, B.; SVANBORG, A. Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev.* v.73, n.4, p.725-64, 1993.

- FONTELES, M.C.; ALMEIDA, M.Q.; LARNER, J. Antihyperglycemic effects of 3-O-methyl-D-chiro-inositol and D-chiro-inositol associated with manganese in streptozotocin diabetic rats. *Horm Metab Res.*, v.32, n.4, p.129-132, 2000.
- FONTELES, M.C.; HUANG, L.C.; LARNER, J. Infusion of pH 2.0 D-chiro-inositol glycan insulin putative mediator normalizes plasma glucose in streptozotocin diabetic rats at a dose equivalent to insulin without inducing hypoglycaemia. *Diabetologia*, v.39, n.6, p.731-734, 1996.
- FORD, I.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E.; GREAVES, M. The effects of treatment with alpha-lipoic acid or evening primrose oil on vascular hemostatic and lipid risk factors, blood flow, and peripheral nerve conduction in the streptozotocin-diabetic rat. *Metabolism*, v.50, n.8, p.868-875, 2001.
- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.*, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.
- FÖRSTERMANN, U.; GORSKY, L.D.; POLLOCK, J.S.; ISHII, K.; SCHMIDT, H.H.; HELLER, M.; MURAD, F. Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol.*, v.38, n.1, p.7-13, 1990.
- FÖRSTERMANN, U.; POLLOCK, J.S.; SCHMIDT, H.H.; HELLER, M.; MURAD, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.88, n.5, p.1788-1792, 1991.
- FÖSTERMANN, V.; WARMUTH, G.; DUDEK, C.; ALHEID, V. Formation and functional importance of endothelium derived relaxing factor (EDRF) and prostaglandins in the microcirculation. *Z Kardiol*, v.78, p.85-91, 1989.
- FRANCAVILLA, S.; PROPERZI, G.; BELLINI, C.; MARINO, G.; FERRI, C.; SANTUCCI, A. Endothelin-1 in diabetic and nondiabetic men with erectile dysfunction. *J. Urol.*, v.158, n.5, p.1770-1774, 1997.
- FREI B, ENGLAND L, AMES BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(16):6377-81, 1989.
- FREI B, STOCKER R, AMES BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(24):9748-52. 1988.
- FRIAS, M.A.; DUBOULOZ, F.; REBSAMEN, M.C.; LANG, U. Prostacyclin production in rat aortic smooth muscle cells: role of protein kinase C, phospholipase D and cyclooxygenase-2 expression. *Cardiovascular Research*, v.60, p.438-446, 2003.
- FUJII, K.; OHMORI, S.; TOMINAGA, M.; ABE, I.; TAKATA, Y.; OHYA, Y.; KOBAYASHI, K.; FUJISHIMA, M. Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am. J. Physiol.*, v.265, p.H509-H516, 1993.



FUJIWARA, K.; OKAMURA-IKEDA, K.E.; MOTOKAWA, Y. Assay for protein lipoylation reaction. *Methods Enzymol.*, v.251, p.333-350, 1995.

FUKAO M; HATTORI Y; KANNO M; SAKUMA I; KITABATAKE A. Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol.*, v.120, n.3, p.439-46, 1997.

FULTON D, MCGIFF JC, QUILLEY J. Pharmacological evaluation of an epoxide as the putative hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 287(2):497-503, 1998.

FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* v.399, n.6736, p.597-601, 1999.

FURCHGOTT, R.E.; VONHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxation and contracting factors. *FASEB Journal*, v. 3, p. 2007-2018, 1989.

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.

FUHRMAN B, AVIRAM M. Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 957:321-4, 2002.

FUSTER, V.; BADIMON, J.J.; BADIMON, L. Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. *Circulation.*, v.86, n.6, p.1-11, 1992.

GABALLA MA, ECKHART AD, KOCH WJ, GOLDMAN S. Vascular beta-adrenergic receptor adenylyl cyclase system in maturation and aging. *J Mol Cell Cardiol*, 32(9):1745-55, 2000.

GABOR, M. Szent-Gyorgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. *Prog Clin Biol Res.*, v.280, p.1-15, 1988.

GEBREMEDHIN D, MA YH, FALCK JR, ROMAN RJ, VANROLLINS M, HARDER DR. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 263(2 Pt 2):H519-25, 1992.

GANZ MB, SEFTEL A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278(1):E146-52, 2000.

GARCIA SORIANO, F.; VIRAG, L.; JAGTAP, P.; SZABO, E.; MABLEY, J.G.; LIAUDET, L.; MARTON, A.; HOYT, D.G.; MURTHY, K.G.; SALZMAN, A.L.;

SOUTHAN, G.J.; SZABO, C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat. Med.*, v.7, n.1, p.108-113, 2001.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T. Effects of indomethacin on the regional haemodynamics responses to low doses of endothelins and safarotoxin. *Br J Pharmacol*, v.100, p.158-162, 1990.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine does not inhibit the hindquarters vasodilator action of endothelin-1 in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, v.171, p.237-240, 1989.

GARLAND CJ, MCPHERSON GA, Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and re- effect on K<sup>+</sup> conductance. *Circ Res.*, v. 65, p.199-204, 1992.

GARLAND, C.J., PLANE, F., KEMP, B.K., COCKS, T.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *TIPS*, v.16, p.23-30, 1995.

GASTON, B.; REILLY, J.; DRAZEN, J.M.; FACKLER, J.; RAMDEV, P.; AMELLE, D.; MULLINS, M.E.; SUGARBAKER, D.J.; CHEE, C.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J.; STAMLER, J.S. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.90, p.10957-10961, 1993.

GEBREMEDHIN, D.; KOLTAI, M.Z.; POGATSA, G.; MAGYAR, K.; HADHAZY, P. Influence of experimental diabetes on the mechanical responses of canine coronary arteries: role of endothelium. *Cardiovasc Res.*, v.22, n.8, p.537-544, 1988.

GERHARD M, RODDY MA, CREAGER SJ, CREAGER MA. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*. 27(4):849-53, 1996.

GERHARD, M.; RODDY, M.A.; CREAGER, S.J.; CREAGER, M.A. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*, v.27, n.4, p.849-853, 1996.

GERREKE PH. BIEWENGA 1 \*, GUIDO R. M. M. HAENEN 1, BRENDA H. GROEN 2, JEIKE E. BIEWENGA 1, RIENK VAN GRONDELLE 2, AALT BAST 1 Combined non-enzymatic and enzymatic reduction favors bioactivation of racemic lipoic acid: an advantage of a racemic drug? *Chirality* 9:362-366, 1997.

GERRITSEN, M.E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Cardiovascular Research*, v.32, p.720-732, 1996.

GHIGO, D.; ALESSIO, P.; FOCO, A.; BUSSOLINO, F.; COSTAMAGNA, C.; HELLER, R.; GARBARINO, G.; PESCARMONA, G.P.; BOSIA, A. Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Physiol*, v. 265, p.C728-C732, 1993.

SOUTHAN, G.J.; SZABO, C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat. Med.*, v.7, n.1, p.108-113, 2001.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T. Effects of indomethacin on the regional haemodynamics responses to low doses of endothelins and safarotoxin. *Br J Pharmacol*, v.100, p.158-162, 1990.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine does not inhibit the hindquarters vasodilator action of endothelin-1 in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, v.171, p.237-240, 1989.

GARLAND CJ, MCPHERSON GA, Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and re- effect on K<sup>+</sup> conductance. *Circ Res.*, v. 65, p.199-204, 1992.

GARLAND, C.J., PLANE, F., KEMP, B.K., COCKS, T.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *TIPS*, v.16, p.23-30, 1995.

GASTON, B.; REILLY, J.; DRAZEN, J.M.; FACKLER, J.; RAMDEV, P.; AMELLE, D.; MULLINS, M.E.; SUGARBAKER, D.J.; CHEE, C.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J.; STAMLER, J.S. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.90, p.10957-10961, 1993.

GEBREMEDHIN, D.; KOLTAI, M.Z.; POGATSA, G.; MAGYAR, K.; HADHAZY, P. Influence of experimental diabetes on the mechanical responses of canine coronary arteries: role of endothelium. *Cardiovasc Res.*, v.22, n.8, p.537-544, 1988.

GERHARD M, RODDY MA, CREAGER SJ, CREAGER MA. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*. 27(4):849-53, 1996.

GERHARD, M.; RODDY, M.A.; CREAGER, S.J.; CREAGER, M.A. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*, v.27, n.4, p.849-853, 1996.

GERREKE PH. BIEWENGA 1 \*, GUIDO R. M. M. HAENEN 1, BRENDA H. GROEN 2, JEIKE E. BIEWENGA 1, RIENK VAN GRONDELLE 2, AALT BAST 1 Combined non-enzymatic and enzymatic reduction favors bioactivation of racemic lipoic acid: an advantage of a racemic drug? *Chirality* 9:362-366, 1997.

GERRITSEN, M.E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Cardiovascular Research*, v.32, p.720-732, 1996.

GHIGO, D.; ALESSIO, P.; FOCO, A.; BUSSOLINO, F.; COSTAMAGNA, C.; HELLER, R.; GARBARINO, G.; PESCARMONA, G.P.; BOSIA, A. Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Physiol*, v. 265, p.C728-C732, 1993.

GIARDINO I, EDELSTEIN D, BROWNLEE M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest.* 94(1):110-7, 1994.

GIARDINO, I.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, v.97, n.6, p.1422-1428, 1996.

GINSBERG, H.N.; HUANG, L.S. The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. *J. Cardiovasc.*, v.7, p.325-331, 2000.

GIUGLIANO D, CERIELLO A, PAOLISSO G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 19(3):257-67, 1996.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, v.19, p.257-267, 1996.

GLEITER, C.H.; SCHUG, B.S.; HERMANN, R.; ELZE, M.; BLUME, H.H.; GUNDERT-REMY, U. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. *Eur J Clin Pharmacol.*, v.50, n.6, p.513-514, 1996.

GLOGOWSKI EA, TSIANI E, ZHOU X, FANTUS IG, WHITESIDE C. High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int.* 55(2):486-99, 1999.

GO M, SEKIGUCHI K, NOMURA H, KIKKAWA U, NISHIZUKA Y. Further studies on the specificity of diacylglycerol for protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 29;144(2):598-605, 1987.

GOLDBERG, P.B.; KREIDER, M.S.; ROBERTS, J. Effects of age on the adrenergic cardiac neuroeffector junction. *Life Sci.*, v.35, n.26, p.2585-2591, 1984.

GOLDBERG HJ, SCHOLEY J, FANTUS IG. Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes.* 49(5):863-71, 2000.

GOLDSCHMIDT, J.E.; TALLARIDA, R.J. Pharmacological evidence that captopril possesses an endothelium-mediated component of vasodilation: effect of sulfhydryl groups on endothelium-derived relaxing factor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.257, p.1136-1145, 1991.

GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism.* 26(11):1257-75, 1977.

GOLDSTEIN JL, HO YK, BASU SK, BROWN MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(1):333-7, 1979.

GOLEJ J, HOEGER H, RADNER W, UNFRIED G, LUBEC G. Oral administration of methylglyoxal leads to kidney collagen accumulation in the mouse. **Life Sci.**, 63(9):801-7, 1998.

GONZALEZ RG, BARNETT P, AGUAYO J, CHENG HM, CHYLACK LT JR. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. **Diabetes.** 33(2):196-9, 1984.

GONZALEZ, M.A.; SELWYN, A.P. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. **Am. J. Med.**, v.115, v.8A, p.99S-106S, 2003.

GRAF, M.; HALBACH, E.; KAUFMANN, H. Causes of blindness in Hesse in 1996. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, v.215, n.1, p.50-55, 1999.

GRAIER WF, SIMECEK S, STUREK M. Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signalling of Ca<sup>2+</sup> entry in human and bovine endothelial cells. **J Physiol.** 15;482 ( Pt 2):259-74, 1995.

GRAIER WF, HOLZMANN S, HOEBEL BG, KUKOVETZ WR, KOSTNER GM. Mechanisms of L-NG nitroarginine/indomethacin-resistant relaxation in bovine and porcine coronary arteries. **Br J Pharmacol.**, 119(6):1177-86, 1996.

GREENE, D.A.; AREZZO, J.C.; BROWN, M.B. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group. **Neurology.** v.53, n.3, p.580-591, 1999.

GRIENGLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease, **Circ. Res.**, v.86, n.5, p.494-501, 2000.

GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v.320, p.454-456, 1986.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H.J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.9, p.229-234, 1975.

GUTTERIDGE, J.M.; MUMBY, S.; QUINLAN, G.J.; CHUNG, K.F.; EVANS, T.W. Pro-oxidant iron is present in human pulmonary epithelial lining fluid: implications for oxidative stress in the lung. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.220, n.3, p.1024-1027, 1996.

GUZIK TJ, WEST NE, PILLAI R, TAGGART DP, CHANNON KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. **Hypertension**, 39(6):1088-94, 2002.

HAENEN, G.R., PAQUAY, J.B., KORTHOUWER, R.E., BAST, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochem Biophys Res. Commun.**, v.236, n.3, p.591-593, 1997.

HAENEN, G.R.; VERMEULEN, N.P.; TIMMERMAN, H.; BAST, A. Effect of thiols on lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Chem Biol Interact.*, v.71, n.2-3, p.201-212, 1989.

HAGEN, T.M.; INGERSOLL, R.T.; LYKKESFELDT, J.; LIU, J.; WEHR, C.M.; VINARSKY, V.; Bartholomew JC, Ames AB. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.*, v.13, n.2, p.411-418, 1999.

HAKIM LS, GOLDSTEIN I. Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 25(2):379-400, 1996.

HALLIWELL B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp.* 61:73-101, 1995.

HAMA, N.; ITOH, H.; SHIRAKAMI, G.; SUGA, S.; KOMATSU, Y.; YOSHIMASA, T.; TANAKA, I.; MORI, K.; NAKAO, K. Detection of C-type natriuretic peptide in human circulation and marked increase of plasma CNP level in septic shock patients. *Biochemistry and Biophysics Research Communications.* v.198, p.1177-1182, 1994.

HAMILTON CA, BROSINAN MJ, MCINTYRE M, GRAHAM D, DOMINICZAK AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension.* 37(2 Part 2):529-34, 2001.

HAMILTON, C.A.; MCINTYRE, M.; WILLIAMS, R.; BERG, G.; REID, J.L., DOMINICZAK, A.F. Vasorelaxation in response intact rat aorta. *J Physiol.*, v.462, p.735-751, 1997.

HAMMES HP, MARTIN S, FEDERLIN K, GEISEN K, BROWNLEE M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;88(24):11555-8, 1991.

HAMMES, H.P. Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J Diabetes Complications*, v.17, n.2, p.16-9, 2003.

HAMSTEN, A. Hemostatic function and coronary artery disease. *N Engl J Med.*, v.332, p.677-678, 1995.

HANAHAN, D.J. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem.*, v.55, p.483-509, 1986.

HAVSTEEN B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.*, 1;32(7):1141-8 1983.

HART GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem.* 66:315-35, 1997.

HASUMURA, M.; YASUHARA, K.; TAMURA, T.; IMAI, T.; MITSUMORI, K.; HIROSE, M. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-

weeks dietary administration to Wistar rats. **Food Chem Toxicol.**, v.42, n.3, p.439-444, 2004.

HATTORI, Y.; KAWASAKI, H.; ABE, K.; KANNO, M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am. J. Physiol.**, v.261, n.30, p.H1086-H1094, 1991.

HAUGAARD, N.; HAUGAARD, E.S. Stimulation of glucose utilization by thioctic acid in rat diaphragm incubated *in vitro*. **Biochim Biophys Acta**, v.222, p.583-586, 1970.

HAWKINS M, BARZILAI N, LIU R, HU M, CHEN W, ROSSETTI L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. **J Clin Invest.**, 1;99(9):2173-82. 1997.

HAYABUCHI Y, NAKAYA Y, MATSUOKA S, KURODA Y. Endothelium-derived hyperpolarizing factor activates Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 32(4):642-9, 1998.

He GW. Coronary endothelial function in open heart surgery. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 24(12):955-7, 1997.

HEAD, R.J.; LONGHURST, P.A.; PANEK, R.L.; STITZEL, R.E. A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. **Br. J. Pharmacol.**, v.91, p.275-286; 1987.

HECKER, M.; BARA, A.T.; BAUERSACHS, J.; BUSSE, R. Characterization of endothelium-derived hyper-concentration in vascular smooth muscle. Endothelium-Derived Hyperpolarizing polarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. In: **J Physiol Factor Harwood Academic Publishers**. Vanhoutte PM (Eds). Amsterdam, v.481, p.407-414, 1994.

HEIJNEN CG; HAENEN GR; VAN ACKER FA; VAN DER VIJGH WJ; BAST A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. **Toxicol In Vitro.**, v.15, n.1, p.3-6, 2001.

HEITZER, T.; FINCKH, B.; ALBERS, S.; KROHN, K.; KOHLSCHUTTER, A.; MEINERTZ, T. Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v.31, n.1, p.53-61, 2001.

HEMLER, M.E.; LANDS, W.E.M. Evidence for a peroxide initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis. **J. Biol. Chem.**, v.255, p.6253-6261, 1980.

HERBERT, A.A.; GUEST, J.R. Lipoic acid content of Escherichia coli and other microorganisms. **Arch Microbiol.**, v.106, n.3, p.259-266, 1975.

HERRMANN, E.; LERMAN, M. The endothelium: dysfunction and beyond. **J Nucl Cardiol.**, v.8, n.2, p.197-206, 2001.

HERRMANN, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. **Journal of Food Technology**, v.11, p.433-448, 1976.

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Lancet**, v.342, p.1007-1011, 1993.

HEVEL, J.M.; WHITE, K.A.; MARLETTA, M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. **J Biol Chem.**, v.266, n.34, p.22789-22791, 1991.

HINCHMAN, C.A.; BALLATORI, N. Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. **J Toxicol Environ Health**, v.41, p.387-409, 1994.

HINCHMAN, C.A.; MATSUMOTO, H.; SIMMONS, T.W.; BALLATORI, N. Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid; Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. **J Biol Chem.**, v.266, p.22179-22185, 1991.

