



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

**ESTUDO DOS EFEITOS DE HIPOGLICEMIANTES ORAIS NA
REATIVIDADE VASCULAR ADRENÉRGICA, NO ESCAPE
RENOVASCULAR E NA TAQUIFILAXIA EM RINS ISOLADOS
DE COELHO**

ANTONIO TELES DE MENEZES

Fortaleza

2017

ANTONIO TELES DE MENEZES

**ESTUDO DOS EFEITOS DE HIPOGLICEMIANTES ORAIS NA
REATIVIDADE VASCULAR ADRENÉRGICA, NO ESCAPE
RENOVASCULAR E NA TAQUIFILAXIA EM RINS ISOLADOS
DE COELHO**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. *PhD.* Manassés Claudino Fonteles

Fortaleza

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M51e Menezes, Antonio Teles de.
ESTUDO DOS EFEITOS DE HIPOGLICEMIANTE ORAIS NA REATIVIDADE
VASCULAR ADRENÉRGICA, NO ESCAPE RENOVASCULAR E NA TAQUIFILAXIA EM
RINS ISOLADOS DE COELHO / Antonio Teles de Menezes. – 2017.
110 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.

Coorientação: Prof. Dr. Antonio Rafael Coelho Jorge.

1. Escape Renovascular. 2. Taquifilaxia. 3. Reatividade Vascular. 4. Antidiabéticos Oraís.
5. Perfusão Renal. I. Título.

CDD 615.1

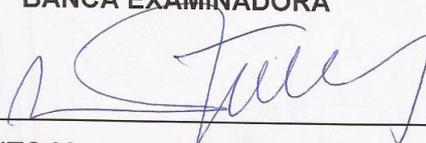
ANTONIO TELES DE MENEZES

**ESTUDO DOS EFEITOS DE HIPOGLICEMIANTE ORAIS NA
REATIVIDADE VASCULAR ADRENÉRGICA, NO ESCAPE
RENOVASCULAR E NA TAQUIFILAXIA EM RINS ISOLADOS DE
COELHO**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

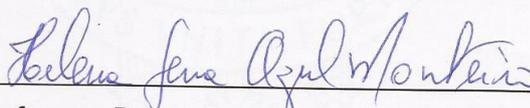
Aprovada em 27 de junho de 2017

BANCA EXAMINADORA



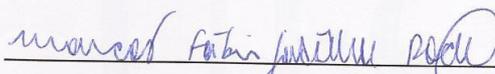
Professor EMÉRITO Manassés Claudino Fonteles (Orientador)

Universidade Federal do Ceará-UFC/UECE



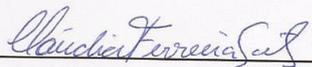
Professora Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Universidade Federal do Ceará-UFC



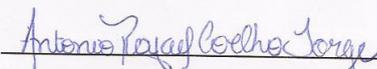
Professor Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Universidade Estadual do Ceará-UECE



Professora Dra. Cláudia Ferreira Santos

Universidade Estadual do Ceará-UECE



Professor Dr. Antônio Rafael Coelho Jorge

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por tudo, pois **Deus é tudo e tudo é Deus.**

À minha mãe, **Joana Celi de Menezes Teles**, mulher forte e de fé fincada na rocha que sempre orientou e supervisionou meus passos desde os primeiros momentos de vida até esta (e todas as anteriores, idem) minha jornada e concedeu seu pulso firme, sua mão amigavelmente confortável e seu peito amigo nos momentos de angústia, dúvida e vacilação, compartilhando as vivências de alegria comigo. Ademais, avó dedicada e amorosa que fez jus à condição cristã de ser uma parte imprescindível e miscível em nossas vidas. ***“Sinto às vezes vontade de ser novamente um menino/ Toda vez que te abraço e te beijo sem nada a dizer/ Você diz tudo aquilo o que eu preciso escutar de você”.***

Ao meu pai, **Raimundo de Queiroz Teles**, exemplo imediato de perseverança e luta contra as adversidades, principalmente àquelas as que a vida pu-lo em xeque, assim como pregando a humildade e honestidade, contribuiu de forma ímpar e inabalável para a formação de minha personalidade. ***“Velho, meu querido velho/ Agora já caminha lento/ Como perdoando o vento/ Eu sou teu sangue meu velho/ Teu silêncio e o teu tempo”.*** ***“Sua voz macia me acalma/ E me diz muito mais do que eu digo/ Me calando fundo na alma/ Meu querido, meu velho, meu amigo”***

A **Antonio Teles de Menezes Filho** que remodelou meu conceito de vida, de amor e de responsabilidade, dando-me um alento único de seguir em frente sem temer às intempéries da vida, oferecendo seu sorriso largo, sincero de criança, sempre acalentador e abundante. Obrigado, filho amado, por existir em abundância, em saúde e fazer valer, na prática, o sentido denotativo do termo FAMÍLIA. ***“Eu recordo com felicidade/ Dia, mês e hora em que você nasceu/ Você trouxe tanta alegria/ Fruto do amor de sua mãe e eu”***

À minha esposa amada **Bruna Mara Ribeiro Teles** fiel companheira que sempre apoiou minha jornada e meu progresso independentemente das dificuldades impostas ou adquiridas pelo caminho percorrido, além de ser exemplo de séria profissional e irreparável mãe cuidadora e amorosa com nosso filho. ***“Sou teu pai,***

teu filho/ Sou aquele que te tem amor/ Sou teu par, o teu melhor amigo/ Vou contigo, seja aonde for/ E onde estiver, estou”.

Aos meus irmãos **Gerardo Cristino de Menezes Teles**, em extensão à sua esposa e **João Pedro Pereira Cristino**, sobrinho amado e primogênito, e **Maria Ruth de Menezes Teles** pelos momentos de convivência em família, revezando momentos de dissonância de opiniões e consonância de afeto.

Aos meus avós maternos **Gerardo Cristino de Menezes e Maria “Ruth” de Menezes Cristino** (ambos *in memoriam*) que foram o perfeito sentido da palavra *humanidade* e que souberam, em vida, com extrema sapiência e fé, ser a extensão do amor dos meus pais. Como também, agradeço aos meus tios e tias, maternos e paternos, e parentes outros cujas provas de amizade e solidariedade são deveras indiscutíveis.

Aos meus avós paternos **Antônio Teles Dourado e Flora de Queiroz Teles** com os quais não convivi, mas deixaram um legado perpetuado em suas gerações que vão escrevendo e honrando seus nomes ao longo do perpassar do tempo.

Meus sogros **Mauro Sérgio Ribeiro Silva e Rejane Machado Ribeiro** e meus cunhados queridos **Ana Luiza Machado Ribeiro e Phelipe André Machado Ribeiro**, bem como **Diego Mauro Machado Ribeiro** pelos momentos ímpares de convivência e lazer.

Ao meu orientador e douto amigo **Manassés Claudino Fonteles**, homem visionário que revolucionou a forma de se administrar o Ensino Superior, de se fazer Ciência ética e voltada à prática clínica, sempre visando ao futuro científico de uma nação ainda carente de mentes inteligentes e empreendedoras. Homem sábio na busca de desabrochar novos valores científicos e humanos, respaldados em sua larga e frutífera experiência de vida. Parafraseando um antigo escritor e político maranhense: **“Só Deus compartilha da eternidade de seus nomes”**. À sua amada esposa, mãe e poetisa soprano **Maria das Graças Sá Roriz Fonteles** cuja voz mansa sempre nos transmite a certeza mínima de que a fé engata nossas conquistas.

Ao Professor **Bóris Nogueira Menezes** (*in memoriam*), amigo (na denotação irrestrita da palavra) e irmão que sempre esteve do meu lado compartilhando momentos de alegria e dor, exalando seu companheirismo e fraternidade sob forma de atitudes irrefutáveis de amizade e humildade onde os homens deveriam espelhar-se na perspectiva da construção de um mundo cada vez melhor. “***Me lembro de todas as lutas, meu bom companheiro/ Você tantas vezes provou que foi um grande guerreiro/ O seu coração foi uma casa de portas abertas/ Amigo, você foi o mais certo nas horas incertas.***”

À pequena **COREAÚ-CE**, berço-pátria amada que tem neste orgulhoso rebento um de seus mais ferrenhos admiradores por sua História, seus causos folclóricos e nossos conterrâneos queridos, uns comuns, outrem ilustres.