HINK U, LI H, MOLLNAU H, OELZE M, MATHEIS E, HARTMANN M, SKATCHKOV M, THAISS F, STAHL RA, WARNHOLTZ A, MEINERTZ T, GRIENDLING K, HARRISON DG, FORSTERMANN U, MUNZEL T Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ Res.** 2;88(2):E14-22, 2001.

HINK, U.; OELZE, M.; KOLB, P.; BACHSCHMID, M.; ZOU, M.H.; DAIBER, A.; MOLLNAU, H.; AUGUST, M.; BALDUS, S.; TSILIMINGAS, N.; WALTER, U.; ULRICH, V.; MÜNDEL, T. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. **J Am Coll Cardiol.**, v.42, p.1826-1834, 2003.

HINSCHEN AK, ROSEMEYER RB, HEADRICK JP. Age-related changes in adenosine-mediated relaxation of coronary and aortic smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 280(5):H2380-9, 2001.

HIRAMATSU K, BIERMAN EL, CHAIT A. Metabolism of low-density lipoprotein from patients with diabetic hypertriglyceridemia by cultured human skin fibroblasts. **Diabetes**, 34(1):8-14, 1985.

HOEBEL BG, KOSTNER GM, GRAIER WF. Activation of microsomal cytochrome P450 mono-oxygenase by Ca<sup>2+</sup> store depletion and its contribution to Ca<sup>2+</sup> entry in porcine aortic endothelial cells. **Br J Pharmacol**, 121(8):1579-88, 1997.

HOLMQUIST F, HEDLUND H, ANDERSSON KE. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **J Physiol**, ;449:295-311, 1992.

HONG KW, RHIM BY, LEE WS, JEONG BR, KIM CD, SHIN YW. Release of superoxide-dependent relaxing factor(s) from endothelial cells. **Am J Physiol.** 257(5 Pt 2):H1340-6, 1989.



HONGO, K.; NAKAGOMI, T.; KASSELL, N.F.; SASAKI, T.; LEHMAN, M.; VOLLMER, D.G.; TSUKAHARA T.; OGAWA, H.; TORNER, I. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke*, v.19, n.7, p.1192-897, 1988.

HORI O, BRETT J, SLATTERY T, CAO R, ZHANG J, CHEN JX, NAGASHIMA M, LUNDH ER, VIJAY S, NITECKI D, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem*. 27;270(43):25752-61, 1995.

HORIE K, MIYATA T, MAEDA K, MIYATA S, SUGIYAMA S, SAKAI H, VAN YPERSOLE DE STRIHOUC, MONNIER VM, WITZTUM JL, KUROKAWA K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 15;100(12):2995-3004, 1997.

HORIUCHI, T.; FUJIKI, H.; HAKII, H. Modulation of phorbol ester receptors in mouse skin by application of quercetin. *Japanese Journal of Cancer Research*, v.77, p.526-531, 1981.

HSUEH, W.A.; LAW, R.E. Diabetes is a vascular disease. *J Investig Med.*, v.46, n.8, p.387-90, 1998.

HUANG A, SUN D, SMITH CJ, CONNETTA JA, SHESELY EG, KOLLER A, KALEY G. In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 278(3):H762-8 2000.

HUANG, L.C.; FONTELES, M.C.; HOUSTON, D.B.; LARNER J. Chiroinositol deficiency and insulin resistance. III. Acute and hypoglycemic effects of two inositol phosphoglycan insulin mediators in normal and streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Endocrinology*, v.132, n.2, p.652-657, 1993.

HUANG, L.C.; HEIMARK D.; LINKO J.; NOLAN, R.; LARNER, J. A model phosphatase 2C phosphatase 1 activation cascade via dual control of inhibitor-1 (INH-1) and DARPP-32 dephosphorylation by two inositol glycan putative insulin mediators from beef liver. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.255, n.1, p.150-156, 1999.

HUANG, P.L.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCK, K.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BEVAN, J.A. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, v.337, p.239-242, 1995.

HUIE, R.E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.*, v.18, n.4, p.195-199, 1993.

HUIJBERTS MS, WOLFFENBUTTEL BH, BOUDIER HA, CRIJNS FR, KRUSEMAN AC, POITEVIN P, LEVY BI. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest.*, 92(3):1407-11, 1993.

HUNT, J.V.; DEAN, R.T.; WOLFF, S.P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. **Biochem J.**, v.256, n.1, p.205-12, 1988.

HUTCHESON IR, CHAYTOR AT, EVANS WH, GRIFFITH TM. Nitric oxide-independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication. Role of Gap junctions and phospholipase A2. **Circ Res.** 8-22;84(1):53-63, 1999.

HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The mechanisms and significance of the coupled release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) from endothelial cells. **Wien Klin Wochenschr**, v.103, p.422-34, 1991.

IGNARRO LJ, DEGNAN JN, BARICOS WH, KADOWITZ PJ, WOLIN MS. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochim Biophys Acta.** 17;718(1):49-59, 1982.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension.**, v.16, n.5, p.477-483, 1990.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.84, n.24, p.9265-9269, 1987.

IGNARRO, L.J.; BUSH, P.A.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; FUKUTO, J.M.; RAJFER, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.170, n.2, p.843-850, 1990.

IGNARRO, L.J.; HARBISON, R.G.; WOOD, K.S.; WOLIN, M.S.; MCNAMARA, D.B.; HYMAN, A.L. KADOWITZ, P.J. Differences in responsiveness of intrapulmonary artery and vein to arachidonic acid: mechanism of arterial relaxation involves cyclic guanosine 3':5'-monophosphate and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.233, n.3, p.560-569, 1985.

IGNARRO, L.J.; LIPPTON, H.; EDWARDS, J.C.; BARICOS, W.H.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J.; GRUETTER, C.A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.218, n.3, p.739-749, 1981.

IKEDA, K.; NARA, Y.; KOBAYASHI, Y.; HATTORI, K.; YAMORI, Y. Age-related blood pressure lowering effect of dietary L-arginine in stroke-prone spontaneously rats (SHRSP). In Hypertension, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, Genetic, J. Sassard (Eds.) Paris, v. 218, p. 15-17, 1992.

IKEZONO, K.; ZERKOWSKI, H.R.; BECKERINGH, J.J.; MICHEL, M.C.; BRODDE, O. E- $\beta_2$ - adrenoceptor mediated relaxation of the isolated human saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v.241, p.294-299, 1987.

INOUCHI T, BATTAN R, HANDLER E, SPORTSMAN JR, HEATH W, KING GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.15;89(22):11059-63, 1992.

INOUCHI T, LI P, UMEDA F, YU HY, KAKIMOTO M, IMAMURA M, AOKI T, ETOH T, HASHIMOTO T, NARUSE M, SANO H, UTSUMI H, NAWATA H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 49(11):1939-45, 2000.

INOUCHI, T.; TSUBOUCHI, H.; ETOH, T.; KAKIMOTO, M.; SONTA, T.; UTSUMI, H.; SUMIMOTO, H.; YU, H.Y.; SONODA, N.; INUO, M.; SATO, N.; SEKIGUCHI, N.; KOBAYASHI, K.; NAWATA, H. A possible target of antioxidative therapy for diabetic vascular complications-vascular NAD(P)H oxidase. *Curr Med Chem.*, v. 10, n.17, p.1759-1764, 2003.

IRION GL, VASTHARE US, Tuma RF. Age-related change in skeletal muscle blood flow in the rat. *J Gerontol*. 42(6):660-5, 1987.

ISHII, K.; FURUTA, T.; KASUYA, Y. Determination of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, v.759, n.1, p.161-18, 2001.

IWAI, N.; KATSUYA, T.; ISHIKAWA, K.; MANNAMI, T.; OGATA, J.; HIGAKI, J. Human prostacyclin synthase gene and hypertension: *The Suita Study*. *Circulation*, v.100, p.2231-2236, 1999.

JACHEC W; TOMASIK A; TARNAWSKI R; CHWALINSKA E. Evidence of oxidative stress in the renal cortex of diabetic rats: favourable effect of vitamin E. *Scand J Clin Lab Invest.*, v.62, n.1, p.81-88, 2002;.

JACOB, S.; HENRIKSEN, E.J.; SCHIEMANN, A.L.; SIMON, I.; CLANCY, D.E.; TRITSCHLER, H.J.; JUNG, W.I.; AUGUSTIN, H.J.; DIETZE, G.J. Enhancement of glucose disposal in patients with type 2 diabetes by alpha-lipoic acid. *Arzneimittelforschung*, v.45, p.872-874, 1995.

JACOB, S.; HENRIKSEN, E.J.; TRITSCHLER, H.J.; AUGUSTIN, H.J.; DIETZE, G.J. Improvement of insulin-stimulated glucose-disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v.104, p.284-288, 1996.

JAFFE, E.A. Physiologic functions of normal endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci.*, v.454, p.279-291, 1985.

JAGROOP, I.A.; BERWANGER, C.S.; STANSBY, G.; MIKHAILIDIS, D.P. Plasma endothelin-1 concentrations in non-insulin-dependent diabetes mellitus and nondiabetic patients with chronic arterial obstructive disease of the lower limbs. *Int Angiol.*, v.18, n.1, p.77-79, 1999.

JAIN, S.K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J. Biol. Chem.*, v.264, p.21340-21345, 1989.

JAKOBY, W.B. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, v.46, p.383-414, 1978.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.*, v. 9, n.6, p.515-540, 1990.

JANSSEN L.J. Are endothelium-derived hyperpolarizing and contracting factors isoprostanes? *Trends Pharmacol Sci.* 23(2):59-62. 2002.

JANSSEN, L.J. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am. J. Physiol.*, v.280, p.L1067-L1082, 2001.

JANSSON, J.H.; NILSSON, T.K.; JOHNSON, O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J.*, v.66, p.351-355, 1991.

JENSEN T, STENDER S, DECKERT T. Abnormalities in plasmas concentrations of lipoproteins and fibrinogen in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with increased urinary albumin excretion. *Diabetologia.*31(3):142-5, 1988.

JENSEN-URSTAD K, JOHANSSON J. GENDER difference in age-related changes in vascular function. *J Intern Med.* 250(1):29-36, 2001.

JEREMY, J.Y.; MIKHAILIDIS, D.P.; DANDONA, P. Muscarinic stimulation of prostacyclin synthesis by the rat penis. *Eur J Pharmacol.*, v.123, n.1, p.67-71, 1986b.

JEREMY, J.Y.; MORGAN, R.J.; MIKHAILIDIS, D.P.; DANDONA, P. Prostacyclin synthesis by the corpora cavernosa of the human penis: evidence for muscarinic control and pathological implications. *Prostaglandins Leukot Med.*, v.23, n.2-3, p.211-216, 1986a.

JEREMY, J.Y.; THOMPSON, C.S.; MIKHAILIDIS, D.P.; DANDONA, P. Experimental diabetes mellitus inhibits prostacyclin synthesis by the rat penis: pathological implications. *Diabetologia*, v.28, n.6, p.365-368, 1985.

JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, S.J.; SCALES K.M.; CUSCO, J.A.; LEE, B.K.; CREAGER, M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.*, v. 88, p.2510-2516, 1993.

JOLY, G.A.; AYRES, M.; CHELLY, F.; KILBOURN, R.G. Effects of NG-methyl-L-arginine, NG-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible

nitric oxide synthase in rat aorta. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.199, n.1, p.147-154, 1994.

JONES, A.F.; WINKLES, J.W.; JENNINGS, P.E.; FLORKOWSKI, C.M.; LUNEC, J.; BARNETT, A.H. Serum antioxidant activity in diabetes mellitus. **Diabetes Res.**, v.7, n.2, p.89-92, 1988.

JONES, S.A.; O'DONNELL, V.B; WOOD, J.D., BROUGHTON, J.P., HUGHES, E.J., JONES O.T. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, v.271, n.4 Pt. 2, p.H1626-H1634, 1996.

JULIUS S. The therapeutic dilemma of hypertension in the elderly. **Drugs**, v.36, n.1, p.7-17, 1988.

KADIOGLU, A.; MEMISOGLU, K.; SAZOYA, O.; TUZUN, E. Intracavernosal endothelin levels of impotent men before and after papaverine induced penile erection. **Arch Esp Urol.**, v. 51, n.7, p.739-740, 1998.

KAKOKI, M.; HIRATA, Y.; HAYAKAWA, H.; TOJO, A.; NAGATA, D.; SUZUKI, E.; KIMURA, K.; GOTO, A.; KIKUCHI, K.; NAGANO, T.; OMATA, M. Effects of hypertension, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia on endothelin type B receptor-mediated nitric oxide release from rat kidney. **Circulation**, v.99, p.1242-1248, 1999.

KALYANARANMAN, B.; MASON, R.P.; TAINER, B.; ELING, T.E. The free radical formed during the hydroperoxide-mediated deactivation of ram seminal vesicles is hemoprotein-derived. **J Biol Chem**, v.257, p.4764-4768, 1982.

KAMATA, K.; HOSOKAWA, M. Endothelial dysfunction in the perfused kidney from the streptozotocin-induced diabetic rat. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, v.96, p.57-70, 1997.

KAMATA, K.; MIYATA, N.; KASUYA, Y. Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.97, p.614-618, 1989.

KAMATA, K.; YAMASHITA, K. Insulin resistance and impaired endothelium-dependent renal vasodilatation in fructose-fed hypertensive rats. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, v.103, p.195-210, 1999.

KANETO H, FUJII J, MYINT T, MIYAZAWA N, ISLAM KN, KAWASAKI Y, SUZUKI K, NAKAMURA M, TATSUMI H, YAMASAKI Y, TANIGUCHI N. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. **Biochem J.** 15;320 ( Pt 3):855-63, 1996.

KANG, J.H. Modification and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by methylglyoxal. **Mol Cells.**, v.15, n.2, p.194-199, 2003.

KANNER, J., HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. **Lipids**, v.27, p.46-49, 1992.

KANNER, J.; HAREL, S., GRANIT, R. Nitric oxide as an antioxidant. **Arch Biochem Biophys.**, v.289, n.1, p.130-136, 1991.

KARAKI, H.; NAKAGAWA, H.; URAKAWA, N. Age-related changes in the sensitivity to verapamil and sodium nitroprusside of vascular smooth muscle of rabbit aortae. **Br J Pharmacol**, v.85, p.223-228, 1985.

KATUSIC, Z.S.; SCHUGEL, J.; CONSENTINO, F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. **Am. J. Physiol**, v.264, p.H859-H864; 1993.

KATUSIC, Z.S.; VANHOUTTE, P.M. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. **Am. J. Physiol.**, v.257, p.H33-H37, 1989.

KATZ, S.D.; KRUM, H. Acetylcholine-mediated vasodilation in the forearm circulation of patients with heart failure: Indirect evidence for the role of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **American Journal of Cardiology**, v.87, p.1089-1092, 2001.

KAWABATA, T.; PACKER, L. Alpha-lipoate can protect against glycation of serum albumin, but not low density lipoprotein. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.203, n.1, p.99-104, 1994.

KEEGAN, A.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E. Corpus cavernosum dysfunction in diabetic rats: effects of combined alpha-lipoic acid and gamma-linolenic acid treatment. **Diabetes Metab Res Rev.**, v.17, n.5, p.380-386, 2001.

KEEGAN, A.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E.. Effects of diabetes and treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. **Diabetologia**, v.42, n.3, p.343-350, 1999.

KEHRER, J.P.; LUND, L.G. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. **Free Rad Biol Med.**, v.17, p.65-75, 1994.

KEMP BK, COCKS TM. Evidence that mechanisms dependent and independent of nitric oxide mediate endothelium-dependent relaxation to bradykinin in human small resistance-like coronary arteries. **Br J Pharmacol**. 120(5):757-62, 1997.

KENNEDY, L.; BAYNES, J.W. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. **Diabetologia**, v.28, p.93-98, 1984.

KENNINGTON, A.S.; HILL, C.R.; CRAIG, J.; BOGARDUS, C.; RAZ, I.; ORTMAYER, H.K.; HANSEN, B.C.; ROMERO, G.; LARNER, J. Low urinary chiro-inositol excretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med.**, v.323, n.6, p.373-378, 1990.

KEOGH RJ, DUNLOP ME, LARKINS RG. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. **Metabolism**. 46(1):41-7, 1997.

KERWIN JR, J.F.; LANCASTER JR, J.R.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **J Med Chem.**, v.38, n.22, p.4343-4362, 1995.

KESSLER P, LISCHKE V, HECKER M. Etomidate and thiopental inhibit the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human renal artery. **Anesthesiology.**, 84(6):1485-8, 1996.

KHAMAISSI, M.; RUDICH, A.; POTASHNIK, R.; TRITSCHLER, H.J.; GUTMAN, A.; BASHAN, N. Lipoic acid acutely induces hypoglycemia in fasting nondiabetic and diabetic rats. **Metabolism.** , v.48, n.4, p.504-510, 1999.

KHAN F, COHEN RA, RUDERMAN NB, CHIPKIN SR, COFFMAN JD. Vasodilator responses in the forearm skin of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Vasc Med**. 1(3):187-93, 1996.

KIFF RJ; GARDINER SM; COMPTON AM; BENNETT T. The effects of endothelin-1 and NG-nitro-L-arginine methyl ester on regional haemodynamics in conscious rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Br J Pharmacol.**, v.103, n.2, p.1321-136, 1991.

KIHARA ,M.; LOW, PA. Impaired vasoreactivity to nitric oxide in experimental diabetic neuropathy. **Exp Neurol.**, v.132, n.2, p.180-185, 1995.

KIKUCHI, S.; SHINPO, K.; TAKEUCHI, M.; YAMAGISHI, S.; MAKITA, Z.; SASAKI, N.; TASHIRO K. Glycation-a sweet tempter for neuronal death. **Brain Res Brain Res Rev.**, v.41, n.2-3, p.306-323, 2003.

KILBOURN, R.G.; BELLONI, P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1 or endotoxin. **J Natl Cancer Inst.**, v.82, p.772-776, 1990.