À **Universidade Estadual do Ceará** por tudo que contribuiu para minha formação profissional e intelectual, bem como agradeço a todo o corpo de funcionários daquela universidade. Também agradeço à **Faculdade de Educação de Itapipoca (FACEDI)** a qual me albergou e me deu a crédita possibilidade de ter uma vida estável profissional e retribuir, de certa forma, ao investimento e confiança em mim confiados.

À **Universidade Federal do Ceará** a qual ofereceu condições estruturais e humanas para o desenvolvimento pleno desde à época do Mestrado no já quase longínquo ano de 1999 até a conclusão deste trabalho.

Aos meus AMIGOS: **Yleen Acioly Mesquita**, companheiro e tradutor fiel do ofício de ser veterinário; **Paulo Roberto Pires dos Santos**, cuja solidariedade e provas de amizade, orgulham-me de considerá-lo como amigo eficaz e despretensioso; **Paulo Henrique Coutinho de Araújo Chaves**, que repassou um pouco sua vivência sob forma de bom humor e sabedoria durante o período da graduação.

Ao professor **Marcos Fábio Gadelha Rocha** que iniciou-me no intrigante, mas gratificante mundo da curiosidade científica e que cresceu suas orientações desde a época da iniciação científica até os dias atuais ajudando bastante em minha formação humanística.

Ao professor **Nilberto Robson Falcão do Nascimento** que comprometeu-se a colaborar como supervisor o período do meu Estágio Supervisionado (no já distante ano de 1998), consolidando, portanto, uma amizade sincera e fraterna, contínua na Pós-Graduação, como colega de disciplina e, depois, como colega profissional na UECE, ratificando a grandeza e a responsabilidade em sermos veterinários.

Ao caro colega e amigo **Antônio Rafael Coelho Jorge** o qual me auxiliou como se fora um co-orientador desta tese, se fazendo sempre prestativo, humilde e atencioso nas horas mais difíceis. Aos bolsistas **Iury Araújo, Vitor Martins e Pedro Henrique Sá** pelo apoio nos momentos críticos.

Ao professor **Geraldo de Sousa Tomé**, ícone de homem dedicado à Ciência cujos conhecimentos foram essenciais, na graduação e no Mestrado, bem como nos conselhos e intercâmbio de experiências tão valiosas.

À professora **Cláudia Ferreira Santos** que deu preciosas contribuições à época da Qualificação as quais serviram para edificar essa obra de modo mais consistente e diretivo.

À professora **Helena Serra Azul Monteiro** mulher guerreira, abnegada à causa classista e ao desejo de que a Ética povoe as mentes dos que velam pela alegria do mundo.

Ao *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, que cederam, mesmo que involuntariamente, suas preciosas vidas em prol desta intentona científica, em nome da realização da parte experimental de minha tese e em nome do progresso da Ciência como um todo, assim como a **Jociê Andrade Silva**, responsável pelo bem-estar animal e sua disponibilidade aos experimentos.

À **Maria Silvia Helena Freire França**, dotada da sempre vocativa prestabilidade e que colaborou incansavelmente no sucesso das canulações e da montagem do sistema de rim perfundido.

À **Aura Rhanes Farias**, pelo grande apoio na Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, bem como à **Célia Araújo de Carvalho** e **Laura Alves**

de Souza cujas palavras mansas e fineza sempre tinham ressonância em algum problema prontamente resolvido/ou encaminhado.

Ao querido estimado professor de Melhoramento Animal, **Antônio Amaury Oriá Fernandes** (*in memoriam*), homem probo e dedicado, me fez seu admirador e a quem tenho uma dívida de gratidão jamais paga tampouco cobrada.

A **Antônio Carlos Gomes Belchior Fontenelle Fernandes** (*in memoriam*), poeta e cantador das coisas mais comuns e complexas da geopolítica da alma humana. Artista indescritível que embalou reflexões em prosa e verso num cancionário sem defeito àqueles que prezam a música intelectualizada e contextualizada ao longo dos tempos. Obrigado, Belchior, depois de você, não apareceu mais ninguém e sempre cantou aquilo que sempre queríamos ouvir.

Ao professor **Pedro Jorge Caldas Magalhães**, homem dotado de uma sensibilidade à causa dos requerentes daquilo que a burocracia esbarra, mas a caridade transpõe.

REFLEXÕES

“Não há nada melhor do que despertar o prazer e o amor pelo estudo; caso contrário, só se formam bons carregadores de livros.” **(Michel de Montaigne)**

“Os homens que se julgam sábios são indecisos na hora de mandar e são rebeldes na hora de servir. Portanto, o homem não tem dever de ser sábio nem santo, mas tem obrigação de ser bom.” **(Paulo Coelho, em O Alquimista)**

“As pessoas são solitárias porque constroem paredes ao invés de pontes” **(Joseph F. Newton)**

“Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a bondade com os maldosos; e, por estranho que pareça, não sou grato a nenhum desses professores.” **(Khalil Gibran)**

“Até quando, ó simples, amareis a simplicidade? E vós, escarnecedores, desejareis o escárnio? E vós, insensatos, odiareis o conhecimento?” **(Salomão em Provérbios, capítulo 1, verso 22)**

“Caminante, no hay camino; se hace camino al andar.” **(Antonio Machado)**

“O perdão é um catalisador que cria a ambiência necessária para uma nova partida, para um reinício” **(Martin Luther King)**

“Para o triunfo do mal, basta que os bons fiquem de braços cruzados” **(Albert Camus)**

*O Fortuna, velut luna/ Statu variabilis/ Nunc, obdurat et tunc curat/ Ludo mentis aciem/ Egestatem, potestatem/ dissolvit ut glaciem.***(Carl Off)**

A letra A tem meu nome/ Dos sonhos eu sou o amor” **(Raul Seixas/ P. Coelho)**

“E os que foram vistos dançando foram julgados insanos pelos que não conseguiam ouvir a música.” **Friedrich Nietzsche**

“Ouve o conselho de quem muito sabe; sobretudo, porém, segue o conselho de quem muito te estima.” **(A. Graf)**

“Se teus projetos têm prazo de um ano, semeia trigo; se teus projetos têm prazo de dez anos, planta árvores frutíferas; se teus projetos têm prazo de um século, então educa o povo.” **Kuan Tseu**

“Ille nihil dubitat qui nullam scientiam habet” **(Nada duvida quem nada sabe).**

“A vida é curta, a arte duradoura, a oportunidade efêmera, a experiência enganadora, a sentença difícil” **(Hipócrates)**

“Se tiveres paciência num momento de raiva, cem dias de pesar evitarás” **(Provérbio Chinês)**

“Com muita sabedoria, estudando muito, pensando muito, procurando compreender tudo e todos, um homem consegue, depois de mais ou menos quarenta anos de vida, aprender a ficar calado. **(Millôr Fernandes)**

“Comece por fazer o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, estará a fazer o impossível.” **(Francisco de Assis)**

“Ter medo de amar é ter medo da vida; só os mortos são completamente coerentes” **(Aldous Huxley)**

“Vanita, vanitatum et omnia vanitas” **(Salomão em Eclesiastes 1, verso 2)**

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.” **(Charles Darwin)**

“Nem sacrificar a liberdade para assegurar a justiça, nem renunciar à justiça para salvar a liberdade” **(Cardeal Saliège)**

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis. ” **(Fernando Pessoa)**

“Se teus filhos são preguiçosos, não merecem tua herança. Se são trabalhadores, não precisam dela. Então, use-a para dar-te os prazeres da velhice” **(Li Yi-King)**

“A ciência nos ofereceu uma explicação de como a complexidade (o difícil) surgiu como resultado da simplicidade (o fácil).” **(Richard Dawkins)**

(...) Sô da Terra de jandaia, berço de Iracema/
Dono do poema de Zé de Alencar/
Eu sou brasileiro, sou do Nordeste/
Sou cabra da peste, sou do Ceará” **(Patativa do Assaré)**

“Quem pergunta é bobo por cinco minutos. Quem não pergunta é ignorante para sempre” **(Confúncio)**

“Memento, homo, in pulvis est et in pulverem reverteris” **(Moisés)**

“Image no possessions/ I wonder if you can/ No need for greed or hunger/ A brotherhood of men/ Image all the people/ Sharing all the world” **(John Lennon)**

“A noite fria me ensinou a amar mais o meu dia/ E pela dor eu descobri o poder da alegria/ E a certeza de que tenho coisas novas/ Coisas novas pra dizer/ Que uma nova mudança em breve vai acontecer/ E o que há algum tempo era jovem e novo / Hoje é antigo, e precisamos todos rejuvenescer/ Até parece que foi ontem/ Minha mocidade/ Com diploma de sofrer/ De outra Universidade/ E vou viver as coisas novas/ Que também são boas/ O amor, humor das praças/ Cheias de pessoas/ Agora eu quero tudo/ Tudo outra vez” **(Belchior)**

“Há muitos homens que lutam um dia e são bons/ Há outros que lutam um ano e são melhores/ Há aqueles que lutam alguns anos e são muito bons/ Mas existem aqueles que lutam uma vida e são imprescindíveis” **(Bertold Brecht)**

“Eu gosto de olhos que sorriem, de gestos que se desculpam, de toques que sabem conversar e de silêncios que se declaram. ” **(Machado de Assis)**

"É preciso correr riscos. Só entendemos direito o milagre da vida quando deixamos que o inesperado aconteça. Todos os dias, Deus nos dá um momento em que é possível mudar tudo o que nos deixa infelizes. Todos os dias procuramos fingir que não percebemos este momento, que hoje é igual a ontem e será igual ao amanhã. Só sentimos medo de perder aquilo que temos, sejam nossas vidas ou nossas plantações. Contudo, esse medo passa quando entendemos que a nossa história e a história do mundo foram escritas pela mesma Mão **(Paulo Coelho)**

“Aquele que entre vós for o menor de todos, esse mesmo será grande. **(Jesus de Nazaré, o Cristo, citado por Lucas, capítulo 9, verso 48).**

RESUMO

O escape vascular é definido como a incapacidade do músculo liso arterial em manter-se contraído, completo ou parcialmente, quando sobre ele incide um estímulo vasoconstritor constante, como o que ocorre durante a infusão de agonistas adrenérgicos (noradrenalina, fenilefrina, etc.). O escape parece ter um significado especial como mecanismo protetor frente às variações súbitas e frequentes da tonicidade vascular. Os mecanismos envolvidos com a taquifilaxia de rápida evolução foram extensamente estudados em termos moleculares, especialmente para os receptores acoplados à proteína G. Neste trabalho objetivou-se avaliar os efeitos do uso de metformina, glimepirida e glibenclamida no escape renovascular de rim isolado de coelho em animais normais, suas repostas pressóricas no fluxo de perfusato, fluxo urinário, resistência e reatividade vasculares. Foram utilizados protocolos com sistema aberto de rim isolado e perfundido, bem como de anéis de aorta para estudo desses eventos. A infusão dos três antidiabéticos orais, em solução de Krebs-Henseleit, mostrou aumento médio na pressão de perfusão em comparação com a média do grupo controle (KH: $25,46 \pm 3,63$ mmHg; MET+KH: $58,19 \pm 5,49$ mmHg; GLIM+KH: $63,91 \pm 7,80$ mmHg; GLIB+KH: $102,27 \pm 13,28$ mmHg), salientando-se que a glibenclamida produziu curva de pressão ascendente, e em todos os parâmetros de perfusato, fluxo urinário e resistência vascular foram alterados significativamente. Nas infusões com fenilefrina, em três curvas, observaram-se alterações nas pressões de perfusão (KH+PHE: $117,31 \pm 12,24$ mmHg; MET+ PHE: $111,68 \pm 8,62$ mmHg; GLIM+ PHE: $102,91 \pm 11,28$ mmHg; GLIB+ PHE: $101,77 \pm 10,27$ mmHg) Observou-se, também, intensa taquifilaxia quando comparados todos os grupos experimentais, bem como a presença de escape renovascular onde se diferenciaram estatisticamente nas curvas de pressão (KH+PHE: $15,19 \pm 3,09$ %; MET+PHE: $23,45 \pm 3,70$ %; GLIM+PHE: $38,88 \pm 5,15$ %; GLIB+PHE: $34,11 \pm 6,28$ %). A confirmação da participação de endotelina, via bloqueio com tezosentan e infusão posterior com glibenclamida (TEZO+GLIB: $91,42 \pm 4,93$ mmHg. Quando se infundiu glimepirida e metformina (PHE+MET: $0,97 \pm 0,03$ g; PHE+GLIM: $1,45 \pm 0,07$ g), observou-se notória potencialização dos efeitos pressóricos em anéis de aorta, fato esse bastante evidente nessa pesquisa. Portanto, a pesquisa revelou a existência de forte interação farmacológica de drogas antidiabéticas orais em rim perfundido, assim como em anéis de aorta de coelho, o que mostrou sinais sugestivos de que nessas condições também houve escape vascular, caracterizando significativa potenciação das repostas α_1 -adrenérgicas no escape renovascular e na taquifilaxia.

Palavras-chave: hipoglicemiantes orais, reatividade vascular adrenérgica, escape renovascular, taquifilaxia.

ABSTRACT

STUDY OF THE EFFECTS OF ORAL ANTIDIABETICS IN ADRENERGIC VASCULAR REACTIVITY, RENOVASCULAR ESCAPE AND TACHYPHYLAXIA IN ISOLATED RABBIT KIDNEYS

Vascular escape is defined as the inability of the arterial smooth muscle to remain contracted, completely or partially, when a constant vasoconstrictor stimulus occurs, such as occurs during the infusion of adrenergic agonists (noradrenaline, phenylephrine, etc.). The vascular escape appears to have a special meaning as a protective mechanism against sudden and frequent variations in vascular tone. The mechanisms involved in rapidly tachyphylaxis have been extensively studied in molecular terms, especially for G protein coupled receptors. The aim of this study was to evaluate the effects of metformin, glimepiride and glibenclamide on the renovascular escape of isolated rabbit kidney in normal animals, their blood pressure responses in perfusate flow, urinary flow, vascular resistance and reactivity. Protocols with open system of isolated and perfused kidney, as well as of aorta rings were used to study these events. The infusion of the three oral antidiabetic drugs in Krebs-Henseleit solution showed an increase in perfusion pressure compared to the control group (KH: 25.46 ± 3.63 mmHg; MET + KH: 58.19 ± 5.49 mmHg; GLIM + KH: 63.91 ± 7.80 mmHg, GLIB + KH: 102.27 ± 13.28 mmHg), noting that glibenclamide obtained an upward pressure curve, and all parameters of perfusate, urinary flow and vascular resistance were significantly altered. In infusions with phenylephrine, in three curves, changes in perfusion pressures were observed (KH + PHE: 117.31 ± 12.24 mmHg; MET + PHE: 111.68 ± 8.62 mmHg; GLIM + PHE: 102.91 ± 11 , As well as the presence of vascular escape where they were statistically different in the pressure curves (KH + PHE: 15, 28, 28, 28, 28, $19 \pm 3.09\%$, MET + PHE: $23.45 \pm 3.70\%$, GLIM + PHE: $38.88 \pm 5.15\%$, GLIB + PHE: $34.11 \pm 6.28\%$). The confirmation of the participation of endothelin by tezosentan blockade and subsequent infusion with glibenclamide (TEZO+GLIB: 91.42 ± 4.93 mmHg), and the potentiation of pressure effects in aortic rings was evident in this study when glimepiride and metformin were infused (PHE + MET: 0.97 ± 0.03 g; PHE + GLIM: 1.45 ± 0.07 g). Therefore, the research revealed the existence of strong pharmacological interaction of oral antidiabetic drugs in perfused kidney, as well as in rabbit aorta rings, characterizing significant potentiation of α_1 -adrenergic responses in renovascular escape and tachyphylaxis.