KILHOVD BK, GIARDINO I, TORJESEN PA, BIRKELAND KI, BERG TJ, THORNALLEY PJ, BROWNLEE M, HANSEN KF. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, 52(2):163-7, 2003.

KIM ,N.; AZADZOI, K.M.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ, DE TEJADA, I. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. **J Clin Invest.**, v.88, n.1, p.112-118, 1991.

KIM, N.; VARDI, Y.; PADMA-NATHAN, H.; DALEY, J.; GOLDSTEIN, I.; DE TEJADA, I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. **J Clin Invest.**, v.91, n.2, p.437-442, 1993.

KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, n.9, p.1414-1431, 1998.

KINGWELL, B.A.; FORMOSA, M.; MUHLMANN, M.; BRADLEY, S.J.; MCCONEL, L. GK. Type 2 diabetic individuals have impaired leg blood flow responses to exercise: role of endothelium-dependent vasodilation. **Diabetes Care**, v.26, n.3, p.899-904, 2003.

KIRSTEIN M, ASTON C, HINTZ R, VLASSARA H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. **J Clin Invest.**, 90(2):439-46, 1992.

KISHI, Y.; SCHMELZER, J.D.; YAO, J.K.; ZOLLMAN, P.J.; NICKANDER, K.K.; TRITSCHLER, H.J.; LOW, P.A.. Alpha-lipoic acid: effect on glucose uptake, sorbitol pathway, and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v.48, n.10, p.2045-2051, 1999.

KLIP, A.; PAQUET, M.R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. **Diabetes Care**, v.13, n.3, p.228-243, 1990.

KNIGHT, R.J.; KOFOED, K.F.; SCHELBERT, H.R.; BUXTON, D.B. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in post-ischaemic myocardium. **Cardiovasc Res.**, v.32, n.6, p.1016-1023, 1996.

KNISPEL, H.H; GOESSL, C.; BECKMANN, R. Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. **J Urol.**, v.146, n.5, p.1429-1433, 1991.

KNISPEL, H.H; GOESSL, C.; BECKMANN, R. Nitric oxide mediates relaxation in rabbit and human corpus cavernosum smooth muscle. **Urology Res.**, v.20, n.4, p.253-257, 1992.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J.**, v.298, n. Pt 2, p.249-258, 1994.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.86, n.13, p.5159-5162, 1989.

KNOWLES, R.G.; SALTER, M.; BROOKS, S.L.; MONCADA, S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.172, n.3, p.1042-1048, 1990.

KO FN, HUANG TF, TENG CM. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. **Biochim Biophys Acta.**, 14;1115(1):69-74, 1991.



KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Relationship among cholesterol, superoxide anion and endothelium-dependent relaxation in diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v.367, p.213-22, 1999.

KOBZIK, L.; BREDT, D.S.; LOWENSTEIN, C.J.; DRAZEN, J.; GASTON, B.; SUGARBAKER D.; STAMLER J.S. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.9, n.4, p.371-7, 1993.

KOCAK, G.; AKTAN, F.; CANBOLAT, O.; OZOGUL, C.; ELBEG, S.; YILDIZOGLU-ARI, N.; KARASU, C. Study Group-Antioxidants in Diabetes-Induced Complications Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. **Diabetes Nutr Metab.**, v.13, n.6, p.308-318, 2000.

KOENIG, R.J.; PETERSON, C.M.; JONES, R.L.; SAUDEK, C.; LEHRMAN, M.; CERAMI, A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetes mellitus. **N Eng J Med**, v.295, p.417-420, 1976.

KOGA, T.; TAKATA, Y.; KOBAYASHI, K.; TAKISHITA, S.; YAMASHITA, Y.; FUJISHIMA, M. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. **Hypertension**, v.14, n.5, p.542-548, 1989.

KOGA, T.; TAKATA, Y.; KOBAYASHI, K.; TAKISHITA, S.; YAMASHITA, Y.; FUJISHIMA, M. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v.6, p.4, p.S243-S245, 1988.

KOKOSZKA JE, COSKUN P, ESPOSITO LA, WALLACE DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 27;98(5):2278-83, 2001.

KOLM-LITTY V, TIPPMER S, HARING HU, SCHLEICHER E. Glucosamine induces translocation of protein kinase C isoenzymes in mesangial cells. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**.106(5):377-83, 1998.

KONTOS, H.A.; GEORGE, E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. **Circ Res.**, v.57, n.4, p.508-516, 1985.

KORSHUNOV, S.S.; KORKINA, O.V.; RUUGE, E.K.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O<sub>2</sub>·- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by mitochondria in the resting state. **FEBS Lett.**, v.435, n.2-3, p.215-218, 1998.

KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; MALO-RANTA, U.; RISTIMAKI, A.; MOILANEN, E. Inhibition by nitric oxide releasing compounds of prostacyclin production in human endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v.125, p.247-254, 1998.

KOYA D, JIROUSEK MR, LIN YW, ISHII H, KUBOKI K, KING GL. haracterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. **J Clin Invest.**, 1;100(1):115-26, 1997.

KOYA D, HANEDA M, NAKAGAWA H, ISSHIKI K, SATO H, MAEDA S, SUGIMOTO T, YASUDA H, KASHIWAGI A, WAYS DK, KING GL, KIKKAWA R. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. **FASEB J.**, 14(3):439-47, 2000.

KOYA, D., KING, G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes.**, v.47, n.6, p.859-866, 1998.

KRALL, J.F., CONNELLY, M.; WEISBART, R.; TUCK, M.L. Age-related elevation of plasma catecholamine concentration and reduced responsiveness of lymphocyte adenylate cyclase. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.52, n.5, p.863-867, 1981.

KRANE, R.J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Impotence. **N Engl J Med.**, v.321, n.24, p.1648-1659, 1989.

KREISBERG JI, AYO SH. The glomerular mesangium in diabetes mellitus. **Kidney Int.**, 43(1):109-13, 1993.

KROP, J.S.; SAUDEK, C.D.; WELLER, W.E.; POWE, N.R.; SHAFFER, T.; ANDERSON, G.F. Predicting expenditures for Medicare beneficiaries with diabetes. A prospective cohort study from 1994 to 1996. **Diabetes Care.**, v.22, n.10, p.1660-1666, 1999.

KRUMPASZKY, H.G.; LUDTKE, R.; MICKLER, A.; KLAUSS, V.; SELBMANN, H.K. Blindness incidence in Germany. A population-based study from Wurttemberg-Hohenzollern. **Ophthalmologica.**, v.213, n.3, p.176-182, 1999.

KUBOKI K, JIANG ZY, TAKAHARA N, HA SW, IGARASHI M, YAMAUCHI T, FEENER EP, HERBERT TP, RHODES CJ, KING GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. **Circulation.** 15;101(6):676-81, 2000.

KUGIYAMA, K.; OHGUSHI, M.; MOTOYAMA, T.; HIRASHIMA, O.; SOEJIMA, H.; MISUMI, K.; YOSHIMURA, M.; OGAWA, H.; SUGIYAMA, S.; YASUE, H. Intracoronary infusion of reduced glutathione improves endothelial vasomotor response to acetylcholine in human coronary circulation. **Circulation**, v.97, p.2299-2301, 1998.

KÜHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Rev Nutr Diet.**, v.24, p.117-191, 1976.

KUKOVETZ, W.R.; HOLZMANN, S.; WURM, A.; PÖCH, G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. **J Cyclic Nucleotide Res.**, v. 5, p.469-476, 1979.

KULKARNI, R.N.; BRUNING, J.C.; WINNAY, J.N.; POSTIC, C.; MAGNUSON, M.A.; KAHN, C.R. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell.*, v.96, n.3, p.329-339, 1999a.

KULKARNI, R.N.; WINNAY, J.N.; DANIELS, M.; BRUNING, J.C.; FLIER, S.N.; HANAHAN, D.; KAHN, C.R. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest.*, v.104, n.12, p.R69-75, 1999b.

KUNG, C.F.; LÜSCHER, T.F. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension*, v.25, p.194-200, 1995.

KUNT T, FORST T, HARZER O, BUCHERT G, PFUTZNER A, LOBIG M, ZSCHABITZ A, STOFFT E, ENGELBACH M, BEYER J. The influence of advanced glycation endproducts (AGE) on the expression of human endothelial adhesion molecules. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, 106(3):183-8, 1998.

KURIYAMA H, SUZUKI H. The effects of acetylcholine on the membrane and contractile properties of smooth muscle cells of the rabbit superior mesenteric artery. *Br J Pharmacol.*, 64(4):493-501, 1978.

LACY PS, PILKINGTON G, HANVESAKUL R, FISH HJ, BOYLE JP, THURSTON H. Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol.*, 129(3):605-11, 2000.

LACZA, Z.; LÁSZLÓ, D.; KÁLDI, K.; HORVÁTH, P.S.; BENYÓ, Z. Prostacyclin-mediated compensatory mechanism in the coronary circulation during acute NO synthase blockage. *Life Sciences*, v. 73, p.1141-1149, 2003.

LAL MA, KORNER A, MATSUO Y, ZELENIN S, CHENG SX, JAREMKO G, DIBONA GF, EKLOF AC, Aperia A. Combined antioxidant and COMT inhibitor treatment reverses renal abnormalities in diabetic rats. *Diabetes.*, 49(8):1381-9, 2000.

LAMAS, S.; MARSDEN, P.A.; LI, G.K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.89, n.14, p.6348-6352, 1992.

LAMONTAGNE, D.; KONIG, A.; BASSENGE, E.; BUSSE, R. Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J Cardiovasc Pharmacol*, v.20, p.652-657, 1992.

LANG, M.G.; NOLL, G.; LUCHER, T.F. Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: Modulation by endothelial factors. *Am J Physiol.*, v.269, p.H837-H844, 1995.

LARNER, J. D-chiro-inositol in insulin action and insulin resistance-old-fashioned biochemistry still at work. *IUBMB Life*, v.51, n.3, p.139-148, 2001.

LARNER, J. D-chiro-inositol- Its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance *Int. Jnl. Experimental Diab. Res.*, v.3, p.47-60, 2002.

LARNER, J.; ALLAN, G.; KESSLER, C.; REAMER, P.; GUNN, R.; HUANG, L.C. Phosphoinositol glycan derived mediators and insulin resistance. Prospects for diagnosis and therapy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, v.9, n.2-4, p.127-137, 1998.

LARNER, J.; CRAIG, J.W.. Urinary myo-inositol-to-chiro-inositol ratios and insulin resistance. *Diabetes Care*, v.19, n.1, p.76-78, 1996.

LARNER, J.; HUANG, L.C. Identification of a novel inositol glycan signaling pathway with significant therapeutic relevance to insulin resistance: an insulin signaling model using both tyrosine kinase and G-proteins. *Diabetes Review*, v.3, p.217-229, 1999.

LARNER, J.; HUANG, L.C.; SCHWARTZ, C.F.; OSWALD, A.S.; SHEN, T.Y.; KINTER, M.; TANG, G.Z.; ZELLER, K. Rat liver insulin mediator which stimulates pyruvate dehydrogenase phosphate contains galactosamine and D-chiroinositol. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.151, n.3, p1416-1426, 1988.

LARNER, J.; PRICE, J.D.; HEIMARK, D.; SMITH, L.; RULE, G.; PICCARIELLO, T.; FONTELES, M.C.; PONTES, C.; VALE, D.; HUANG, L. Isolation; structure; synthesis; and bioactivity of a novel putative insulin mediator. A galactosamine chiro-inositol pseudo-disaccharide Mn<sup>2+</sup> chelate with insulin-like activity. *J Med Chem.*, v.46, n.15, p.3283-3291, 2003.

LARNER, J.; ROMERO, G.; KENNINGTON, A.S.; LILLEY, K.; KILGOUR, E.; ZHANG, C.; HEIMARK, D.; GAMEZ, G.; HOUSTON, D.B.; HUANG, L.C. Duality in the mechanism of action of insulin. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, v.24, p.290-294, 1990.

LARSEN, M.L.; HORDER, M.; MOGENSEN, E.F. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, v.323, p.1021-1025, 1990.

LASSEGUE B, SORESCU D, SZOCS K, YIN Q, AKERS M, ZHANG Y, GRANT SL, LAMBETH JD, GRIENDLING KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.*, 11;88(9):888-94, 2001.

LAWSON, D.L.; NICHOLS, W.W.; MEHTA, P.; MEHTA, J.L. Captopril-induced reversal of nitroglycerin tolerance: role of sulfhydryl group vs. ACE-inhibitory activity. *J Cardiovasc Pharmacol*, v.17, p.411-418, 1991.

LEDL, F.; SCHLEICHER, E. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v.6, p.565-594, 1990.

LEE A.Y.; CHUNG S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.*, v.13, n.1, p.23-30, 1999.

LEE H.C.; WEI Y.H. Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. **Biogerontology**, v.2, n.4, p.231-244, 2001.

LEE AY, CHUNG SK, CHUNG SS. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, . 28;92(7):2780-4, 1995.

LEE, M.R.; LI, L.; KITAZAWA, T. Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. **J Biol Chem.**, v.272, n.8, p.5063-5068, 1997.

LENAZ, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. **Biochim Biophys Acta**, v.1366, n.1-2, p.53-67, 1998.

LERMAN, A.; HILDEBRAND JR., F.L.; AARHUS, L.L.; BURNETT JR, J.C.; Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations. **Circulation**, v.83, n.5, p.1808-1814, 1991.

LERNER, S.E.; MELMAN A.; CHRIST; G.J. A review of erectile dysfunction: new insights and more questions. **J Urol.**, v.149, n.5 Pt 2, p.1246-1255, 1993.

LI YM, MITSUHASHI T, WOJCIECHOWICZ D, SHIMIZU N, LI J, STITT A, HE C, BANERJEE D, VLASSARA H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 1;93(20):11047-52, 1996.

LI, P.L.; CAMPBELL, W.B. Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. **Circ. Res.**, v.80, p.877-884, 1997.

LIDBURY, P.S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Interactions of iloprost and sodium nitroprusside on vascular smooth muscle and platelet aggregation. **Br. J. Pharmacol.**, v.98, p.1275-1280, 1989.

LIM, H.; GUPTA, R.A.; MA, W.; PARIA, B.C.; MOLLER, D.E.; MORROW, J.D. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR $\delta$ . **Genes Dev**, 13:1561-1574, 1999.

LIU, S.; BECKMAN, J.S.; KU, D.D. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.268, n.3, p.1114-1121, 1994.

LOMAESTRO, B.M.; MALONE, M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. **Annals Pharmacother**, v.29, p.1263-1273, 1995.

LONERGAN, E.T.; KREVANS, M.D. A national agenda for research on aging. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p.1825-1828, 1991.

LOPES-VIRELLA MF, SHERER GK, LEES AM, WOHLTMANN H, MAYFIELD R, SAGEL J, LEROY EC, COLWELL JA. Surface binding, internalization and degradation by cultured human fibroblasts of low density lipoproteins isolated from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: changes with metabolic control. *Diabetologia.*, 22(6):430-6, 1982.

LOPEZ BL; SNYDER JW; BIRENBAUM DS; MA XI. N-acetylcysteine enhances endothelium-dependent vasorelaxation in the isolated rat mesenteric artery. *Ann Emerg Med.*, v. 32, n.4, p.405-410, 1998.

LOSCALZO, J. N-Acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin. *J Clin Invest*, v.76, p.703-708, 1985.

LOUNSBURY, K.M.; HU, Q.; ZIEGELSTEIN, R.C. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med.*, v.28, n.9, p.1362-1369, 2000.

LOW, P.A.; LAGERLUND, T.D.; MCMANIS, P.G. Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic, and ischemic neuropathy. *Int Rev Neurobiol.*, v.31, p.355-438, 1989.

LU, M.H.; CHAO, C.F.; CHIN, Y.H.; YU, K.R.; PAI, L. The correlation of blood pressure, age and endothelin-1 b, age and endothelin-1 binding sites in aortic smooth muscle cells of rats. *Jpn. Circ. J.*, v.62, p.532-536, 1998.

LÜDMER, P.L.; SEEWYN, A.P.; SHOOK, L.T.; WAYNE, R.R.; MUDGE, G.H.; ALEXANDER, R.W.; GANZ, P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in arteriosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.*, v.315, p.1046-1051, 1986.

LUE TF, LEE KL. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Chin Med J (Engl.)*, 113(4):291-8, 2000.

LUE, T.F. Erectile dysfunction. *N Engl J Med.*, v.342, n.24, p.1802, 2000.

LUM H, MALIK AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol.* 267(3 Pt 1):L223-41, 1994.

LUNDMAN, P.; ERIKSSON M.J.; SCHENK-GUSTAFSSON K.; KARPE F.; TORNWALL, P. Transient trygliceridemia decreases vascular reactivity in young, health men without risk factors for coronary heart disease. *Circulation*, v.96, p.3266-3268, 1997.

LUNDMAN, P.; ERIKSSON, M.J.; STÜHLINGER, COOKE, J.P.; HAMSTEN, A.; TORNWALL, P. Mild-to-moderate hypertrygliceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentration of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol*, v.38, p.111-116, 2001.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, v.407, n.6801, p.233-241, 2000.