Key-words: Oral hypoglycemic agents, vascular adrenergic reactivity, renovascular escape, tachyphylaxis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Estrutura molecular da metformina 29
- Figura 2. Estrutura molecular da glimepirida 30
- Figura 3. Estrutura molecular da glibenclamida 31
- Figura 4. Desenho esquemático do sistema aberto de perfusão de rim de coelho 46
- Figura 5. Foto do Sistema de Perfusão Aberta em rim isolado de coelho. 46
- Figura 6. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit. 52
- Figura 7A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit em duas curvas pressóricas em que se observa escape. Na figura 7B são comparadas as taquifilaxias de ambas as curvas 55
- Figura 8A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit em três curvas que se demonstram escape vascular. Figura 8B são comparadas as taquifilaxias das três curvas, evidenciando-se através do desenho gráfico acima. 57
- Figura 9. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com cloridrato de metformina (500 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit. 60
- Figura 10A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com cloridrato de metformina (500 μ g/mL) e fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit onde se nota a taquifilaxia e o escape vascular nas três curvas de infusão. Na Figura 10B são comparadas as taquifilaxias das três curvas de infusão com fenilefrina 61
- Figura 11. Reatividade contrátil em anéis de aorta em experimentos com infusão de fenilefrina e, posteriormente, metformina, evidenciando aumento na contratilidade induzida pela droga antidiabética. 62
- Figura 12. Experimento de anel de aorta de coelho para se validar a potencialidade da metformina quanto à vasorreatividade contrátil em infusões com fenilefrina. 62
- Figura 13. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com

- glimpirida (2 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit. 65
- Figura 14A e B. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com glimepirida (2 μ g/mL) e fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit. 66
- Figura 15. Reatividade contrátil em anéis de aorta em experimentos com infusão de fenilefrina e, posteriormente, glimepirida, evidenciando aumento na contratilidade induzida pela droga antidiabética. 67
- Figura 16A. Gráfico da reatividade contrátil em anéis de aorta em experimentos com infusão de fenilefrina e, posteriormente, glimepirida, evidenciando aumento na contratilidade induzida pela droga antidiabética. Na Figura 16B são comparadas as taquifilaxias das três curvas de infusão com fenilefrina 67
- Figura 17. Gráfico comparativo dos experimentos de anel de aorta de coelho para se validar a potencialidade da metformina e glimepirida quanto à vasorreatividade contrátil em infusões com fenilefrina. 68
- Figura 18. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com glibenclamida (5 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit. 71
- Figura 19 Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com tezosentan (10⁻⁶M) por 30 minutos e com glibenclamida (5 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit. 72
- Figura 20A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com glibenclamida (5 μ g/mL) e fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit, observando-se intensa taquifilaxia e escape vascular. Na Figura 20B são comparadas as taquifilaxias das três curvas de infusão com fenilefrina 73
- Figura 21. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com tezosentan (10⁻⁶M) e, posteriormente glibenclamida (5 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit quando comparadas às pressões do grupo com infusão de glibenclamida sem fenilefrina. 74
- Figura 22A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com indometacina (0,33mg/mL) e fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit em duas curvas de infusão. Na Figura 22B são comparadas as taquifilaxias das três curvas de infusão com fenilefrina 75
- FIGURA 23. Comparativo entre os escapes vasculares dos grupos de rins perfundidos com antidiabéticos orais em solução de KH e fenilefrina (10 μ g/mL). C1= primeira curva de infusão de fenilefrina; C2= segunda curva de infusão de fenilefrina e C3= terceira curva de infusão de fenilefrina. 78

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Dinâmica de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.	53
Quadro 2. Efeito da fenilefrina (10µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit, em duas curvas de escape vascular.	56
Quadro 3. Efeito da fenilefrina na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit, em três curvas que apresentam escape.	58
Quadro 4. Efeito do cloridrato de metformina (500µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.	60
Quadro 5. Efeito do cloridrato de metformina (10µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.	63
Quadro 6. Efeito da glimepirida (2µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.	65
Quadro 7. Efeito da glimepirida (2µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.	68
Quadro 8. Efeito da glibenclamida (5µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.	71
Quadro 9. Efeito da glibenclamida (5µg/mL) e tezosentan (10 ⁻⁶ M) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit	72
Quadro 10 Efeito da glibenclamida (5µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (1µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit	74
Quadro 11. Efeito da indometacina (0,33mg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.	76
Tabela 1. Escapes renovasculares totais dos grupos de rins perfundidos com antidiabéticos orais em solução de KH e fenilefrina (10µg/mL).	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
AT1R	Receptor tipo 1 de Angiotensina
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
C1, C2 e C3	Curvas 1, 2 e 3 de infusão de fenilefrina
CAD	Cetoacidose Diabética
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupo de Diferenciação)
CEPA	Comitê de Estudos em Pesquisa Animal da Universidade
cols.	Estadual do Ceará
COX	Colaboradores
DAC	Cicloxigenase
DCV	Doença Arterial Coronariana
DM	Doenças Cardiovasculares
DM-1	<i>Diabetes mellitus</i>
DM-2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
eNOS	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
ET-1	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EV	Endotelina-1
FSR	Escape Vascular
GLIB	Fluxo Sanguíneo Renal
GLIM	Glibenclamida
GLP	Glimepirida
HFD	Proteína Semelhante ao Glucagon
HNF	Dieta Rica em Lipídeos
ICA	Fatores de Transcrição Nuclear do Hepatócito
INDO	Anticorpos anti-Células da Ilhota
IR	Indometacina
K ⁺ ATP	Resistência à Insulina
KCl	Canais de potássio ativados por ATP
KH	Cloreto de Potássio
LAV	Krebs-Henseleit
MET	Lavagem do Sistema de Infusão
NA	Metformina
NO	Noradrenalina
NOR	Óxido Nítrico
PAF	Noradrenalina
PGF _{2α}	Fator de Agregação de Plaquetas
PHE	Prostaglandina F 2-alfa
	Fenilefrina

PPR	Pressão de Perfusão renal
RI	Resistência à Insulina
RVR	Resistência Vascular Renal
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
STZ	Estreptozotocina
SUR	Receptor de Sulfonilureias
TEZO	Tezosentan
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
TxA ₂	Tromboxano A ₂
ΔP	Varição de Pressão entre as Curvas de Infusão

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	16
LISTA DE QUADROS	18
LISTA DE ABREVIATURAS	19
1. INTRODUÇÃO	22
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
5. RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e Epidemiologia

A *diabetes mellitus* (DM) é uma patologia que foi descrita pela primeira vez no século II da era cristã e acomete várias populações nos dias atuais. O termo *diabetes* deriva etimologicamente do grego **διαβήτης** e significa “passar através ou por um sifão” e foi criado pelo médico Areteu da Capadócia o qual fez uma analogia deste com o organismo de seus pacientes, por ter notado a entrada e saída abundante de água do organismo deles através da urina, além de ter percebido que eles comiam muito, porém a energia não era aproveitada (PEREIRA, 2006; HENRY, 2008).

No ano de 1670, Thomas Willis incorporou o termo *mellitus*, por causa da urina adocicada dos pacientes e, em 1815, Chevreul demonstrou a estrutura química do açúcar eliminado, a glicose. O diagnóstico clínico naquela época era feito mediante provação da urina daqueles que apresentavam a suspeita. Assim, essa doença passou a ser chamada de *diabetes mellitus* que significa produzir urina doce (GHELMAN, 2009; PEREIRA, 2011).