- LYKKESFELDT, J.; HAGEN, T.M.; VINARSKY, V.; AMES, B.N. Age-associated decline in ascorbic acid concentration, recycling, and biosynthesis in rat hepatocytes--reversal with (R)-alpha-lipoic acid supplementation. *FASEB J.*, v.12, n.12, p.1183-1189, 1998.
- LYONS, C.R.; ORLOFF, G.J.; CUNNINGHAM, J.M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.*, v.267, n.9, p.6370-6374, 1992.
- LYONS, T.J.; KENNEDY, L. Non-enzymatic glycosylation of skin collagen in patients with limited joint mobility. *Diabetologia*, v.28, n.2-5, 1985.
- MCCANCE DR, CROWE G, QUINN MJ, SMYE M, KENNEDY L. Incidence of microvascular complications in type 1 diabetic subjects with limited joint mobility: a 10-year prospective study. *Diabet Med*, 10(9):807-10, 1993.
- MADDUX, B.A.; SEE W.; LAWRENCE JR., J.C.; GOLDFINE, A.L.; GOLDFINE, I.D.; EVANS, J.L.. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*, v.50, n.2, p.404-410, 2001.
- MAILLARD, L.C. Action des acides amines sur les sucres; Formation des melanoidines par voie methodique. *C R Acad Sci*, v. 154:66, 1912.
- MAITRA, I.; SERBINOVA, E.; TRISCHLER, H.; PACKER L. Alpha-lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Free Radic Biol Med.*, v.18, n.4, p.823-829, 1995.
- MAKITA, Z.; VLASSARA, H.; CERAMI, A.; BUCALA, R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.5133-5138, 1992.
- MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; DEMIGNE, C.; TEXIER, O.; REGERAT, F.; REMESY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.*, v. 426, n.3, p.331-336, 1998.
- MANNERVIK B, RIDDERSTROM M. Catalytic and molecular properties of glyoxalase I. *Biochem Soc Trans.* 21(2):515-7, 1993.
- MANNERVIK, B. The isoenzymes of glutathione transferase. *AdIJ Enzymol Relat Areas Mol Biol*, v. 57, p.357-417, 1985.
- MANTELLI, L.; AMERINI, S.; LEDDA, F. Bradikynin-induced vasodilatation is changed to a vasoconstrictor response in vessels of aged normotensive and hypertensive rats. *Inflamm. Res.*, v.44, p.70-73, 1995.
- MARCELÍN-JIMÉNEZ, G.; ESCALANTE, B. Functional and cellular interactions between nitric oxide and prostacyclin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* , v.129, p.349-359, 2001.

MARCHENKO, S.M.; SAGE, S.O. Calcium activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. **J. Physiol.**, v.492, p.53-60, 1996.

MARIN, J. Age-related changes in vascular responses: a review. **Mech Ageing Dev.**, v.79, n.2-3, p.71-114, 1995.

MARIN, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol Ther.**, v.75, 2, p.111-34, 1997.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. 3rd. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nutr Biochem.**, v.14, n.5, p.288-294, 2003.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell.** v.78, n.6, p.927-930, 1994.

MARSDEN, P.A.; HENG, H.H.; SCHERER, S.W.; STEWART, R.J.; HALL, A.V.; SHI, X.M.; TSUI, L.C.; SCHAPPERT, K.T. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **J Biol Chem.**, v.268, n.23, p.17478-17488, 1993.

MARSDEN, P.A.; SCHAPPERT, K.T.; CHEN, H.S.; FLOWERS, M.; SUNDELL, C.L.; WILCOX, J.N.; LAMAS, S.; MICHEL, T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Lett.**, v.307, n.3, p.287-293, 1992.

MARSHALL S, BACOTE V, TRAXINGER RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **J Biol Chem. Mar**, 15;266(8):4706-12, 1991.

MARTIN, E.; DAVIS, K.; BIAN, K.; LEE, Y.C.; MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. **Semin Perinatol.**, v. 24, n.1, p.2-6, 2000.

MATO, J.M.; KELLY, K.L.; ABLER, A.; JARETT, L. Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells. **J Biol Chem.**, v.262, n.5, p.2131-2137, 1987.

MATTHEWS, J.S.; MCWILLIAMS, P.J.; KEY, B.J.; KEEN, M. Inhibition of prostacyclin release from cultured endothelial cells by nitrovasodilator drugs. **Biochim Biophys Acta**, v.1269, p.237-242, 1995.

MATTULAT, A.; BALTES, W. Determination of lipoic acid in meat of commercial quality. **Z Lebensm Unters Forsch.**, v.194, n.4, p.326-329, 1992.

MAYHAN WG, SIMMONS LK, SHARPE GM. Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. **Am J Physiol.**, 260(2 Pt 2):H319-26, 1991.



MAYER B, PFEIFFER S, SCHRAMMEL A, KOESLING D, SCHMIDT K, BRUNNER F. A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. **J Biol Chem.**, 6;273(6):3264-70, 1998.

MAYER, B.; JOHN, M.; HEINZEL, B.; WERNER, E.R.; WACHTER, H.; SCHULTZ, G.; BOHME, E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. **FEBS Lett.**, v. 288, n.1-2, p.187-91, 1991.

MAYHAN, W.G.; FARACI, F.M.; BAUMBACH, G.L.; HEISTAD, D.D. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. **Am. J. Physiol.**, v., 258, p.H1138-H1143, 1990.

MCCALL, T.; VALLANCE, P. Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. **Trends Pharmacol Sci.**, v.13, n.1, p.1-6, 1992.

MCCALL, T.B.; BOUGHTON-SMITH, N.K.; PALMER, R.M.; WHITTLE, B.J.; MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. **Biochem J.**, v.261, n.1, p.293-296, 1989.

MCKINLAY, J.B. The worldwide prevalence and epidemiology of erectile dysfunction. **Int J Impot Res.**, v. 4, p.S6-S11, 2000.

MCVEIGH GE, BRENNAN GM, JOHNSTON GD, MCDERMOTT BJ, MCGRATH LT, HENRY WR, ANDREWS JW, HAYES JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia.** 35(8):771-6, 1992.

MEISTER, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. **Cancer Res**, v.54, p.1969S-1975S, 1994.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J Biol Chem**, v.269, p.9397-9400, 1994.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p.711-760, 1983.

MEISTER, A.; TATE, S.S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annu Rev Biochem.**, v.45, p.559-604, 1976.

MEKATA F. The role of hyperpolarization in the relaxation of smooth muscle of monkey coronary artery. **J Physiol.**, 371:257-65, 1986.

MELHEM MF, CRAVEN PA, DERUBERTIS FR. Effects of dietary supplementation of alpha-lipoic acid on early glomerular injury in diabetes mellitus. **J Am Soc Nephrol.** 12(1):124-33, 2001.

MELHEM MF; CRAVEN PA; LIACHENKO J; DERUBERTIS FR. Alpha-lipoic acid attenuates hyperglycemia and prevents glomerular mesangial matrix expansion in diabetes. **J Am Soc Nephrol.**, v.13, n.1, p.108-116, 2002.

MELLION, B.T.; IGNARRO, L.J.; MYERS, C.B.; OHISTEIN, E.H.; BALLOT, B.A.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J. Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols: Hemedependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. **Mol Pharmacol**, v. 23, p.653-664, 1983.

MELMAN, A.; GINGELL, J.C. The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Urol.**, v.161, n.1, p.5-11, 1999.

MENDELSON, M.E.; O'NEILL, S.; GEORGE, D.; LOSCALZO, J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. **J Biol Chem**, v.265, p. 19028-19034, 1990.

MENE P, DUBYAK GR, ABOUD HE, SCARPA A, DUNN MJ. Phospholipase C activation by prostaglandins and thromboxane A2 in cultured mesangial cells. **Am J Physiol**. 255(6 Pt 2):F1059-69, 1988.

MERAJI, S.; JOYKODY, L.; SENARATNE, M. P.; THOMSON, A. B. R.; KAPPAGODA, T. Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. **Diabetes**, v.36, p.978-981, 1987.

MESSERLI, F.H. Essential hypertension in the elderly. **Triangle**, v.24, p.35-47, 1985.

MEYER D; GIRMA JP. von Willebrand factor: structure and function. **Thromb Haemost.**, v.70, n.1, p.99-104, 1993.

MIAO L, CALVERT JW, TANG J, PARENT AD, ZHANG JH. Age-related RhoA expression in blood vessels of rats. **Mech Ageing Dev.**, 122(15):1757-70, 2001.

MICELI, F.; TRINGALI, G.; TROPEA, A.; MINICI, F.; ORLANDO, M.T.; LANZONE, A.; NAVARRA, P.; APA, R. The effects of nitric oxide on prostanoid production and release by human umbilical vein endothelial cells. **Life Sciences**, v.73, p.2533-2542, 2003.

MICHEL, J.B.; FERON, O.; SACKS, D.; MICHEL, T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. **J Biol Chem.**, v.272, n.25, p.15583-15586, 1997.

MICHEL, J.B.; HEUDES, D.; MICHEL, O.; POITEVIN, P.; PHILLIPPE, M.; SCALBERT, E.; CORMAN, C.; LEVY, B.I. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging process. **Am. J. Physiol.**, v., 267, p.H124-H135, 1994.

MICHIKAWA Y, MAZZUCHELLI F, BRESOLIN N, SCARLATO G, ATTARDI G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. **Science**. 22;286(5440):774-9, 1999.

MIDAOUI EA, WU R, DE CHAMPLAIN J. Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. **J Hypertens.**, 20(7):1407-12, 2002.

MIDAOU, A.E.; ELIMADI, A.; WU, L.; HADDAD, P.S.; DE CHAMPLAIN, J. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. **Am J Hypertens.**, v.6, n.3, p.173-179, 2003.

MINAMIYAMA, Y.; TAKEMURA, S.; INOUE, M. Albumin is an important vascular tonus regulator as a reservoir of nitric oxide. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.225, n.1, p.112-115, 1996.

MIURA D, MANABE K, OZONO K, SAITO M, GAO Q, NORMAN AW, ISHIZUKA S. Antagonistic action of novel 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-26, 23-lactone analogs on differentiation of human leukemia cells (HL-60) induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. **J Biol Chem.**, 4;274(23):16392-9, 1999.

MOATTER, T.; GERRITSEN, M.E. Fibroblast growth factor upregulates PGG/H synthase in rabbit microvascular endothelial cells by a glucocorticoid independent mechanism. **J Cell Physiol**, v.151, p.571-578, 1992.

MOATTER, T.M.; GERRITSEN, M.E. Acidic fibroblast growth factor induction of cyclooxygenase II in rabbit cardiac muscle microvessel endothelial-cells: mediation by protein kinase C. **Microcirculation**, v.1, p.79-88, 1994.

MOHAUPT, M.G.; ELZIE, J.L.; AHN, K.Y.; CLAPP, W.L.; WILCOX, C.S.; KONE, B.C. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. **Kidney Int.**, v.46, n.3, p.653-665, 1994.

MOMBOULI, J.V.; ILLIANO, S.; NAGAO, T.; VANHOUTTE, P.M. The potentiation of bradykinin-induced relaxations by artery. **Ann Thorac Surg**, v.63, p.84-87, 1992.

MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. polarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine. **J Physiol**, v.465, p.459-476, 1997.

MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p.252-256, 1997.

MONCADA S, VANE JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. **Fed Proc.**, 38(1):66-71, 1979.

MONCADA, S.; GRYGLEWIKI, R.J.; BUNTING, S.; VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v.263, p.663-665, 1976.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, v.9, n.13, p.1319-1330, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; RIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, p.109-142, 1991.

MONNIER, V.M., R.R., KHON, R.R., CERAMI, A. Accelerated age-related browning

of human collagen in diabetes mellitus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p.583-587, 1984.

MOON, J.H.; NAKATA, R.; OSHIMA, S.; INAKUMA, T.; TERAOKA, J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.279, n.2, p.R461-R467, 2000.

MORCOS, M.; BORCEA, V.; ISERMANN, B.; GEHRKE, S.; EHRET, T.; HENKELS, M.; SCHIEKOFER, S.; HOFMANN, M.; AMIRAL, J.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER, R.; WAHL, P.; NAWROTH, P.P. Effect of alpha-lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: an exploratory study. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.52, n.3, p.175-183, 2001.

MOREIRA JR, E.D.; LISBOA LOBO, C.F.; VILLA M.; NICOLASI A.; GLASSER D.B. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador, northeastern Brazil: a population-based study. **Int J Impot Res.**, v.2, p.S3-S9, 2002a.

MOREIRA, JR. E.D.; ABDO, C.H.; TORRES, E.B.; LOBO, C.F.; FITTIPALDI, J.A. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, v.58, n.4, p.583-588, 2001.

MOREIRA, JR. E.D.; BESTANE, W.J.; BARTOLO, E.B.; FITTIPALDI, J.A. Prevalence and determinants of erectile dysfunction in Santos, southeastern Brazil. Sao Paulo, **Med J.**, v.120, n.2, p.49-54, 2002b.

MORELAND, R.B.; GOLDSTEIN, I.I.; KIM, N.N.; TRAISH, A. Sildenafil Citrate, a Selective Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor, **Trends Endocrinol Metab.**, v.10, n.3, p.97-104, 1999.

MORGAN JP, MORGAN KG. Alteration of cytoplasmic ionized calcium levels in smooth muscle by vasodilators in the ferret. **J Physiol.**, 357:539-51, 1984.

MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORII, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; KUMAZAWA, Y.; MORIKAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sci.**, v.74, n.6, p.709-721, 2003.

MORITOKI, H.; HOSOKI, E.; ISHIDA, Y. Age-related decrease in endothelium-dependent dilator response to histamine in rat mesenteric artery. **Eur J Pharmacol.**, v.126, n.1-2, p.61-67, 1986.

MORO MA, DARLEY-USMAR VM, LIZASOAIN I, SU Y, KNOWLES RG, RADOMSKI MW, MONCADA S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. **Br J Pharmacol.**, 116(3):1999-2004, 1995.

MORO, M.A.; DARLEY-USMAR, V.M.; GOODWIN, D.A.; READ, N.G.; ZAMORA-PINO, R.; FEELISCH, M.; RADOMSKI, M.W.; MONCADA, S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.91, n.14, p.6702-6706, 1994.

MORRIS, T.W.; REED, K. E.E; CRONAN, J.E. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. **J. Bacteriol.**, v.177, p.1-10, 1995.

MORROW JD, AWAD JA, BOSS HJ, BLAIR IA, ROBERTS LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F<sub>2</sub>-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 15;89(22):10721-5, 1992.

MORROW, J.D.; ROBERTS, L.J. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. **Biochem. Pharmacol.**, v.51, p.1-9, 1996.

MUGGE, A.; ELWELL, J.H.; PETERSON, T.E.; HARRISON, D.G. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. **Am J Physiol**, v. 260, n.C219-C225, 1991.

MULLARKEY, C.J.; EDELSTEIN, D.; BROWNLIE, M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.173, n.3, p.932-939, 1990.

MULLER, G.; WIED, S.; CRECELIUS, A.; KESSLER, A.; ECKEL, J. Phosphoinositolglycan - peptides from yeast potently induce metabolic insulin actions in isolated rat adipocytes; cardiomyocytes; and diaphragms. **Endocrinology**, v.138, n.8, p.3459-34575, 1997.

MULLER, G.; WIED, S.; PIOSSEK, C.; BAUER, A.; BAUER, J.; FRICK, W. Convergence and divergence of the signaling pathways for insulin and phosphoinositolglycans. **Mol Med.**, v.4, n.5, p.299-323, 1998.

MURAD, F. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. **JAMA.**, v.276, n.14, p.1189-1192, 1996.

MUROHARA, T.; YASUE, H.; OHGUSHI, M.; SAKAINO, N.; JOUGASAKI, M. Age related attenuation of the endothelium dependent relaxation to noradrenaline in isolated pig coronary arteries. **Cardiovasc Res**, v.25, n.12, p.1002-1009 , 1991.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Arch Biochem Biophys.**, v.417, n.1, p.12-17, 2003.

MURPHY, M.E.; BRAYDEN, J.E. Apamin sensitive K<sup>+</sup> channels mediate an endothelium dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. **J. Physiol.**, v.489, p.723-734, 1995.

MURPHY, M.E.; PIPER H.M.; WATANABE, H.; SIES, H. Nitric oxide production by cultured aortic endothelial cells in response to thiol depletion and replenishment, **J. Biol. Chem.**, v.266, p.19378-19383, 1991.

MYERS, P.R.; MINOR JR., R.L.; GUERRA JR., R.; BATES, J.N.; HARRISON, D.G. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature*, v.345, n.6271, p.161-163, 1990.

NAGAMATSU, M.; NICKANDER, K.K.; SCHMELZER, J.D.; RAYA, A.; WITTRICK, D.A.; TRITSCHLER, H.; LOW, P.A. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, v.18, p.1160-1167, 1995.

NAGAO T, VANHOUTTE PM. Electrical and mechanical changes during anoxic contractions of the isolated canine basilar artery. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(3):498-502. 1993a.

NAGAO T, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *Am J Respir Cell Mol Biol*. v.8, n.1, p1-6, 1993b.

NAGAO T; ILLIANO S; VANHOUTTE PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol.*, v.263, n.4 Pt 2, p.H1090-H1094, 1992.

NAGARAJ RH, SELL DR, PRABHAKARAM M, ORTWERTH BJ, MONNIER VM. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 15;88(22):10257-61, 1991.

NAGASAWA T; TABATA N; ITO Y; AIBA Y; NISHIZAWA N; KITTS DD. Dietary G-rutin suppresses glycation in tissue proteins of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.*, v.252, n.1-2, p.141-147, 2003a.

NAGASAWA, T.; TABATA, N.; ITO, Y.; AIBA, Y.; NISHIZAWA, N.; KITTS, DD. Inhibition of glycation reaction in tissue protein incubations by water soluble rutin derivative. *Mol Cell Biochem.*, v.249, n.1-2, p.3-10, 2003b.

NAGATA, M.; HOHMAN, T.C.; NISHIMURA, C.; DREA, C.M.; OLIVER, C.; ROBISON JR., W.G. Polyol and vacuole formation in cultured canine lens epithelial cells. *Exp Eye Res.*, v.48, n.5, p.667-677, 1989.

NAJIBI, S.; COHEN, R.A. Enhanced role of K<sup>+</sup> channels in relaxations of hypercholesterolemic rabbit carotid artery to NO. *American Journal of Physiology*, v.269, p.H805-H811, 1995.

NAKAJIMA M, HASHIMOTO M, WANG F, YAMANAGA K, NAKAMURA N, UCHIDA T, YAMANOUCHI K. Aging decreases the production of PGI<sub>2</sub> in rat aortic endothelial cells. *Exp Gerontol.*, 32(6):685-93, 1997.

NAKANE, M.; MITCHELL, J.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.180, n.3, p.1396-402, 1991.

NAKANE, M.; SCHMIDT, H.H.; POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS Lett.**, v.316, n.2, p.175-180, 1993.

NAKASHIMA M, VANHOUTTE PM. Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. **J Pharmacol Exp Ther.** 272(1):379-84, 1995.

NAKASHIMA M, MOMBOULI JV, TAYLOR AA, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. **J Clin Invest.**, 92(6):2867-71, 1993.

NAKASHIMA, M.; VANHOUTTE, P.M. Age-dependent decrease in endothelium-dependent hyperpolarizations to endothelin-3 in the rat mesenteric artery. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.22, n.8, p.S352-S354, 1993.

NAOI, M.; MARUYAMA, W. Cell death of dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. **Mech Ageing Dev.**, v.111, n.2-3, p.175-188, 1999.

NATHAN, C.F.; HIBBS JR., J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol.**, v.3, n.1, p.65-70, 1991.

National Institutes of Health Consensus Development Panel on Impotence: Impotence. **JAMA.** 1993;270:83.

NESTLER, J.E.; JAKUBOWICZ, D.J.; DE VARGAS, A.F.; BRIK, C.; QUINTERO, N.; MEDINA, F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.83, n.6, p.2001-5, 1998.

NESTLER, J.E.; JAKUBOWICZ, D.J.; REAMER, P.; GUNN, R.D.; ALLAN, G. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.1314-1320, 1999.

NIELSEN, H.; HASENKAM, J.M.; PILEGAARD, H.K.; AALKJAER, C.; MORTENSEN, F.V. Age-dependent changes in alpha-adrenoceptor-mediated contractility of isolated human resistance arteries. **Am. J. Physiol**, v.263, n.4 Pt 2, p.H1190-H1196, 1992.

NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiol. Rev.**, v.81, p.1415-1459, 2001.

NILSSON BO, GOMEZ M, SANTIAGO CARRILHO R, NORDSTROM I, HELLSTRAND P. Differential actions of exogenous and intracellular spermine on contractile activity in smooth muscle of rat portal vein. **Acta Physiol Scand.** v.154, n.3, p.355-65, 1995.

NISHIDA S, SATOH H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in Ginkgo biloba extract. *Clin Chim Acta.*, 339(1-2):129-33, 2004.

NISHIDA, K.; HARRISON, D.G.; NAVAS, J.P.; FISHER, A.A.; DOCKERY, S.P.; UEMATSU, M.; NEREM, R.M.; ALEXANDER, R.W.; MURPHY, T.J. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.*, v. 90, n.5, p.2092-2096, 1992.

NISHIKAWA Y, STEPP DW, CHILIAN WM. In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation. *Am J Physiol.* 277(3 Pt 2):H1252-9, 1999.

NISHIKAWA T; EDELSTEIN D; DU XL; YAMAGISHI S; MATSUMURA T; KANEDA Y; YOREK MA; BEEBE D; OATES PJ; HAMMES HP; GIARDINO I; BROWNLEE M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.*, v.404, n.6779, p.787-790, 2000b.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl.*, v.77, p.S26-S30, 2000a.

NIWA, T.; YAMAMOTO, N.; MAEDA, K.; YAMADA, K.; OHKI, T.; MORI, M. Gas chromatographic--mass spectrometric analysis of polyols in urine and serum of uremic patients. Identification of new deoxyalditols and inositol isomers. *J Chromatogr.*, v.277, p.25-39, 1983.

NJOROGE, F.G.; MONNIER, V.G. The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: A review. *Prog. Clin. Biol Res*, v.304, p.85-197, 1989.

NOUROOZ-ZADEH J; TAJADDINI-SARMADI J; MCCARTHY S; BETTERIDGE DJ; WOLFF SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*, v. 44, n.9, p.1054-1058, 1995.

NOUROOZ-ZADEH, J.; RAHIMI, A.; TAJADDINI-SARMADI, J.; TRITSCHLER, H.; ROSEN, P.; HALLIWELL, B.; BETTERIDGE DJ. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*, v.40, n.6, p.647-653, 1997.

NOVAK K. Group calls for big increase in diabetes research. *Nat Med.* 5(4):364, 1999.

DE NUCCI G, GRYGLEWSKI RJ, WARNER TD, VANE JR. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85(7):2334-8, 1988.

NUKADA H. Mild ischemia causes severe pathological changes in experimental diabetic nerve. *Muscle Nerve.*, v.15, n.10, p.1116-1122, 1992.

NURALIEV, I.U.N.; AVEZOV, G.A. The efficacy of quercetin in alloxan diabetes. *Eksp Klin Farmakol (Russian)*, v.55, n.1, p.42-44, 1992.



NY L, ANDERSSON KE, GRUNDEMAR L .Inhibition by zinc protoporphyrin-IX of receptor-mediated relaxation of the rat aorta in a manner distinct from inhibition of haem oxygenase. **Br J Pharmacol.** 115(1):186-90, 1995.

NYBORG, N.C.B. Ageing is associated with increased 5-HT<sub>2</sub>-receptor affinity and decreased receptor reserve in rat isolated coronary arteries. **Br J Pharmacol**, v.102, p.282–286, 1991.

O'DONNELL, S.R.; WANSTALL, J.C. Thyroxine treatment of aged or young rats demonstrates that vascular responses mediated by  $\beta$ -adrenoceptor subtypes can be differentially regulated. **Br. J. Pharmacol.**, v.88, p.41-49, 1986.

O'ROURKE, M.F. Arterial function in health and disease, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp.185-195, 1982. APUD in Marín, J. Age-related changes in vascular responses: a review. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.79, p.71-117, 1995.

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes. **Free Radic. Biol Med.**, v.5, p.113-124, 1988.

OBROSOVA IG. Update on the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Curr Diab Rep.**, v.3, n.6, p.439-445, 2003.

OBROSOVA, I.; CAO, X.; GREENE, D.A.; STEVENS, M.J. Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL-alpha-lipoic acid. **Diabetologia**, v.41, n.12, p.1442-1450, 1998.

OBROSOVA, I.G; FATHALLAH, L.; GREENE, D.A.Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. **Eur J Pharmacol.** , v.398, n.1, p.139-146, 2000.

ODETTI, P.R.; BORGOGGIO, A.; DE PASCALE, A.; ROLANDI, R.; ADEZATI, L. Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutin. **Diabetes**, v.39, n.7, p.796-801, 1990.

OHISHI, K.; CARMINES, P.K. Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. **J Am Soc Nephrol.**, v.5, n.8, 1559-1566, 1995.

OLIVETTI, G.; MELISSARI, M.; CAPASSO, J.M.; ANVERSA, P. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. **Circ Res.**, v.68, n.6, p.1560-1568, 1991.

OLKEN, N.M.; MARLETTA, M.A. NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. **Biochemistry**, v.32, p.37, p.9677-9685, 1993.

OLNEY, J.W.; ZORUMSKI, C.; PRICE, M.T.; LABRUYERE, J. L-Cysteine, a bicarbonate sensitive endogenous excitotoxin. **Science (Wash. DC)**, v.248, p.596-599, 1990.

OMAR, H.A.; CHERRY, P.D.; MORTELLITI, M.P.; BURKE-WOLIN, T.; WOLIN, M.S. Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. **Circ. Res.**, v.69, p.601-608, 1991.

OMLAND, T.; LIE, R.T.; AAKVAAG, A.; AARSLAND, T.; DICKSTEIN, K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. **Circulation**, v.89, p.1573-1579, 1994.

ORIE, N.N.; ALOAMAKA, C.P.; IYAWA, V.I. Duration-dependent attenuation of acetylcholine--but not histamine--induced relaxation of the aorta in diabetes mellitus. **Gen Pharmacol.**, v.24, n.2, p.329-332, 1993.

ORTMEYER, H.K.; BODKIN, N.L.; LILLEY K.; LARNER, J.; HANSEN, B.C. Chiroinositol deficiency and insulin resistance. I. Urinary excretion rate of chiroinositol is directly associated with insulin resistance in spontaneously diabetic monkeys. **Endocrinology**, v.132, n.2, p.640-5, 1993.

ORTMEYER, H.K.; LARNER, J.; HANSEN, B.C. Effects of D-chiroinositol added to a meal on plasma glucose and insulin in hyperinsulinemic monkeys. **Obes Res.**, v.3, n.4, p.605S-608S, 1995.

OSTLUND RE JR; SEEMAYER R; GUPTA S; KIMMEL R; OSTLUND EL; SHERMAN WR. A stereospecific myo-inositol/D-chiro-inositol transporter in HepG2 liver cells. Identification with D-chiro-[3-3H]inositol. **J Biol Chem.**, v.271, n.17, p.10073-10078, 1996.

OWEN, K.; HATTERSLEY, A.T. Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**, v.15, n.3, p.309-323, 2001.

OYAMA, Y.; KAWASAKI, H.; HATTORI, Y.; KANNO, M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. **Fur. & Pharmacol.**, v.131, p.75-78, 1986.

OZAKI, N.; BEHARRY, K.; NISHIHARA, K.C.; AKMAL, Y., ANG, J.G.; MODANLOU, H.D. Differential regulation of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> by dexamethasone and celocoxib during oxidative stress in newborn rabbits. **Prostaglandins Lipid Med**, v.70, p.61-78, 2002.

OZAWA, T. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. **Biosci Rep.**, v.17, n.3, p.237-50, 1997.

PACKER, L. alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. **Drug Metab Rev.**, v.30, n.2, p.245-275, 1998.

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic Biol Med**, v.19, p.227-250, 1995.

PACKER L, WITT EH, TRITSCHLER HJ. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic Biol Med.** 19(2):227-50, 1995.

PAGANGA, G.; RICE-EVANS, C.A. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. **FEBS Lett.**, v.401, n.1, p.78-82, 1997.

PALACIOS, M.; KNOWLES, R.G.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.165, n.2, p.802-809, 1989.

PALMER RMJ, FERRIDGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, n.6122, p. 524-526, 1987.

PAN, H.Y.M.; HOFFMAN, B.B.; PERSCHE, R.A.; BLASCHKE. Decline in  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated vascular relaxation with aging in man. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.239, p.802-807, 1986.

PAOLISSO, G.; D'AMORE, A.; VOLPE, C.; BALBI, V.; SACCOMANNO, F.; GALZERANO, D.; GIUGLIANO, D.; VARRICCHIO, M.; D'ONOFRIO, F. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. **Metabolism.** , v.;43, n.11, p.1426-1429, 1994.

PARK, S.H.; CHOI, H.J.; LEE, J.H.; WOO, C.H.; KIM, J.H.; HAN, H.J. High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress, and TGF-beta 1. **Kidney Int**, v.59, p.1695-1705, 2001.

PARKINGTON, H.C.; CHOW, J.A.M., EVANS, R.G., COLEMAN, H.A., TARE, M. Role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations in vivo. **J Physiol**, v.542, p.929-937, 2002.

PARKINGTON, H.C.; TARE, M.; TONTA, M.A.; COLEMAN, H.A. Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine. **J Physiol**, v.465, p.459-476, 1993.

PARKINGTON, H.C.; TONTA, M.A.; COLEMAN, H.A.; TARE, M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. **J Physiol**, v.484, p.469-480, 1995.

PASCOAL IF, UMANS JG. Effect of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omental microvessels. **Hypertension.**, 28(2):183-7, 1996.

PATERNO, R.; FARACI, F.M.; HEISTAD, D.D. Age-related changes in release of endothelium-derived relaxing factor from the carotid artery. **Stroke**, v.25, n.12, p.2457-2460, 1994.

PICKARD, R.S.; KING, P.; ZAR, M.A.; POWELL, P.H. Corpus cavernosal relaxation in impotent men. **Br J Urol.**, v.74, n.4, p.485-491, 1994.

PICKARD, R.S.; POWELL, P.H.; ZAR, M.A. Nitric oxide and cyclic GMP formation following relaxant nerve stimulation in isolated human corpus cavernosum. **Br J Urol.**, v.75, n.4, p.516-522, 1995.

PICKARD, RS, POWELL, PH, ZAR, MA. The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. **Br J Pharmacol.**, v.104, n.3, p.755-759, 1991.

PIEPER GM, RIAZ-UL-HAQ. Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 30(4):528-32, 1997.

PIEPER, G.M. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.29, n.1, p.8-15, 1997.

PIEPER, G.M.; GROSS, G. Oxygen-derived free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p.H825-H833; 1988.

PIEPER, G.M.; MEI, D.A.; LANGENSTROER, P.; O'ROUKE, S.T. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. **Am. J. Physiol.**, v.263, p.H676-H680, 1992.

PLANE F, GARLAND CJ. Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levcromakalim on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery. **Br J Pharmacol.**, 110(2):651-6, 1993.

PLANE F, JACOBS M, MCMANUS D, BRUCKDORFER KR. Probucol and other antioxidants prevent the inhibition of endothelium-dependent relaxation by low density lipoproteins. **Atherosclerosis.**, 103(1):73-9, 1993.

.POBER JS, COTRAN RS. Cytokines and endothelial cell biology. **Physiol Rev.**, v.70, p.427-451, 1990.

POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; BUTTERY, L.D.; MARTINEZ, A.; SPRINGALL, D.; POLAK, J.M.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. **Am J Physiol.**, v.265, n.5 Pt 1, p.C1379-C1387, 1993.

PONGOR, S.; ULRICH, P.C.; BENCSATH, F.A.; CERAMI, A. Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.81, p.2684-2688, 1984.

PONTE, A.; SANCHEZ-FERRER, C.F; HERNANDEZ, C.; ALONSO, M.J.; MARIN, J. Effect of ageing and hypertension on endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in the rat aorta. **J Hypertens**, v.14, n.6, p.705-712, 1996.

POPESCU LM, FORIL CP, HINESCU M, PANOIU C, CINTEZA M, GHERASIM L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca<sup>++</sup>-extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol.**, 15;34(10):1857-60, 1985.

POPP R, BAUERSACHS J, HECKER M, FLEMING I, BUSSE R. A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. **J Physiol.**, 5;497 (Pt 3):699-709. 1996.

POPP R, BRANDES RP, OTT G, BUSSE R, FLEMING I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. **Circ Res.**, 19;90(7):800-6, 2002.

PORTILLA D, DAI G, PETERS JM, GONZALEZ FJ, CREW MD, PROIA AD. Etomoxir-induced PPAR $\alpha$ -modulated enzymes protect during acute renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol.**, 278(4):F667-75. 2000.

POTAPOVICH, A.I.; KOSTYUK, V.A. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. **Biochemistry (Mosc)**, v.68, n.5, p.514-419, 2003.

PRABHAKAR, P.; THATTE, H.S.; GOETZ, R.M.; CHO, M.R.; GOLAN, D.E.; MICHEL, T. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem.**, v.273, n.42, p.27383-27388, 1998.

PRASAD A, ANDREWS NP, PADDER FA, HUSAIN M, QUYYUMI AA. Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. **J Am Coll Cardiol.**, 34(2):507-14, 1999.

PRATICO, D. Lipid peroxidation in mouse models of atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med.**, v.11, n.3-4, p.112-116, 2001.

PRATT PF, HILLARD CJ, EDGEMOND WS, CAMPBELL WB. N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. **Am J Physiol.**, 274(1Pt 2):H375-81, 1998.

PRICCI F, LETO G, AMADIO L, IACOBINI C, CORDONE S, CATALANO S, ZICARI A, SORCINI M, DI MARIO U, Pugliese G. Oxidative stress in diabetes-induced endothelial dysfunction involvement of nitric oxide and protein kinase C. **Free Radic Biol Med.**, 15;35(6):683-94, 2003.

PRITCHARD JR., K.A.; GROSZEK, L.; SMALLEY, D.M.; SESSA, W.C.; WU, M.; VILLALON, P.; WOLIN, M.S.; STEMERMAN, M.B. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. **Circ Res.**, v.77, n.3, p.510-518, 1995.

PUYBASSET, L.; BEA, M.L.; GHALEH, B.; GIUDICELLI, J.F.; BERDEAUX, A. Coronary and systemic hemodynamic effects of sustained inhibition of nitric oxide synthesis in conscious dogs. Evidence for cross talk between nitric oxide and cyclooxygenase in coronary vessels. **Circ Res**, v.79, p.343-357, 1996.

- QUILLEY J, FULTON D, MCGIFF JC. Hyperpolarizing factors. **Biochem Pharmacol.**, 15;54(10):1059-70, 1997.
- QUILLEY, J.; MCGIFF, J.C. Is EDHF na epoxyeicosatrienoic acid? **Trends Pharmacol. Sci.**, v.21, p.121-124, 2000.
- RADOFF S, CERAMI A, VLASSARA H. Isolation of surface binding protein specific for advanced glycosylation end products from mouse macrophage-derived cell line RAW 264.7. **Diabetes**, 39(12):1510-8, 1990.
- RADOFF S, MAKITA Z, VLASSARA H. Radioreceptor assay for advanced glycosylation end products. **Diabetes**, 40(12):1731-8, 1991.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.87, n.13, p.5193-5197. 1990b.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. **Br J Pharmacol**, v.101, n.2, p.325-328, 1990a.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interaction between prostacyclin and nitric oxide. **Br J Pharmacol**, v.92, p.639-646, 1987.
- RAGAZZI, E.; CHINELLATO, A.; PANDOLFO, L.; FROLDI, G.; CAPARROTTA, L.; ALIEV, G.; PROSDOCIMI, M.; FASSINA, G. Endothelial nucleotide-mediated aorta relaxation in aged Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.26, n.1, p.119-126, 1995.
- RAJFER, J.; ARONSON, W.J.; BUSH, P.A.; DOREY, F.J.; IGNARRO, L.J.. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. **N Engl J Med.**, v.326, n.2, p.90-94, 1992.
- RAJNARAYANA, K.; PRABHAKAR, M.C.; KRISHNA, D.R. Influence of rice bran oil on serum lipid peroxides and lipids in human subjects. **Indian J Physiol Pharmacol**, v.45, n.4, p.442-444, 2001.
- RANDALL MD, ALEXANDER SP, BENNETT T, BOYD EA, FRY JR, GARDINER SM, KEMP PA, MCCULLOCH AI, KENDALL DA. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. **Biochem Biophys Res Commun.**, 4;229(1):114-20, 1996.
- RANDALL, M.D.; KENDALL, D.A. Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. **Eur J Pharmacol.**, v.346, n.1, p.51-53, 1998.
- RANDALL, M.D.; MCCULLOCH, A.I.; KENDALL, D.A., Com- Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am J**

parative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat isolated. **Physiol**, v.259, p.C3–C18, 1997.