A DM é considerada um problema mundial de saúde, porque nos últimos anos, têm sido diagnosticadas cada vez mais pacientes, corroborando com a teoria de que está havendo um contínuo crescimento no número de casos. Desta forma, as pessoas acometidas, se não forem tratadas, poderão morrer mais cedo, devido ao surgimento das complicações secundárias produzidas pela doença (GAMA, 2002; SILVA, 2008).

A *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) representa aproximadamente 10% de todos os casos diagnosticados, sendo ocasionado por lesão nas células β , comprometendo a produção e secreção de insulina. Quando o pâncreas endócrino é acometido por esta patologia, ocorre um extermínio gradativo destas células, até chegar ao estágio de destruição quase que completa (95% das células afetadas), incapacitando o organismo em produzir a glicose como substrato primário, bem como de armazená-la em seus tecidos. A destruição celular decorre de reações imunológicas, porque são encontrados anticorpos dirigidos contra as proteínas das células β . Portanto, esta reação deixa as pessoas insulino dependentes como medicação substitutiva (SKYLER, 2004; GUYTON e HALL, 2006).

As etnias com maiores índices da *diabetes mellitus* do tipo 2 são os índios americanos, americanos hispânicos e afro-americanos, seguido dos europeus. As

taxas de prevalência variam mundialmente e a DM-2 é mais propensa nos hindus, polinésios, micronésios e latino-americanos. Africanos, aborígenes australianos e asiáticos, apresentam um maior risco, após migrarem para os EUA, isso é devido à incorporação dos hábitos alimentares do ocidente, como baixa atividade física, dieta rica em gordura e bem calórica (BARNETT e BRAUNSTEIN, 2005).

1.2 Fisiopatologia Diabetes tipo 1

A DM-1 é desenvolvida com mais frequência na infância, progredindo na puberdade e com o decorrer da idade. Atualmente as denominações genéricas como “*diabetes juvenil*” e “*diabetes mellitus dependente de insulina*” estão sendo consideradas obsoletas, pois a recente classificação traz uma designação que reflete nos mecanismos patogênicos e não mais na idade ou modo de tratamento da doença, embora os pacientes necessitem de insulina exógena. No entendimento desta patologia, é necessário ressaltar os fatores genéticos, ambientais e autoimunes que contribuem para seu desenvolvimento e aparecimento (BARNETT e BRAUNSTEIN, 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, SBD, 2006).

A DM-1 é uma patologia de evolução progressiva, e pode se desenvolver durante anos em uma fase pré-clínica. Todavia, seu surgimento pode ocorrer em um período curto e abrupto. Nela verifica-se uma hiperglicemia de jejum e uma cetoacidose diabética, devido a um processo inflamatório que causa a depleção das células β . Histologicamente, nota-se a presença de infiltrados inflamatórios com células linfomononucleares, sendo que os macrófagos aparecem como as primeiras células inflamatórias, observando-se mais tarde que as ilhotas estão infiltradas por células mononucleares secretoras de citocinas ativadas, caracterizando o quadro da fisiopatologia (BALDA, PACHECO-SILVA, 1999; GUYTON e HALL, 2006).

Inicialmente, o processo inflamatório é decorrente da agressão dos linfócitos T ($CD8^+$, citotóxicos, e $CD4^+$, *helper* ou auxiliares) os quais estão associados ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Portanto, é um processo dependente da imunidade celular, no entanto, verifica-se também a presença de linfócitos B. A manifestação de linfócitos T, interagindo com células apresentadoras de antígenos (APCs), acarreta a secreção de citolisinas (enzimas capazes de provocar a lise celular, no caso as secretoras de insulina), ativando também as vias

de sinalização da apoptose (BALDA, PACHECO-SILVA, 1999; GUYTON e HALL, 2006).

Macrófagos produzem e liberam citocinas como interleucina (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) os quais destroem as células β . A IL-1 lesa estas células por meio dos radicais livres como os ânions superóxidos, o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxilas, pois as células β são bem sensíveis a esses radicais. As ações da IL-1 são potencializadas pelo TNF- α e interferon gama (INF- γ). Então, ocorre a diminuição das ilhotas, embora em um primeiro momento as reservas de insulina possam suprir a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose (RODRIGUES, 2012; GROSS *et al.*, 2000).

A suscetibilidade genética para o desenvolvimento da DM-1 está aumentada nos parentes de primeiro grau dos acometidos (2 a 6%), sendo que 50% da suscetibilidade tem uma ligação com os genes do MHC que codificam os antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II (moléculas expressadas na superfície dos macrófagos apresentadores de antígenos). Estas moléculas formam um complexo com antígenos extrínsecos processados, ou autoantígenos que ativam os linfócitos T CD4⁺. Então, tem-se observado nos indivíduos com predisposição a DM-1 a expressão das moléculas geradoras da resposta imune, denominadas DR3 e DR4, com também a influência forte dos alelos nos *loci* classe II HLA-DR, ou HLA-DQ (ATKINSON e MACLAREN, 1994).

Autoanticorpos contra células das ilhotas (ICA) e anticorpos contra a insulina (IAA) estão associados no desenvolvimento da DM-1, já que no diagnóstico clínico dos indivíduos estão presentes, 50% dos ICA e 50% dos IAA. Há uma hipótese de que eles sirvam como marcadores da destruição imunológica das ilhotas, estando dirigidos contra os antígenos-descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e a proteína tirosinofosfatase-2 (IA2) - das células β , iniciando a resposta imune. A combinação destes autoanticorpos permite uma previsão probabilística, pois 70% dos parentes em primeiro grau, positivos para ambos os anticorpos, desenvolvem a doença dentro de cinco anos (McPHEE e GANONG, 2007).

Para o desenvolvimento da DM-1 o fator genético é imprescindível e necessário, no entanto, este fator *per se* não é suficiente para a patologia. Foi sugerido que fatores ambientais (dieta e toxinas) coligados a genética, contribuam sinergicamente para o processo autoimune. Porém, a ênfase foi direcionada as infecções virais (sarampo, rubéola, vírus *Coxsackie B*), por conta do tropismo pelas células β . A destruição imunológica destas células é fundamentada na hipótese do

mimetismo molecular (antígenos extrínsecos homólogos as células das ilhotas), como por exemplo, um antígeno identificado de células das ilhotas (GAD) que é semelhante às proteínas do vírus *Coxsackie*, e da albumina sérica bovina, presente no leite de vaca, cujo consumo, na infância, pode estar associado ao aumento da incidência *diabetes* (SMELTZER & BARE, 2005; McPHEE e GANONG, 2007).

No tecido muscular ocorre a lise das proteínas e a liberação dos aminoácidos que serão usados no fígado como substratos para a gliconeogênese. Os triglicerídeos armazenados no tecido adiposo são degradados e liberados na circulação, bem como no fígado e os ácidos graxos livres e glicerol serão usados como substâncias gliconeogênicas e para a formação de corpos cetônicos, passíveis de serem utilizados pelo cérebro como combustível. Essas cetonas consistem em β -hidroxibutirato e acetoacetato. A presença de concentrações excessivamente altas desses ácidos pode causar depleção do bicarbonato sérico, resultando finalmente em um estado de acidose metabólica, denominada cetoacidose diabética (CAD) (GUYTON e HALL, 2006; BAYNES e DOMINICZAK, 2011).

1.3 Fisiopatologia Diabetes tipo 2

A *diabetes mellitus* tipo 2 (DM-2) é uma doença complexa e multifatorial resultante de defeitos da secreção e ação da insulina ou de ambos, sendo responsável por 90% de todos os casos de *diabetes* diagnosticados. Os fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na sua patogênese e seu início é insidioso com sintomas mais brandos. O pico de incidência é maior em adultos com mais de 40 anos de idade, que tenham uma longa história de excesso de peso e um histórico familiar desta doença. Contudo, este tipo de *diabetes* está atingindo cada vez mais adolescentes e crianças, devido aos hábitos alimentares, levando à obesidade infantil (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, ADA, 2010; REIS e VELHO, 2002; BRASIL, 2013).

Estudos iniciados a partir do histórico familiar e com gêmeos assinalaram que os fatores genéticos apresentam um maior impacto na determinação e predisposição para este tipo de *diabetes*. Pelo fato de 35% dos parentes em primeiro grau apresentarem esta patologia ou tolerância à glicose diminuída (TGD) a ocorrência de DM-2 entre gêmeos univitelinos gira em torno de 50-80%, um índice alto quando comparados aos números de casos de gêmeos bivitelinos que são menos do que

20%. Além disso, observa-se ainda a grande variação na prevalência deste tipo de *diabetes* em diferentes grupos étnicos (PEREIRA, 2006; McPHEE e GANONG, 2007).

Sobre as anormalidades genéticas desta doença, ainda há muito o que ser esclarecido, porém outros fatores estão bem estabelecidos e contribuem significativamente para o risco desta *diabetes mellitus* como o aumento da idade, a redução da atividade física e principalmente a epidemia da obesidade. É importante salientar a existência de uma rara forma autossômica de DM-2 que acomete 2 a 5% de pessoas magras, a *diabetes* da maturidade desenvolvida no jovem (do inglês, *MODY*), resultante das mutações da glicoquinase (*MODY2*) e fatores de transcrição nuclear do hepatócito (*HNF-4 α* , *MODY1*) e (*HNF- α 1*, *MODY3*). Há também a *diabetes* mitocondrial, mutação no DNA mitocondrial, prejudicando a fosforilação oxidativa (BARNETT e BRAUNSTEIN, 2005; BAYNES e DOMINICZAK, 2011).

Diabetes tipo 2 tem sido reconhecido como um fator de risco independente para várias doenças cardiovasculares (DCV), incluindo a doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, cardiomiopatia e insuficiência cardíaca congestiva. Complicações vasculares do diabetes também se estendem à doença microvascular ao manifestar-se como nefropatia diabética, neuropatia ou retinopatia. O impacto do controle glicêmico na redução de complicações microvasculares está bem estabelecido (PLUTZK, 2011).

A resistência à insulina é definida como a incapacidade dos tecidos-alvo em responder normalmente a ação dos efeitos metabólicos da insulina. Nos indivíduos com resistência à insulina diminui-se a captação de glicose na musculatura esquelética com redução na glicólise e oxidação de ácidos graxos (AGs) hepáticos, além da incapacidade de suprimir a gliconeogênese hepática. Os carboidratos são pouco metabolizados e armazenados, resultando no aumento de glicose plasmática, insulina e glucagon. O superestímulo de secreção da insulina em longo prazo causa a exaustão das células β , devido ao efeito glicotóxico. Dessa forma, a perda da sensibilidade à insulina nos hepatócitos é provavelmente o maior contribuinte da patogenia da RI (KUMMAR *et al.*, 2010; GABBAY e cols., 2003).

Uma variedade de defeitos na via de sinalização da insulina nos estados de RI causa a redução da fosforilação da tirosina e o aumento da fosforilação da serina no receptor de insulina e das proteínas IRS os quais atenuam a transdução do sinal. Porém, poucos fatores desempenham um papel tão importante no desenvolvimento da RI quanto à obesidade (KUMMAR *et al.*, 2010).

A obesidade que integra as doenças crônicas não-transmissíveis é definida como um distúrbio dos sistemas reguladores do peso corporal e é caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura corpórea. Noventa e um por cento das pessoas com DM-2 acometidos são obesas e mostram um índice de massa corporal (IMC) > 25 com dietas baixas em fibras e cereais, alto consumo de gordura polissaturada, tabagismo e sedentarismo (CHAMPE, HARVEY e FERRIER, 2006; McDERMOTT, 2010).

Quando se compara os tempos passados aos atuais é notória a inversão dos papéis no que diz respeito ao gasto calórico e a ingestão dos alimentos, pois as sociedades modernas possuem uma facilidade em encontrar mantimentos industrializados, por isso consomem cada vez mais, ao passo que o estilo de vida tornou-se sedentário, criando um superávit calórico e favorecendo a epidemia da obesidade e DM-2 (MITCHELL *et al.*, 2012).

O ganho na massa corporal de gordura tem influência no tecido adiposo, e este tecido tem sido implicado no desenvolvimento da RI. O tecido adiposo não é só um depósito de armazenamento do excesso de energia é também um órgão endócrino secretório de substâncias conhecidas como adipocinas. Estes são secretadas em resposta a alterações no estado metabólico, como por exemplo, a resistina (pró-hiperglicêmicas), leptina e a adiponectina (anti-hiperglicêmicas) (KUMMAR *et al.*, 2010; MITCHELL *et al.*, 2012).

A resistina é uma proteína próinflamatória, secretada tanto por monócitos como adipócitos, expressos e secretados significativamente em indivíduos magros, porém seus níveis estão comumente mais elevados na obesidade, por conta do aumento da gliconeogênese hepática. A leptina e a adiponectina são essenciais na sensibilidade à insulina, pois atuam diretamente na atividade da proteína quinase ativada (AMPK), enzima responsável pela promoção da oxidação de AGs no fígado e miócitos esqueléticos. Porém, quando seus genes codificadores apresentam-se defeituosos, seus níveis são reduzidos. Assim, estas citocinas induzem a RI, aumentando o estresse oxidativo, evento o qual ativam múltiplas cascatas de sinalização que antagonizam a ação da insulina nos tecidos periféricos (KUMMAR *et al.*, 2010; FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

Os sintomas da DM-2 parecem com os da DM-1, devido os diabéticos apresentarem poliúria, polidipsia, polifagia, glicosúria (eliminação de glicose na urina), visão turva, náuseas, êmese, fraqueza, tontura, irritabilidade, fadiga extrema,

formigamento nas pernas, pé diabético, infecções frequentes ou recorrentes da pele, gengiva ou bexiga e cicatrização lenta de ferimentos ou escoriações (NIEMAN, 1999; VIANA e RODRIGUEZ, 2011).

As principais complicações relacionadas à DM-2 são as microvasculares, nefropatia, retinopatia e neuropatia e as macrovasculares que englobam as doenças cardiovasculares (DC). Estima-se que 50% a 80% da mortalidade dos diabéticos associam-se a esta última com destaque à aterosclerose que contribui para a manifestação da doença arterial coronariana (DAC), doença cerebrovascular (DCV), acidente vascular cerebral (AVC), doença arterial periférica (DAP) e de vasos periféricos como patologias da aorta, rins e de membros (MONTEIRO e cols., 2007).

1.4 Agentes antidiabéticos orais

Os agentes hipoglicemiantes orais aumentam a secreção de insulina ou aumentam a sensibilidade dos tecidos à insulina endógena, portanto, são muito utilizados em pacientes nos quais não exigem insulina como ferramenta terapêutica de vários esquemas em que funciona sozinho ou com outros agentes hipoglicemiantes orais do tipo sulfonilureias (KRENTZ & BAILEY, 2005).

1.4.1 Metformina

A metformina é o agente hipoglicemiante mais comumente utilizado, uma vez que a fenformina (seu antecessor farmacológico usado) causava acidose láctica. As propriedades hipoglicêmicas da metformina devem-se, sobretudo, à supressão da produção hepática de glicose, especialmente a gliconeogênese hepática e ao aumento da sensibilidade periférica à insulina nos tecidos (RÜEGG & CADUFF, 2017). Embora o mecanismo exato de ação hipoglicemiante da metformina ainda não esteja claro, é provável que interrompa processos oxidativos mitocondriais no fígado, podendo corrigir anormalidades do metabolismo do cálcio intracelular em tecidos sensíveis à insulina (fígado, músculo esquelético e adipócitos) e tecido cardiovascular (KIRPICHNIKOV *et. al.*, 2002). Portanto, são propostos alguns possíveis mecanismos de ação desta droga: 1) estimulação direta da glicólise tecidual, com aumento da remoção sanguínea da glicose; 2) redução da gliconeogênese hepática; 3) redução na reabsorção de glicose gastrointestinal, com

aumento na conversão de glicose em lactato pelos enterócitos e/ou 4) redução dos níveis plasmáticos de glucagon, além de ativar a AMPK (KATZUNG, 2014).