RANDLE, P.J.; KERBEY, A.L.; ESPINAL, J. Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones. **Diabetes Metab Rev.**, v.4, n.7, p.623-638, 1988.

RAY, C.J.; ABBAS, M.R.; CONEY, A.M.; MARSHAL, J.M. Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilation: in vivo and in vitro studies. **J Physiol**, v.544, p.195-209, 2002.

RAEYMAEKERS L, EGGERMONT JA, WUYTACK F, CASTEELS R. Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump of bovine pulmonary artery. **Cell Calcium.**, 11(4):261-8, 1990.

REDDI AS, BOLLINENI JS. Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, 27;235(3):598-601, 1997.

REDDY S, BICHLER J, WELLS-KNECHT KJ, THORPE SR, BAYNES JW. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. **Biochemistry.**, 29;34(34):10872-8, 1995.

REED, L.J.; GETZENDANER, M.E.; DEBUSK, B.G.; JOHNSTON, P.M. Acetate-replacing factors for lactic acid bacteria. II. Purification and properties. **J Biol Chem.**, v.192, n.2, p.859-865, 1951.

REES, D.D.; CELLEK, S.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.173, n.2, p.541-547, 1990.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v.339, p.1523-1526, 1992.

RESENDE AC, BALLEJO G, SALGADO MC. Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilation. **Braz J Med Biol Res.** 1998 Sep;31(9):1229-35.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med.**, v..20, n.7, p.933-956, 1996.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**, 20(7):933-56. 1996. Erratum in: **Free Radic Biol Med**;21(3):417, 1996.

RIDKER, P.M.; VAUGHAN, D.E.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.H. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. **Lancet**, v.341, p.1165–1168, 1993.

- RODRIGO, J.; SPRINGALL, D.R.; UTTENTHAL, O.; BENTURA, M.L.; ABADIA-MOLINA, F.; RIVEROS-MORENO, V.; MARTINEZ-MURILLO, R.; POLAK, J.M.; MONCADA, S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v.345, n.1312, p.175-221, 1994.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A.; ALONSO, M.J.; REDONDO, J.; SALAICES, M.; MARIN, J. Role of lipid peroxidation and the glutathione-dependent antioxidant system in the impairment of endothelium-dependent relaxations with age. **Br J Pharmacol.**, v.123, n.1, p.113-121, 1998.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A.; MARTINEZ-ORGADO, J.; SALAICES, M.; MARIN, J. Impairment of acetylcholine relaxations by malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation. **J Vasc Res.**, v.33, n.6, p.463-470, 1996.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A.; RUIZ-TORRES, A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. **Mech Ageing Dev.**, v.66, n.2, p.213-222, 1992.
- ROKACH J, KHANAPURE SP, HWANG SW, ADIYAMAN M, LAWSON JA, FITZGERALD GA. The isoprostanes: a perspective. **Prostaglandins**, 54(6):823-51, 1997.
- ROMERO, G.; LUTTRELL, L.; ROGOL, A.; ZELLER, K.; HEWLETT, E.; LARNER, J. Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins: potential precursors of insulin mediators. **Science**, v.240, n.4851, p.509-511, 1988.
- ROSENBLUM WI. Effects of calcium channel blockers on pial vascular responses to receptor mediated constrictors. **Stroke**. 15(2):284-7, 1984..
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. **Nature**, v.362, p.801-809, 1993.
- ROTH, G.S. Hormone/neurotransmitter action during aging: the calcium hypothesis of impaired signal transduction. **Rer. Biol. Res. Aging.**, v. 4, p.243-252, 1990.
- ROTH, G.S. Mechanisms of altered hormone-neurotransmitter action during aging: from receptors to calcium mobilization. **Annu Rev Gerontol Geriatr.**, v.10, p.132-146, 1990.
- ROY S; SEN CK; TRITSCHLER HJ; PACKER L. Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. **Biochem Pharmacol.**, v.533, p.393-9, 1997.
- RUBANYI, G.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **J Cell Biochem.**, v. 46, n.1, p.27-36, 1991.
- RUBANYI, G.M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. **Free Radic. Biol. Med.**, v.4, p.107-120, 1988.



RUBANYI, G.M.; VANHOUTTE, P.M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.*, v.250, n.5 Pt 2, p.H815-H821, 1986.

RUDERMAN NB, HAUDENSCHILD C. Diabetes as an atherogenic factor. *Prog Cardiovasc Dis.*, 26(5):373-412, 1984.

RUDICH, A.; TIROSH, A.; POTASHNIK, R.; KHAMAISI, M.; BASHAN, N. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*, v.42, n.8, p.949-957, 1999.

RUHNAU KJ; MEISSNER HP; FINN JR; RELJANOVIC M; LOBISCH M; SCHUTTE K; NEHRDICH D; TRITSCHLER HJ; MEHNERT H; ZIEGLER D. Effects of 3-week oral treatment with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic acid) in symptomatic diabetic polyneuropathy. *Diabet Med.*, v.16, n.12, p.1040-1043, 1999.

RUSSELL, D.H.; BUCKLEY, A.R.; MONTGOMERY, D.W. Prolactin-dependent mitogenesis in Nb2 node lymphoma cells: effects of immunosuppressive cyclopeptides. *Journal of Immunology*, v.138, p.276-284, 1987.

RUSSELL, D.H.; BUCKLEY, A.R.; MONTGOMERY, D.W. Prolactin-dependent mitogenesis in Nb2 node lymphoma cells: effects of immunosuppressive cyclopeptides. *Journal of Immunology*, v.138, p.276-284, 1987.

SAENZ DE TEJADA, I.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; KRANE, R.J.; COHEN, R.A. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med.*, v.320, n.16, p.1025-1030, 1989.

SAFAR, M. Ageing and its effects on the cardiovascular system. *Drugs*, v.39, p.1-8, 1990.

SAFAR, M.E. Focus on the large arteries in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v.7, n.2, p.S1-S4, 1985.

SAKURAI, T.; TSUCHIYA, S. Glycation of H1-histone. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v.36, n.7, p.2716-2719, 1988.

SAMIEC, P.S.; DREWS-BOTSCH, C.; FLAGG, E.W.; KURTZ, J.C.; STERNBERG JR., P.; REED, R.L.; JONES, D. P. Glutathione in human plasma: Decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med.*, v.24, p.699-704, 1998.

SANDOW, S.L.; HILL, C.E. Incidence of myo-endothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ. Res.*, v.86, p.341-346, 2000.

SAUTEBIN, L.; DIROSA, M. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lumen of endotoxin treated rats. **Eur J Pharmacol**, v.262, p.193-196, 1994.

SCHLEICHER, E.; WIELAND, O. kinetic analysis of glycation as a tool for assessing the half-life of proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.884, p.199-205, 1996.

SCHLEICHER, E.D.; WAGNER, E.; NERLICH, A.G. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. **J Clin Invest.**, v.99, n.3, p.457-468, 1997.

SCHMIDT HH, WALTER U. NO at work. **Cell**, 23;78(6):919-25,1994.

SCHMIDT HH. NO., CO and .OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. **FEBS Lett.**, 27;307(1):102-7, 1992.

SCHMIDT HH; WARNER TD; ISHII K; SHENG H; MURAD F. Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. **Science.**, v.255, n.5045, p.721-723, 1992b.

SCHMIDT, A.M.; HORI, O.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WAUTIER, J.L.; STERN, D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. **Arterioscler Thromb.**, v.14, n.10, p.1521-1528, 1994.

SCHMIDT, H.H.; WALTER, U. NO at work. **Cell.**, v. 78, n.6, p.919-925, 1994.

SCHNACKENBERG C.G.; WILCOX C.S. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. **Kidney Int.**, v.59, n.5, p.1859-1864, 2001.

SCHNACKENBERG, C.G., WILCOX, C.S. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. **Kidney Int**, 59:1859-64, 2001.

SCHUBERT, R.; SEREBRYAKOV, V.N.; MEWES, H.; HOPP, H.H. Iloprost dilates rat small arteries: role of  $K_{ATP}$ - and  $K_{Ca}$ -channel activation by cAMP-dependent protein kinase. **Am J Physiol**, v.272, p.H1147-H1156, 1997.

SCOTLAND, R.S.; CHAUHAN, S.; VALLANCE, P.J.; AHLUWALIA, A. An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Hypertension**, v.38, p.833-839. 2001.

SCOTT, B.C.; ARUOMA, O.I.; EVANS, P.J.; O'NEILL, C.; VAN DER VLIET, A.; CROSS, C.E.; TRITSCHLER, H.; HALLIWELL, B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. **Free Radic Res.**, v.20, n.2, p.119-133, 1994.

SEIGNEUR, M.; BONNET, J.; DORIAN, B.; BENCHIMOL, D.; DROUILLET, E.; GOUVERNEUR, G.; LARRUE, J.; CROCKETT, R.; BOISSEAU, M.; RIBEIREAU-GAYON, P.; BRICAUD H. Effect of the consumption of alcohol, white wine and red

wine on platelet function and serum lipids. **Journal of Applied Cardiology**, v.5, p.215-222, 1990.

SELL, D.R.; LAPOLLA, A.; ODETTI, P.; FOGARTY, J. MONNIER, V.M. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complication in individuals with long-standing IDDM. **Diabetes**, v.41, p.1286-1292; 1992.

SELL, D.R.; MONNIER, V.M. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix: implication of pentosidine in the aging process. **J. Biol.Chem.** , v.264, p.21597-21602; 1989.

SELL, D.R; CARLSON, E.C.; MONNIER; V.M. Differential effects of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus on pentosidine formation in skin and glomerular basement membrane. **Diabetologia**, v.36, p.936-941; 1993.

SELLOUM, L; REICHL, S; MULLER, M; SEBIHI, L; ARNHOLD, J. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. **Arch Biochem Biophys**, v.395, n.1, p.49-56, 2001.

SEN CK; TIROSH O; ROY S; KOBAYASHI MS; PACKER L. A positively charged alpha-lipoic acid analogue with increased cellular uptake and more potent immunomodulatory activity. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.247, n.2, p.223-228, 1998.

SEN, C.K.; ROY, S.; HAN, D.; PACKER, L. Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by alpha-lipoic acid: a flow cytometric analysis. **Free Radic Biol Med.**, v.22, p.1241-57; 1997.

SESSA, W.C.; HARRISON, J.K.; BARBER, C.M.; ZENG, D.; DURIEUX, M.E.; D'ANGELO, D.D.; LYNCH, K.R.; PEACH, M.J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J Biol Chem.**, v.267, n.22, p.15274-15276, 1992.

SESSA, W.C.; PRITCHARD, K.; SEYEDI, N.; WANG, J.; HINTZE, T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circ Res.**, v.74, n.2, p.349-353, 1994.

SHAMSI FA, LIN K, SADY C, NAGARAJ RH. Methylglyoxal-derived modifications in lens aging and cataract formation. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, 39(12):2355-64, 1998.

SHENG, H.; GAGNE, G.D.; MATSUMOTO, T.; MILLER, M.F.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion. **J Neurochem**, v.61, n.3, p.1120-1126, 1993.

SHENG, H.; HUGHES, M.L.; MURAD, F.; BRIGGS, C.A. Evidence that nitric oxide mediates the cyclic GMP response to synaptic activity in the rat superior cervical ganglion. **Brain Res.**, v.597, n.2, p.343-345, 1992.

SHIMIZU, I; TODA, N. Alterations with age of the response to vasodilator agents in isolated mesenteric arteries of the beagle. **Br J Pharmacol.** v.89, n.4, p.69-78, 1986.

SHIMOKAWA, H.; YASUTAKE, H.; FUJII, K.; OWADA, M. K.; NAKAIKE, R.; FUKUMOTO, Y.; TAKAYANAGI, T.; NAGAO, T.; EGASHIRA, K.; FUJISHIMA, M.; TAKESHITA, A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.28, p.703-711; 1996.

SHIMOMURA I; FUNAHASHI T; TAKAHASHI M; MAEDA K; KOTANI K; NAKAMURA T; YAMASHITA S; MIURA M; FUKUDA Y; TAKEMURA K; TOKUNAGA K; MATSUZAWA Y. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. **Nat Med.**, v.2, n.7, p.800-3, . 1996.

SHINOHARA M, THORNALLEY PJ, GIARDINO I, BEISSWENGER P, THORPE SR, ONORATO J, BROWNLEE M. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. **J Clin Invest.**, 1;101(5):1142-7, 1998.

SHINOZAKI, K.; NISHIO, Y.; OKAMURA, T.; YOSHIDA, Y.; MAEGAWA, H.; KOJIMA, H.; MASADA, M.; TODA, N.; KIKKAWA, R.; KASHIWAGI, A. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. **Circ Res.**, v.87, n.7, p.566-73. 2000.

SIEGEL G, SCHNALKE F, STOCK G, GROTE J. Prostacyclin, endothelium-derived relaxing factor and vasodilatation. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.** 19:267-70, 1989.

SIGEL, H.; PRIJS, B.; MCCORMICK, D.B.; SHIH, J.C. Stability and structure of binary and ternary complexes of alpha-lipoate and lipoate derivatives with Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> in solution. **Arch Biochem Biophys.**, v.187, n.1, p.208-214, 1978.

SIMIONESCU, M.; SIMIONESCU, N. Functions of the endothelial cell surface. **Annu Rev Physiol.** , v.48, p.279-293, 1986.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radic Biol Med.**, v.29, n.3-4, p.375-383, 2000.

SKOLNIK EY, YANG Z, MAKITA Z, RADOFF S, KIRSTEIN M, VLASSARA H. Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodelling and diabetic nephropathy. **J Exp Med.**, 1;174(4):931-9, 1991.

SLATER, A.F.; STEFAN, C.; NOBEL, I.; VAN DEN DOBBELSTEEN, D.J.; ORRENIUS, S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicol Letts**, v.82/83, p.149-153, 1995.

SMITH, D.L. Health promotion for older adults. **Health Values**, v.12, n.5, p.46-51, 1988.

SMITH, P.R.; THORNALLEY, P.J. Mechanism of degradation of nonenzymatically glycated proteins under physiological conditions. Studies with a model fructosamine Nε-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) hippuryl-lysine. **Eur. J. Biochem.**, v.210:729-739, 1992.

SMITH, W.M. Epidemiology of hypertension in older patients. **Am. J. Med.**, v.; 38:2-6; 1988.

SMITS, P.; KAPMA, J.A.; JACOBS, M.C.; LUTTERMAN, J.; THIEN, T. Endothelium-dependent vascular relaxation in patients with type I diabetes. **Diabetes**, v.42:148-153, 1993.

SOMLYO AP, SOMLYO AV. The sarcoplasmic reticulum: then and now. **Novartis Found Symp.**, 246:258-68; discussion 268-71, 272-6, 2002.

SORBINIL RETINOPATHY TRIAL RESEARCH GROUP; A randomized trial of sorbinil; an aldose reductase inhibitor; in diabetic retinopathy. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. **Arch Ophthalmol.**, v.108, n.9, p.1234-1244, 1990.

SOULIS-LIPAROTA T, COOPER ME, DUNLOP M, JERUMS G. The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. **Diabetologia**. 38(4):387-94, 1995.

SPURNEY RF, ONORATO JJ, ALBERS FJ, COFFMAN TM. Thromboxane binding and signal transduction in rat glomerular mesangial cells. **Am J Physiol**. 264(2 Pt 2):F292-9, 1993.

STAMLER, J.S.; SIMON, D.I. OSBOME, J.A. MULLINS, M.E.; JARAKI, O.; MICHEL, T. SINGEL, D.J.; LASCALZO, J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.89, p.444 448, 1992.

STEHOUWER, C.D.; DONKER, A.J.. Clinical usefulness of measurement of urinary albumin excretion in diabetes mellitus. **Neth J Med.**, v.42, n.5-6, p.175-86, 1993.

STEHOUWER, C.D.; LAMBERT, J.; DONKER, A.J.; VAN HINSBERGH, V.W. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. **Cardiovasc Res.**, v.34, n.1, p.55-68., 1997.

STEINBERG D, CAREW TE, FIELDING C, FOGELMAN AM, MAHLEY RW, SNIDERMAN AD, ZILVERSMIT DB. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation**, 80(3):719-23, 1989.

STEVENS, M.J.; OBROSOVA, I.; CAO, X.; VAN HUYSEN, C.; GREENE, D.A. Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v.49, n.6, p.1006-1015, 2000.

STEVENS, M.J.; DANANBERG, J.; FELDMAN, E.L.; LATTIMER, S.A.; KAMIJO, M.; THOMAS, T.P.; SHINDO, H.; SIMA, A.A.; GREENE, D.A. The linked roles of nitric oxide, aldose reductase and, (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. **J Clin Invest.**, v.94, n.2, p.853-859, 1994.

STEWART KG, ZHANG Y, DAVIDGE ST. Aging increases PGHS-2-dependent vasoconstriction in rat mesenteric arteries. **Hypertension**, 35(6):1242-7, 2000.

STIEF, C.G.; NOACK, T.; ANDERSSON, K.E. Signal transduction in cavernous smooth muscle. **World J Urol.**, v.15, n.1, p.27-31, 1997.

STIEF, C.G.; UCKERT, S.; BECKER, A.; TRUSS, M.C.; JONAS, U. The effect of the specific phosphodiesterase (PDE) inhibitors on human and rabbit cavernous tissue in vitro and in vivo. **J Urol.**, v.159, n.4, p.1390-3, 1998.

STITT AW, HE C, FRIEDMAN S, SCHER L, ROSSI P, ONG L, FOUNDS H, LI YM, BUCALA R, VLASSARA H. Elevated AGE-modified ApoB<sup>1</sup> in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. **Mol Med.**, 3(9):617-27, 1997.

STITT AW, HE C, VLASSARA H. Characterization of the advanced glycation end-product receptor complex in human vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, 24;256(3):549-56, 1999..