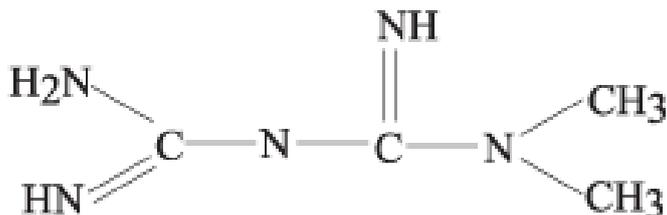


Figura 1. Estrutura molecular da metformina (Fonte: SARTORI *et al.*, 2009)

Ademais possui três vantagens terapêuticas sobre os outros agentes hipoglicemiantes as quais cita-se a perda de peso, sem produzir hipoglicemia e nefroproteção. Por essas razões, deve-se considerar a metformina como um dos melhores agentes visando à nefroproteção para o diabético tipo dois (obeso ou não) (GOO *et. al.*, 1996; TIKOO e cols., 2016; RAVINDRAN e cols., 2017).

Em um estudo recente, LUND e colaboradores (2008) compararam os efeitos da metformina com os da repaglinida (um secretagogo de insulina de ação curta) e demonstraram que os níveis de fator de necrose tumoral-alfa, antígeno ativador do plasminogênio-1, do antígeno ativador de plasminogênio tecidual, fator de Von Willebrand, molécula de adesão-1 intracelular solúvel e E-selectina solúvel foram significativamente menores durante os tratamentos pela metformina *versus* repaglinida. Há muitos outros efeitos ainda não definidos dessa substância, tais como aqui apresentados.

1.4.2 Sulfonilureias

Outro grupo de agentes hipoglicemiantes são as sulfonilureias, as quais foram desenvolvidas após observação de hipoglicemia produzida por um derivado da sulfonamida utilizado no tratamento da febre tifoide. Seu mecanismo de ação consiste no estímulo à liberação de insulina pelas células β pancreáticas, bem como podem atuar diminuindo a metabolização hepática do hormônio. Com administração crônica os níveis de insulina diminuem a níveis menores, mas os níveis de glicose diminuídos são mantidos; tal evento ainda não está totalmente esclarecido e pode ser referido como memória glicêmica vascular (BEREZIN, 2016).

As primeiras a serem usadas foram a tolbutamida e a clorpropamida. Os agentes de segunda geração são metabolizados no fígado em suas formas inativas,

como por exemplo, a glipizida, por isso, podem apresentar menos risco de hipoglicemia nos pacientes com função renal reduzida, porém seu efeito hipoglicêmico máximo não é maior. Ligam-se às subunidades do receptor de sulfonilureia (SUR1) e bloqueiam canal de K^+ a receptores (AGUILAR-BRYAN *et. al.*, 2001; BRYAN *et. al.*, 2005);

Melander (1996) propõe que, tanto a resistência à insulina quanto a secreção de insulina prejudicada levam a estabelecer um quadro de hiperglicemia crônica, e se não tratada, promovem agravos indesejáveis em vários sistemas fisiológicos. Isso justifica o uso de drogas que promovem a liberação de insulina, por exemplo, a glipizida. A exposição contínua a concentrações elevadas de sulfoniluréias pode provocar uma downregulation das células beta.

As tiazolidinodionas, ou glitazonas, foram desenvolvidas após a observação casual de que um análogo do clofibrato, a ciglitazona, que estava sendo usada por seus efeitos no metabolismo de lipídeos, reduziu inesperadamente o nível de glicemia. Atualmente, as glitazonas utilizadas (rosiglitazona e pioglitazona) reduzem a liberação hepática de glicose e aumentam a captação de glicose no músculo, potenciando a eficácia da insulina endógena e reduzindo a quantidade de insulina exógena necessária à manutenção da glicemia (RANG, DALE, RITTER & MOORE, 2004).

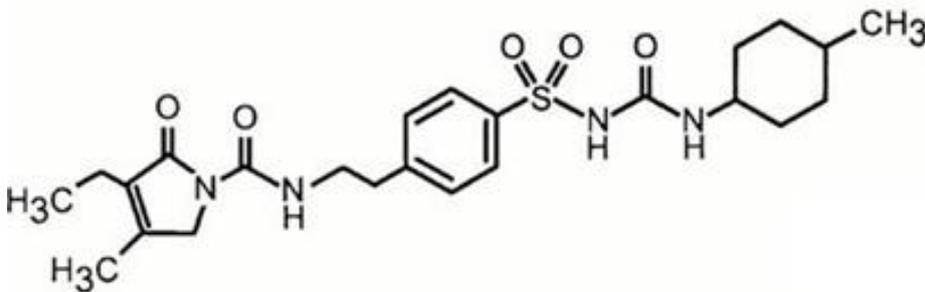


Figura 2. Estrutura molecular da glimepirida (Fonte: Song & Ashcroft, 2001)

Os canais de potássio regulam o potencial de membrana do músculo liso que controla a entrada de cálcio através de canais de cálcio voltagem-dependentes e assim, a contratilidade modifica através do cálcio intracelular. O canal de K^+ /ATP parece ser composto por membros de genes de canal retificador interno (Kir6) e receptores proteicos de sulfonilureias. Os canais K^+ IR não são bem distribuídos quanto os canais dependentes ATP no músculo liso e promoveram um mecanismo pelo qual mudanças no potássio intracelular podem alterar o potencial de membrana das células das ilhotas pancreáticas, e também o diâmetro arterial. Os canais de

K^+ ATP-dependentes contribuem para a condutância em repouso de alguns tipos de músculo liso e podem abrir sob situações de comprometimento metabólico. Os canais de K^+ /ATP são alvos de uma ampla variedade de vasodilatadores e constritores que atuam, respectivamente, através de 3'5' monofosfato cíclico/proteína quinase A e proteína quinase C. Os canais de K^+ ATP também são ativados por um número de vasodilatadores sintéticos (diazóxida e pinacidil) e são inibidos por drogas hipoglicemiantes orais como a glibenclamida. Juntos, canais ATP e K^+ IR são importantes reguladores da função muscular lisa e representam importantes alvos terapêuticos (QUAST & COOK, 1989). Esta pesquisa estudou essas substâncias no rim perfundido.

As sulfonilureias estimulam a secreção de insulina em pacientes diabéticos tipo-2 bloqueando canais de potássio sensíveis a ATP na membrana de células beta pancreáticas. Esse efeito é mediado pela ligação da droga à subunidade do receptor nos canais de K^+ que também estão presentes em outros tecidos, mas frequentemente contém diferentes tipos de subunidades (SUR1 nas células beta, SUR2A no coração e SUR2B nos músculos lisos). A sensibilidade desses diferentes tipos de canais de cálcio às sulfonilureias também é variável: gliclazida e outras substâncias usadas em nossa preparação bloqueiam nas células beta, mas não no coração nem no músculo liso. Já a glibenclamida bloqueia os três tipos de canais com similar afinidade (ASHCROFT & GRIBBLE 2000).