STRANDGAARD, S.; OLESEN, J.; SKINHOJ, E.; LASSEN, N.A. Autoregulation of brain circulation in severe arterial hypertension. **Br. Med. J.**, v.2, p.507-510; 1983.

STREEPER, R.S.; HENRIKSEN, E.J.; JACOB, S.; HOKAMA, J.Y.; FOGT, D.L.; TRITSCHLER, H.J. Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle. **Am J Physiol.**, v.273, p.1 Pt 1, p.E185-E1891, 1997.

STRODTER, D.; LEHMANN, E.; LEHMANN, U.; TRITSCHLER, H.J.; BRETZEL, R.G.; FEDERLIN, K. The influence of thioctic acid on metabolism and function of the diabetic heart. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.29, n.1, p.19-26, 1995.

STUDER RK, CRAVEN PA, DERUBERTIS FR. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. **Diabetes.** 42(1):118-26, 1993.

STUEHR, D.J.; KWON, N.S.; NATHAN, C.F.; GRIFFITH, O.W.; FELDMAN, P.L.; WISEMAN, J.; NOME, G. A-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **J Biol Chem.**, v.266, n.10, p.6259-6263, 1991.

SUDOH, T.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v.168, p. 863-870, 1990.

SUGA, S.; NAKAO, K.; ITOH, H.; KOMATSU, Y.; OGAWA, Y.; HAMA, N.; IMURA H. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of vascular natriuretic peptide system. **Journal of Clinical Investigation**, v.90, p.1145-1149, 1992.

SULLIVAN JC, DAVISON CA. Gender differences in the effect of age on electrical field stimulation (EFS)-induced adrenergic vasoconstriction in rat mesenteric resistance arteries. **J Pharmacol Exp Ther.**, 296(3):782-8, 2001.

SULLIVAN, M.; THOMPSON, C.S.; MIKHAILIDIS, D.P.; MORGAN, R.J.; ANGELINI, G.D.; JEREMY, J.Y. Differential alterations of prostacyclin; cyclic AMP and cyclic GMP formation in the corpus cavernosum of the diabetic rabbit. **Br J Urol.**, v.82, n.4, p.578-84, 1998.

SUN, D.; HUANG, A.; SMITH, C.J.; STACKPOLE, C.J.; CONNETA, J.A.; SHESELY, E.G.; KOLLER, A.; KALEY, G. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. **Circ Res**, v.85, p.288-293; 1999.

SUZUKI, H.; SATO, S.; TANABE, S.; HAYASAKA, K. Beraprost sodium for pulmonary hypertension with congenital heart disease. **Pediatr Int.**, v.44, p.528-529; 2002.

SUZUKI, S.; KAWASAKI, H.; SATOH, Y.; OHTOMO, M.; HIRAI, M.; HIRAI, A.; HIRAI, S.; ONODA, M.; MATSUMOTO, M.; HINOKIO, Y. Urinary chiro-inositol excretion is an index marker of insulin sensitivity in Japanese type II diabetes. **Diabetes Care**, v.17, n.12, p.1465-1468, 1994.

SUZUKI, T.; YAMAZAKI, T.; YAZAKI, Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v.51, p.489-494, 2001.

SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L. Lipoate prevents glucose-induced protein modifications. **Free Radic Res Commun.**, v.17, n.3, p.211-217, 1992.

SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L. Thiolic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. **Free Rad Res Comms**, v.15, p.255-263., 1991.

SZCZEKLIK A, KOPEC M, SLADEK K, MUSIAL J, CHMIELEWSKA J, TEISSEYRE E, DUDEK-WOJCIECHOWSKA G, PALESTER-CHLEBOWCZYK M. Prostacyclin and the fibrinolytic system in ischemic vascular disease. **Thromb Res**. Mar 15;29(6):655-60, 1983.

TACHADO, S.D.; GEROLD, P.; SCHWARZ, R.; NOVAKOVIC, S.; MCCONVILLE, M.; SCHOFIELD, L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium; Trypanosoma; and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.94, n.8, p.4022-4027, 1997.

TADDEI S, VIRDIS A, GHIADONI L, SALVETTI G, BERNINI G, MAGAGNA A, SALVETTI A. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. **Hypertension**. 38(2):274-9, 2001.

TADDEI, S.; GHIADONI, L.; VIRDIS, A.; BURALLI, S.; SALVETTI, A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. **Circulation**, v.100, p.1400-1405, 1999.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; MATTEI, P.; GHIADONI, L.; GENNARI, A.; FASOLO, C.B.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. **Circulation**, v.91, p.1981-1987; 1995.

TARE M, PARKINGTON HC, COLEMAN HA, NEILD TO, DUSTING GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. **Nature**, 5;346(6279):69-71, 1990.

TARE, M; PARKINGTON, H.C.; COLEMAN, H.A. EDHF, NO and a prostanoid: hyperpolarization-dependent and -independent relaxation in guineapig arteries. **Br J Pharmacol.**, v.130, p.605-18, 2000.

TAYLOR SG, WESTON AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends Pharmacol Sci**. 9(8):272-4, 1988.

TAYLOR, P.D.; GRAVES, J.E.; POSTON, L. Selective impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of the streptozotocin-induced diabetic rat. **Clin Sci (Lond)**, v. 88, n.5, p.19-24, 1995.

TAYLOR, S.G.; SOUTHERTON, J.S.; WESTON, A.H.; BAKER, J.R. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. **Br J Pharmacol.** , v.94, n.3, p.853-863, 1988.

TAYLOR, S.I.; ARIOGLU, E. Genetically defined forms of diabetes in children. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.84, n.12, p.4390-4396, 1999.

TEICHERT, J.; PREISS, R. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J Chromatogr B Biomed Appl.**, v.;672, n.2, p.277-281, 1995.

TESFAMARIAM, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. **Free Radic Biol Med.**, v 16, n.3, p.383-391, 1994.

TESFAMARIAM B, BROWN ML, DEYKIN D, COHEN RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. **J Clin Invest**. 85(3):929-32, 1990.



- TESFAMARIAM, B.; BROWN, M.L.; DEYKIN, D.; COHEN, R.A. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxations by activating protein kinase C. *J. Clin. Invest.*, v.87, p.1643-1648, 1991.
- TESFAMARIAM, B.; COHEN, R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am. J. Physiol.*, v.263, p.H321-H326, 1992.
- THIAPALIYA, S.; MATSUYAMA, H.; TAKEWAKI, T. Bradykinin causes endothelium-independent hyperpolarization and neuromodulation by prostanoid synthesis in hamster mesenteric artery. *Eur J Pharmacol*, v. 408, p.313-321, 2000.
- THE DCCT RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, v.329, p.977-986, 1993.
- THELEN, K.I.; DEMBINSKA-KIEC, A.; PALLAPIES, D.; SIMMET, T.; PESKAR, B.A. Effect of 3-morpholinonydnominine (SIN-1) and NG-nitro-L-arginine (NNA) on isolated perfused anaphylactic guinea-pig hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.345, p.93-99; 1992.
- THOMPSON, S.G.; KIENAST, J.; PYKE, S.D.; HAVERKATE, F.; VAN DE LOO, J.C. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med*, v.332, p.635-641, 1995.
- THORNALLEY PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J.* 1;269(1):1-11, 1990.
- THORNALLEY PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44(7):1013-23, 1998.
- TODA, N.; HAYASHI S. Age-dependent alteration in the response of isolated rabbit basilar arteries to vasoactive agents. *J Pharmacol Exp Ther*, v.211, p.716-721, 1979.
- TODA, T.; TSUDA N.; NISHIMORI, I.; LESZCZYNSKI, D.E.; JACOB, R. Morphometric analysis of the aging process in human arteries and aorta. *Acta Anat.*, v.106:35-44, 1980.
- TODA, N.; BIAN K. Age-related changes in the response to vasoconstrictor and dilator agents in isolated beagle coronary arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v.336, p.359-364, 1987.
- TODA, N.; SHIMIZU, I. Neuroeffector function in mesenteric arteries isolated from beagles of different ages. *J Pharmacol Exp Ther.*, v.240, n.1, p.223-227, 1987.
- TOESCU EC, MYRONOVA N, VERKHRATSKY A. Age-related structural and functional changes of brain mitochondria. *Cell Calcium*, 28(5-6):329-38, 2000.

TOMINAGA, M.; FUJII, K.; ABE, I.; TAKATA, Y.; KOBAYASHI, K.; FUJISHIMA, M. Hypertension and ageing impair acetylcholine-induced vasodilation in rats. **J Hypertens**, v.12, n.3, p.259-268, 1994.

TONG, Y.C.; BRODERICK, G.; HYPOLITE, J.; LEVIN, R.M. Correlations of purinergic; cholinergic and adrenergic functions in rabbit corporal cavernosal tissue. **Pharmacology**, v.45, n.5, p.241-249, 1992.

TORO L, MARIJIC J, NISHIMARU K, TANAKA Y, SONG M, STEFANI E. Aging, ion channel expression, and vascular function. **Vascul Pharmacol**. 38(1):73-80, 2002.

TOYOTA, T.; OIKAWA, S. Effects of beraprost sodium (Dorner) in patients with diabetes mellitus complicated chronic arterial obstruction. **Angiology**, v.53, p.7-13, 2002.

TRACHTMAN, H.; FUTTERWEIT, S.; SINGHAL, P. Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.207, n.1, p.120-125, 1995.

TRAISH, A.M.; KIM, N.N.; GOLDSTEIN, I.; MORELAND, R.B. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification; characterization; and physiological function. **J Androl.**, v.20, n.6, p.671-682, 1999.

TRAUTNER, C.; HAASSTERT, B.; GIANI, G.; BERGER, M. Incidence of blindness in southern Germany between 1990 and 1998. **Diabetologia**, v.44, n.2, p.147-150, 2001.

TRNOVSKY, J.; LETOURNEAU, R.; HAGGOG, E.; BOUCHER, W.; THEOHARIDES T.C. Quercetin-induced expression of rat mast cell protease II and accumulation of secretory granules in rat basophilic leukaemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v.46, p. 2315-2316, 1993.

TRUMPOWER, B.L. The protonmotive q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome b<sub>c</sub>1 complex. **J Biol Chem.**, v.265, n.20, p.11409-11412, 1990.

TSCHUDI, M.R.; BARTON, M.; BERSINGER, N.A.; MOREAU, P.; CONSENTINO, F.; NOLL, G.; MALINSKI, T.; LÜSCHER, T.F. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. **J. Clin. Invest.**, v.98, p.899-905, 1996.

TSUJIMOTO, G.; LEE, C.H.; HOFFMAN, B.B.; Age-related decrease in beta adrenergic receptor-mediated vascular smooth muscle relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.239, n.2, p.411-415, 1986.

TUTTLE, R.S.; Age-related changes in the sensitivity of rat aortic strips to norepinephrine and associated chemical and structural alterations. **J. Gerontol.**, v.21: p.510-516, 1966.

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

UENO, Y.; KIZAKI, M.; NAKAGIRI, R.; KAMIYA, T.; SUMI, H.; OSAWA, T. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. **J Nutr**, v.132, p.897-900, 2002.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP (UKPDS). Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet** 352, 837-853, 1998.

UPCHURCH GR JR, WELCH GN, LOSCALZO J. S-nitrosothiols: chemistry, biochemistry, and biological actions. **Adv Pharmacol.**, 34:343-9, 1995.

URAKAMI-HARASAWA, L.; SHIMOKAWA, H.; NAKASHIMA, M.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **Journal of Clinical Investigation**, v.100, p.2793-2799, 1997.

VALENTOVIC, M.A.; LUBAY, W.C. Elevated glucose in vivo and in vitro adversely alters prostaglandin generation in rat aortae and platelets. **Prostaglandins Leukot. Med.**, v.19, p.271-277, 1985.

VALENZA; M.L. TESORIERE; A. BONGIORNO; R. ALBIERO E M.A. LIVREA. Vitamin A inhibits doxorubicin-induced membrane lipid peroxidation in rat tissues in vivo. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.302, n.1, p.103-108, 1993.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effect of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **Lancet**, v.11, p.997-1000, 1989.

VALLEJO, S.; ANGULO J.; PEIRÓ, C.; CERCAS, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; NEVADO, J.; LLERGO, J.L.; RODRÍGUEZ-MANÃS, L.; SÁNCHEZ-FERRER, C.F. Treatment with acarbose may improve endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetes rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.36, p.255-262, 2000.

VAN ACKER SA, VAN DEN BERG DJ, TROMP MN, GRIFFIOEN DH, VAN BENNEKOM WP, VAN DER VIJGH WJ, BAST A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic Biol Med.**, 20(3):331-42, 1996.

VAN BRUMMELEN, P.; BUHLER, F.R.; KIOWSKI, W.; AMANN, F.W. Age-related decrease in cardiac and peripheral vascular responsiveness to isoprenaline: studies in normal subjects. **Clin Sci**, v.60, n.5, p.571-577, 1981.

VAN DER HOEVEN, J.C.; BRUGGEMAN, I.M.; DEBETS, F.M. Genotoxicity of quercetin in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v136, p. 9-21. (1984)

- VAN DE VOORDE J, DEPYPERE H, VANHEEL B. The influence of pregnancy on endothelium-derived nitric oxide mediated relaxations in isolated human resistance vessels. **Fundam Clin Pharmacol.**, 11(4):371-7, 1997.
- VAN HINSBERGH VW, VERMEER M, KOOLWIJK P, GRIMBERGEN J, KOOISTRA T. Genistein reduces tumor necrosis factor alpha-induced plasminogen activator inhibitor-1 transcription but not urokinase expression in human endothelial cells. **Blood.** 1;84(9):2984-91, 1994.
- VANACKER, S.A.; VAN DEN BERG, D.J.; TROMP, M.N.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic Biol Med.**, v.20, n.3, p.331-342, 1996.
- VANDER JAGT DL, ROBINSON B, TAYLOR KK, HUNSAKER LA. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. **J Biol Chem.**, 5;267(7):4364-9, 1992.
- VANDER JAGT DL, HASSEBROOK RK, HUNSAKER LA, BROWN WM, ROYER RE. Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. **Chem Biol Interact.**, 30;130-132(1-3):549-62, 2001.
- VANDER JAGT DL, HUNSAKER LA. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. **Chem Biol Interact.**, Feb 1;143-144:341-51, 2003.
- VANDERHOEK, J.Y.; LANDS, W.E.M. The inhibition of the fatty acid oxygenases of sheep vesicular glands by antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.296, p. 382-385, 1973.
- VANE, J.; CORIN, R.E. Prostacyclin: a vascular mediator. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v.26, p.571-578, 2003.
- VANE, J.R.; ANGGARD, E.E.; BOTTING, R.M. Mechanisms of disease: regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med**, v.323, p.27-36, 1990.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.; BOTTING, R. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.38, p.97-120, 1998.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. **Am J Cardiol**, v.75, p. 3A-10A, 1995.
- VANHOUTTE, P.M. Aging and vascular responsiveness. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.12, p.S11-S19, 1988.
- VARGAS, E.; LYE, M.; FARAGHER, E.B. GODDARD, C.; MOSER, B.; DAVIES, I. Cardiovascular haemodynamics and the response of vasopressin; aldosterone; plasma renin activity and plasma catecholamines to head-up tilt in young and old healthy subjects. **Age Ageing**, v.15, p.17-28, 1986.

VASAN S; ZHANG X; ZHANG X; KAPURNIOTU A; BERNHAGEN J; TEICHBERG S; BASGEN J; WAGLE D; SHIH D; TERLECKY I; BUCALA R; CERAMI A; EGAN J; ULRICH P. Related Articles, Links Abstract An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature.*, v.382, n.6588, p.275-278, 1996.

VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B.; MARTASEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B.S.; KAROUI, H.; TORDO, P.; PRITCHARD JR., K.A. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.95, n.16, p.9220-9225, 1998.

VECKENSTEDT, A.; GUTTNER, J.; BELADI, I. Synergistic action of quercetin and murine 3 interferon in the treatment of mengo virus infection in mice. *Antiviral Research*, v.7, p.169-178, 1987.

VEITH, R.C.; FEATHERSTONE, J.A.; LINARES, O.A.; HALTER, J.B. Age differences in plasma norepinephrine kinetics in humans. *J. Gerontol.*, v.41, p.319-324, 1986.

VENO, L.; KOHNO, M.; HARAICAWA, K.; HIROMO, I. Interaction between quercetin and superoxide radicals. Reduction of quercetin mutagenicity. *Journal of Pharmacobiodynamics*, v.7, p.788 803, 1984.

VERGNANI L, HATRIK S, RICCI F, PASSARO A, MANZOLI N, ZULIANI G, BROVKOVYCH V, FELLIN R, MALINSKI T. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. *Circulation*. 21;101(11):1261-6,. 2000

VERMA, A.K.; JOHNSON, J.A; GOULD, M.N.; TANNER, M.A. Inhibition of 7;12-dimethylbenz(a)anthracene and N-nitrosomethyl urea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Research* , v.48, p.5754-5758, 1988.

VERNET, D.; CAI, L.; GARBAN, H.; BABBITT, M.L.; MURRAY, F.T.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology*, v.136, n.12, p.5709-5717, 1995.

VESSAL, M; HEMMATI, M; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v.135C, n.3, p.357-364, 2003.

VILLA, L.M.; SALAS, E.; DARLEY-USMAR, V.M.; RADOMSKI, M.W.; MONCADA, S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, n.26, p.12383-12387, 1994.

VLISSARA H, FUH H, MAKITA Z, KRUNGKRAI S, CERAMI A, BUCALA R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction

in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 15;89(24):12043-7, 1992.

VLISSARA H, LI YM, IMANI F, WOJCIECHOWICZ D, YANG Z, LIU FT, CERAMI A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med.*, 1(6):634-46, 1995.

VLISSARA H, BROWNLEE M, CERAMI A. Recognition and uptake of human diabetic peripheral nerve myelin by macrophages. *Diabetes*. Jun;34(6):553-7, 1985.

VLISSARA, H.; BUCALA, R.; STRIKER, L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical; biological and clinical implications for diabetes and aging. *J. Lab. Invest.*, v.70, p.138-151, 1994.

VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A.; HAEMERS, A. **Present status and prospects of flavonoids as anti-viral agents.** In *Progress in Clinical and Biological Research*. Edited by V. Cody; E. Middleton; Jr; J. B. Harborne and A. Béretz. Alan R. Liss; New York., v.280, p.283-299, 1988.

VOGT, B.; SCHLEICHER, E.; WIELAND, O.H.  $\epsilon$ -amino-lysine-bound glucose in human tissues obtained at autopsy: increase in diabetes mellitus. *Diabetes*, v.31, p.1123-1127, 1982.

VOKONAS, P.S.; KANNEL, W.B.; CUPPLES, L.A. Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the Framingham study. *J. Hypertens*, v.6, p.S3-S9, 1988.

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; BOEYE, A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. *Journal of General Virology*, v.68, p.1749-1751, 1988.

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; VAN HOOF, L. M.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D. A.; BOEYE, A. The poliovirus- induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin; a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antiviral Research*, v.7, p.35-42, 1987.

WADSWORTH, R.M. Calcium and vascular reactivity in ageing and hypertension. *J. Hypertens*, v.8, p. 975-983, 1990.

WAKABAYASHI, I.; HATAKE, K.; KIMURA, N.; KAKISHITA, E.; NAGAI, K. Modulation of vascular tonus by the endothelium in experimental diabetes. *Life Sci.*, v.40, p.643-648, 1987.

WALDRON GJ, DONG H, COLE WC, TRIGGLE CR. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle: role for a non-nitric oxide synthase product. *Zhongguó Yao Li Xue Bao*. 17(1):3-7, 1996.

WALDRON GJ, DING H, LOVREN F, KUBES P, TRIGGLE CR. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.*, 128(3):653-8, 1999.

WALLERSTEDT SM, BODELSSON M. Endothelium-dependent relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. **Br J Pharmacol.**, 120(1):25-30, 1997.

WANG W, BALLATORI N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacol Rev.**, 50(3):335-56, 1998.

WANG HD, PAGANO PJ, DU Y, CAYATTE AJ, QUINN MT, BRECHER P, COHEN RA. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. **Circ Res.**, 20;82(7):810-8, 1998.

WANG, H.; SHAH, V.; LANKS, K.W. Use of oxidizing dyes in combination with 2-cyanocinnamic acid to enhance hyperthermic cytotoxicity in L929 cells. **Cancer Research** , v.47, p.3341-3343, 1987.

WANG, Y.X.; BROOKS, D.P.; EDWARDS, R.M. Attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Physiol**, v.264, p.R952-R956, 1993.

WANSTALL, J. C.; O'DONNELL, S.R. Age influence responses of rat isolated aortae and pulmonary artery to the calcium channel agonist; Bay K 8644; and to potassium and calcium. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.13, p.709-714, 1989a.

WANSTALL, J.C.; O'DONNELL, S.R. Inhibition of norepinephrine contractions by diltiazem on aorta and pulmonary artery from young and aged rats: influence of alpha-adrenoceptor reserve. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.245, n.3, p.1016-1020, 1988.

WARGOVICH, M.J.; ENG, V.W.; NEWMARK, I.L. Inhibition by plant phenols of benzo[a]pyrene-induced nuclear aberrations in mammalian intestinal cells. A rapid in vivo assessment method. **Food and Chemical Toxicology**, v.23, p.47-49, 1985.

WARNGARD, L.; FLODSTROM, S.; LJUNQUIST, S. Interaction between quercetin; TPA and DTT in the V79 metabolic cooperation assay. **Carcinogenesis**. v.8; p.1201-1205, 1987.

WEI, J.Y. Age and the cardiovascular system. **N. Engl. J. Med.**, v.327:1735-1739, 1992.

WEI, J.Y. Use of calcium entry blockers in elderly patients. **Circulation**, v.80, p.IV-171-IV-177, 1989.

WEI, M.; GASKILL, S.P.; HAFFNER, S.M.; STERN, M.P. Effects of diabetes and level of glycemia on all cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. **Diabetes Care**, v.21, p.1167-1172, 1998.

WEI, W.; GASKILL, S.P.; HAFFNER, S.M.; STERN, M.P. Effects of diabetes and level of glycemia on all cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study; **Diabetes Care**, v.21, p.1167-1172, 1998.

WEI, Y.H. Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. **Proc Natl Sci Counc Repub China B.**, v.22, n.2, p.55-67, 1998.

WEINER, C.P.; KNOWLES, R.G.; NELSON, S.E.; STEGINK, L.D. Pregnancy increases guanosine 3';5'-monophosphate in the myometrium independent of nitric oxide synthesis. **Endocrinology**, v.135, n.6, p.2473-2478, 1994.

WELCH, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide and the cardiovascular system. **J Card Surg.**, v.9, n.3, p.361-371, 1994.

WELLS-KNECHT MC, THORPE SR, BAYNES JW. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. **Biochemistry**. 34:15134-41, 1995.

WHITE R, HILEY CR. A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. **Br J Pharmacol.**, 122(8):1573-84, 1997

WIGG, S.J.; TARE, M.; TONTA, M.A.; O'BRIEN, R.C.; MEREDITH, I.T.; PARKINGTON; H.C. Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.281, p.H232-H240, 2001.

WILLIAMS B, SCHRIER RW. Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Diabetes**. 41(11):1464-72, 1992.

WILLIAMS DA, SEGAL SS. Feed artery role in blood flow control to rat hindlimb skeletal muscles. **J Physiol**. 463:631-46, 1993..

WILLIAMS B, GALLACHER B, PATEL H, ORME C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. **Diabetes**, 46(9):1497-503, 1997.

WILLIAMS, S.B.; GOLDFINE, A.B.; TIMIMI, F.K.; TING, H.H.; RODDY, M.A.; SIMONSON, D.C.; CREAGER, M.A. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. **Circulation.**, v.97, n.17, p.1695-701, 1998.

WILLIAMS B, TSAI P, SCHRIER RW. Glucose-induced downregulation of angiotensin II and arginine vasopressin receptors in cultured rat aortic vascular smooth muscle cells. Role of protein kinase C. **J Clin Invest.**, 90(5):1992-9, 1992.

WILLIAMSON JR, OSTROW E, EADES D, CHANG K, ALLISON W, KILO C, SHERMAN WR. Glucose-induced microvascular functional changes in nondiabetic rats are stereospecific and are prevented by an aldose reductase inhibitor. **J Clin Invest**. 85(4):1167-72, 1990.

WILLIAMSON, J.R.; CHANG, K.; ROWOLD, E.; MARVEL, J.; TOMLINSON, M.; SHERMAN, W.R.; ACKERMANN, K.E.; KILO, C. Diabetes-induced increases in



vascular permeability and changes in granulation tissue levels of sorbitol; myo-inositol; chiro-inositol; and scyllo-inositol are prevented by sorbinil. **Metabolism**, v.35, n.4, p.41-45, 1986.

WILTROUT, R.H.; HORNING, R.L. Natural products as anti-tumor agents: direct versus indirect mechanisms of activity of flavonoids. **Journal of the National Cancer Institute**, v.80, p.220-222, 1988.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory; cytotoxic; and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic Biol Med.**, v.25, n.4-5, p.434-456, 1998.

WINK, D.A.; OSAWA, Y.; DARBYSHIRE, J.F.; JONES, C.R.; ESHENAUER, S.C.; NIMS, R.W. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. **Arch Biochem Biophys.**, v.300, n.1, p.115-23, 1993.

WINKLER, B.S.; ORSELLI, S.M.; REX, T.S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. **Free Radical Biol Med**, v.17, p.333-349, 1994.

WITZTUM JL, STEINBERG D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest.** 88(6):1785-92, 1991.

WOHAIEB, S.A.; GODIN, D.V. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. **Diabetes**, v.36, p.1014-1018, 1987.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of oxidative glycosylation in diabetes. **Biochem. J.**, v.245:243-250, 1987.

WOLFF, S.P.; JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. **Free Radic. Biol Med.**, v.10, p.339-352, 1991.

WOLFFENBUTTEL BH; BOULANGER CM; CRIJNS FR; HUIJBERTS MS; POITEVIN P; SWENNEN GN; VASAN S; EGAN JJ; ULRICH P; CERAMI A; LEVY BI. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.8, p.4630-4634, 1998.

WOOD KS, BUGA GM, BYRNS RE, IGNARRO LJ. Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its close similarity to nitric oxide. **Biochem Biophys Res Commun.**, 16;170(1):80-8, 1990.

WOODMAN CR, PRICE EM, LAUGHLIN MH. Aging induces muscle-specific impairment of endothelium-dependent dilation in skeletal muscle feed arteries. **J Appl Physiol.** 93(5):1685-90, 2002.

WOOLFSON RG, POSTON L. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. **Clin Sci (Lond).** 79(3):273-8, 1990.

WRIGHT CD, MULSCH A, BUSSE R, OSSWALD H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun.** 28;160(2):813-9, 1989.

WU M, PRITCHARD KA JR, KAMINSKI PM, FAYNGERSH RP, HINTZE TH, WOLIN MS. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. **Am J Physiol.** .266:H2108-13, 1994.

WU, K.K. THIAGARAJAN P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. **Annu Rev Med.**, v.47, p.315-331, 1996.

WU WX, MA XH, NATHANIELSZ PW. CHANGES in prostacyclin synthase in pregnant sheep myometrium, endometrium, and placenta at spontaneous term labor and regulation by estradiol and progesterone. **Am J Obstet Gynecol.** 180:744-9, 1999.

XIA P, INOBUCHI T, KERN TS, ENGERMAN RL, OATES PJ, KING GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. **Diabetes.** 43(9):1122-9, 1994.

XIA, Y.; ROMAN, L.J.; MASTERS, B.S.; ZWEIER, J.L. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. **J Biol Chem.**, v.273, n.35, p.22635-22639, 1998.

XIAO, R.P.; LAKATTA, E.G. Deterioration of beta-adrenergic modulation of cardiovascular function with aging. **Ann N Y Acad Sci.**, v.673, p.293-310, 1992.

XIE, Q.W.; CHO, H.J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v.256, n.5054, p.225-8, 1992.

XIN MG, ZHANG J, BLOCK ER, PATEL JM. Senescence-enhanced oxidative stress is associated with deficiency of mitochondrial cytochrome c oxidase in vascular endothelial cells. **Mech Ageing Dev.** 124(8-9):911-9. 2003.

XU W, CHARLES IG, MONCADA S, GORMAN P, SHEER D, LIU L, EMSON P. Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. **Genomics**, 15;21(2):419-22, 1994.

XU, W.; GORMAN, P.; SHEER, D.; BATES, G.; KISHIMOTO, J.; LIZHI, L.; EMSON, P. Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2->24.31 by fluorescent in situ hybridization. **Cytogenet Cell Genet.**, v.64, n.1, p.62-63, 1993.

YABE-NISHIMURA, C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. **Pharmacol Rev.**, v.50, n.1, p.21-33, 1998.

YAJIMA, K.; NISHIYAMA, M; YAMAMOTO, Y; SUZUKI, H. Inhibition of endothelium-dependent hyperpolarization by endothelial prostanoids in guinea-pig coronary artery. **Br J Pharmacol**, v.126, p.1-10, 1999.

- YAMAMOTO Y, FUKUTA H, NAKAHIRA Y, SUZUKI H. Blockade by 18beta-glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J Physiol*, 511:501-8, 1998.
- YAMAMOTO Y, IMAEDA K, SUZUKI H. Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol*, 514:505-13, 1999.
- YAMANAKA, M.; SHIRAI, M.; SHIINA, H.; TANAKA, Y.; TSUJIMURA, A.; MATSUMIYA, K.; OKUYAMA, A.; DAHIYA, R. Diabetes induced erectile dysfunction and apoptosis in penile crura are recovered by insulin treatment in rats. *J Urol.*, v.170, n.1, p.291-297, 2003.
- YANG JA, HE GW. Surgical preparation abolishes endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization in the human saphenous vein. *Ann Thorac Surg*. 63(2):429-33, 1997.
- YANG CW, VLASSARA H, PETEN EP, HE CJ, STRIKER GE, STRIKER LJ. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 27;91(20):9436-40, 1994.
- YAO, S.K.; OBER, J.C.; KRISHNASWAMI, A.; FERGUSON, J.J.; ANDERSON, H.V.; GOLINO, P.; BUJA, L.M.; WILLERSON, J.T. Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation*, v.86; p.1302-1309, 1992.
- YASUE H, MATSUYAMA K, MATSUYAMA K, OKUMURA K, MORIKAMI Y, OGAWA H. Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation.*, 81(2):482-90. 1990.
- YAWORSKY, K., SOMWAR, R., RAMLAL, T., TRITSCHLER, H.J., KLIP, A. Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by alpha-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes, *Diabetologia*, 43:294-303, 2000.
- YERNENI KK, BAI W, KHAN BV, MEDFORD RM, NATARAJAN R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, 48(4):855-64, 1999.
- YIN FC, SPURGEON HA, WEISFELDT ML, LAKATTA EG. Mechanical properties of myocardium from hypertrophied rat hearts. A comparison between hypertrophy induced by senescence and by aortic banding. *Circ Res*. 46(2):292-300, 1980.
- YOKOYAMA, C.; YABUKI, T.; SHIMONISHI, M.; WADA, M.; HATAE, T.; OHKAWARA, S. Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders; including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation*, v.106, p.2397-2403, 2002.
- YOSHIMOTO, T.; FURUKAWA, M.; YAMAMOTO, S.; HORIE, T. AND WATANABE-KOHNO, S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-

lipoxygenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.116; p.612-618, 1983.

YUE, K.K.; CHUNG, W.S.; LEUNG, A.W.; CHENG, C.H. Redox changes precede the occurrence of oxidative stress in eyes and aorta; but not in kidneys of diabetic rats. **Life Sci.**, v.73, n.20, p.2557-2570, 2003.

ZAKHARY R, GAINE SP, DINERMAN JL, RUAT M, FLAVAHAN NA, SNYDER SH. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 23;93(2):795-8, 1996.

ZANETTI, M., SATO, J., KATUSIC, Z.S., O'BRIEN, T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. **Am J Physiol**, 280:H2516-23, 2001.

ZEIHER AM, DREXLER H, SAURBIER B, JUST H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. **J Clin Invest.** 92(2):652-62, 1993.

ZEIHER AM, DREXLER H, WOLLSCHLAGER H, JUST H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. **Circulation**, 84(5):1984-92, 1991.

ZHANG, C.; YANG, J.; JACOBS, J.D.; JENNINGS, L.K. Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.285, n.6, p.H2563-H2572, 2003.

ZHANG, L. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in rats of different ages. **Biochim Biophys Acta**, v.1006, p.140-143, 1989.

ZHAO C; SHI Y; LIN W; WANG W; JIA Z; YAO S; FAN B; ZHENG R. Fast repair of the radical cations of dCMP and poly C by quercetin and rutin. **Mutagenesis.**, v.16, n.3, p.271-275, 2001.

ZHAO, C.Y.; SHI, Y.M.; YAO, S.D.; JIA, Z.J.; FAN, B.T.; WANG, W.F.; LIN, W.Z.; LIN, N.Y.; ZHENG, R.L. Scavenging effects of natural phenols on oxidizing intermediates of peroxynitrite. **Pharmazie.**, v.58, n.10, p.742-749, 2003.

ZHU, B.T.; EZELL, E.L.; LIEHR, J.G. Catechol-O-methyl transferase catalysed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.292-299, 1994.

ZIEGLER D, RELJANOVIC M, MEHNERT H, GRIES FA. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 107(7):421-30. 1999.

ZIEGLER, D.; GRIES, .FA. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy. **Diabetes**, v.46, n.2, p.S62-66, 1997.

ZIEGLER, D.; HANEFELD, M.; RUHNAU, K.J.; MEISSNER, H.P.; LOBISCH, M.; SCHUTTE, K.; GRIES, F.A. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia.*, v. 38(12):1425-33, 1995.

ZIEGLER, M.G.; LAKE, C.R.; KOPIN, I.J. Plasma noradrenaline increases with age. *Nature*, v.261, p.333-335, 1976.

ZIMMER, G.; MAINKA, L.; KRUGER, E. Dihydrolipoic acid activates oligomycin-sensitive thiol groups and increases ATP synthesis in mitochondria. *Arch Biochem Biophys.*, v.288, n.2, p.609-13, 1991.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, v.414, p.782-7, 2001.

ZYGMUNT PK, HOGESTATT ED, ANDERSSON KE. Effects of potassium channel inhibitors on nitrergic and adrenergic neurotransmission in lamina propria of the female rabbit urethra. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354(3):336-42, 1996.

ZYGMUNT PM, HOGESTATT ED, WALDECK K, EDWARDS G, KIRKUP AJ, WESTON AH. Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery. *Br J Pharmacol.*, 122(8):1679-86, 1997.

ZYGMUNT PM; RYMAN T; HOGESTATT ED. Regional differences in endothelium-dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. *Acta Physiol Scand.*, v.155, n.3, p.257-266, 1995.

ZYGMUNT, P.M.; EDWARDS, G.; WESTON, A.H.; DAVIS, S.C.; HO-ING, G.J.; Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived" GESTA" TT ED; 1996. Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic from the endothelium. *Nature*, v.346, p.69-71, 1990.

ZYGMUNT, P.M.; GRUNDEMAR, L.; HOGGESTATT, E.D. Endo- arginine-sensitive and insensitive components of the endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig thelium-dependent relaxation resistant to N-nitro-Larginine in the rat hepatic artery and aorta. Acta carotid artery. *Jpn J Physiol*, v.42, p. 335-347, 1994.

ZYGMUNT, P.M.; HOGGESTATT, E.D. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and dependent hyperpolarization and relaxation in the hepatic artery of the rat. In: Vanhoutte PM; ed.; Endo- cromakalim. *Br J Pharmacol*, v.94, p.853-863, 1996.

ZYGMUNT, P.M.; HOGGESTATT, E.D. Role of potassium channels in endotheliumdependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br. J. Pharmacol*, v.117, p.1600-1606, 1996.