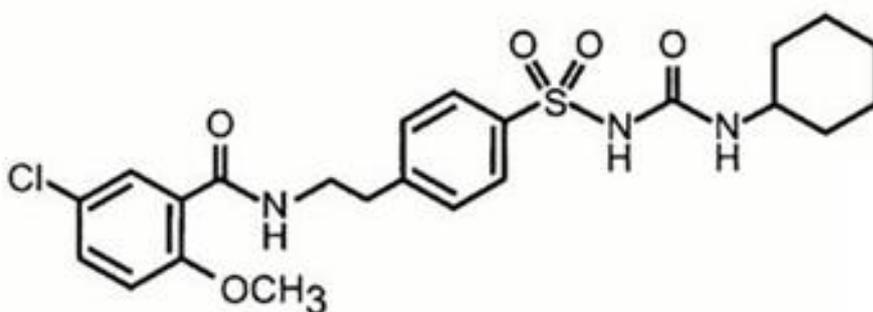


Figura 3. Estrutura molecular da glibenclamida (Fonte: Song & Ashcroft, 2001)

As sulfonilureias antidiabéticas relaxaram completamente artérias coronárias de ratos contraídas por $PGF_{2\alpha}$, demonstrando um efeito no músculo liso vascular. As drogas também relaxaram as contrações induzidas por 30mM de K^+ , mas bem menos potentemente. A eficácia das drogas como relaxantes de músculo liso não correlacionou com suas habilidades em antagonizar a ação vasorrelaxante da

cromakalina. O vasorrelaxamento induzido pelas sulfonilureias provavelmente envolve mecanismos outros que interações com canais de K^+ regulados por ATP (NIELSEN-KUDSK & THIRSTRUP, 1991).

1.5 Regulação Glicêmica Renal

Segundo CERSOSIMO (2004), estudos mais recentes confirmaram a vital importância do rim na manutenção da homeostase da glicose. Com uma imensa estrutura bioquímica e um sistema de transporte abundante, o rim é capaz de simultaneamente utilizar e produzir glicose, participando, assim, ativamente no controle dos níveis de glicemia. O rim impede que se desenvolva hiperglicemia extrema com hiperosmolaridade e desidratação intracelular, e é, também, capaz de produzir e acrescentar glicose à circulação nos períodos de hipoglicemia iminente, ajudando, assim, a prevenir a glicocitopenia através de sua própria gliconeogênese, complementar ao fígado (FONTELES & LEIBACH, 1982).

Diversas pesquisas já demonstraram que o rim tem uma imensa capacidade bioquímica, tal como *locus* importante de eventos de gliconeogênese e sendo a glicose filtrada pelos glomérulos é reabsorvida integralmente de forma ativa pelos túbulos renais. A excreção urinária de glicose que excede o limiar de reabsorção tubular, que se situa em torno de 190-200 mg/dl e representa uma função renal que tem como finalidade principal evitar que os níveis plasmáticos de glicose alcancem valores metabólicos desfavoráveis (*splay* fisiológico). Desta maneira, o rim impede que se desenvolva um estado de hiperglicemia extrema com sérias complicações, como a hiperosmolaridade e a desidratação intracelular. O rim é, também, capaz de produzir e acrescentar glicose à circulação, especialmente durante períodos de jejum (OWEN *et. al.*, 1969; FONTELES *et al*, 1973).

De acordo com CANO (2002), novos dados sobre a liberação de glicose renal e a sua captação obtida através da combinação de glicose arteriovenosa sistêmica e o equilíbrio de diluição renal da glicose tornam possível a reavaliação do papel do rim na homeostase da glicose. Assim como o fígado, o rim obedece a uma complexa regulação neuro-hormonal com a prioridade de armazenar e mobilizar energia no organismo, sempre procurando manter, porém, a glicemia dentro de valores normais. Com a perda progressiva de função renal, a homeostase da glicose se altera de forma significativa, e é preciso reavaliar o tratamento dos pacientes diabéticos, sem esquecer seu papel regulatório sobre a insulinemia. (CERSOSIMO, 2004).

A magnitude da glicogenólise pós-absortiva foi recentemente reavaliada utilizando medições do conteúdo de glicogênio hepático por ressonância magnética nuclear (PETERSEN *et al.*, 1996). Estes estudos mostraram que a glicogenólise representava 45% da liberação de glicose hepática, em vez dos 25% previamente determinados. Esses achados estavam de acordo com o relatório de que a liberação total de glicose devido à gliconeogênese, calculada a partir do método de diluição isotópica, responde por 54% da liberação total de glicose (CHANDRAMOULI *et al.* 1997).

A liberação de glicose renal seguia aparentemente a mesma ordem de grandeza que a liberação de glicose esplênica durante o período pós-absortivo. Além disso, a peculiaridade desta função renal na liberação de glicose pareceu estar relacionada à sua sensibilidade à ação hormonal, o que dá ao rim um papel mais proeminente na homeostase da glicose durante diversos estados fisiológicos e/ou patológicos. Além disso, a reavaliação da gliconeogênese renal juntamente com estudos sobre substratos gliconeogênicos demonstram diversas evidências para um papel-chave do rim no metabolismo da glicose (CANO, 2002).

Portanto, o controle da glicemia plasmática em pacientes diabéticos que desenvolvem insuficiência renal é uma tarefa complexa e difícil. A presença de insuficiência renal gera uma situação ambígua, onde períodos de hiperglicemia severa e hipoglicemia frequente se alternam (LACAVA *et al.* 2017). Em consequência, em pacientes com insuficiência renal é necessário ajustar os medicamentos, tanto na dose como no tipo de insulina usada para manter a glicemia dentro de valores aceitáveis.

Assim, pacientes com função de célula beta normal podem alterar a secreção de insulina para acomodar os diferentes graus de sensibilidade à insulina e, deste modo, manter a glicemia dentro dos valores normais. Estudos de corte em jovens adultos saudáveis demonstram uma relação curvilínea entre a secreção de insulina e a sensibilidade à insulina, de modo que o desenvolvimento da resistência à insulina, tanto como consequência da puberdade, inatividade física ou obesidade, em jovens com função de célula beta normal, está associado a um aumento na secreção de insulina, o que permite a manutenção da tolerância à glicose normal (CARVALHO *et al.*, 2006).

Muitos fatores atuam em conjunto para promover vasoconstrição e retenção de sódio. A principal hipótese sugere que a leptina, os ácidos graxos livres e a

insulina, cujas concentrações estão aumentadas na obesidade, atuam sinergisticamente estimulando a atividade simpática e a vasoconstrição. Além disso, a resistência à insulina e a disfunção endotelial atuam como amplificadores da resposta vasoconstritora. Finalmente, o aumento da reabsorção renal de sódio pode também ocorrer, causado por aumento da atividade simpática renal, por efeito direto da insulina, hiperatividade do sistema renina-angiotensina e possivelmente por alteração de forças físicas intrarrenais (MONTANI *et al.*, 2002) ou por efeitos próprios da insulina na reabsorção de sódio e proteínas (GUYTON & HALL, 2006)

A resistência à insulina devido à diabetes e/ou hiperinsulinemia tem sido sugerida como responsável, também, pelo aumento da pressão arterial em alguns pacientes com hipertensão arterial. Esta característica é agora amplamente reconhecida como parte da síndrome X, ou síndrome metabólica marcada também por obesidade central, dislipidemia (especialmente elevação dos níveis séricos de triacilgliceróis) e hipertensão. Apesar de estar claramente demonstrada que uma fração substancial da população de hipertensos apresenta resistência à insulina e hiperinsulinemia, a existência de associação ainda não é tão clara, embora diabetes e hipertensão coexistam na resistência insulínica (CARVALHO *et al.*, 2006).

O papel exercido pela resistência à insulina, que frequentemente está associada ao hiperinsulinismo compensatório, não é ainda completamente compreendido. Uma possibilidade é que, na tentativa de sobrepujar a inibição da via de sinalização insulínica, a hiperinsulinemia possa continuar a estimular a via de sinalização mitogênica da insulina, exercendo seus efeitos indesejados (WANG *et al.*, 2004). Deve-se ressaltar que a insulina apresenta ação vasodilatadora, a qual se deve à produção endotelial de NO. Assim, a resistência à insulina pode contribuir para a disfunção endotelial. Vários estudos também demonstraram que a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (NO) está diminuída em pacientes com *diabetes melitus* tipo 2 (DM2). A resposta da artéria braquial está alterada, seja em doadores endógenos ou exógenos de NO, sugerindo que há aumento da inativação do NO, possivelmente devido a aumento do seu metabolismo ou a resposta alterada do músculo liso devido a alterações da sinalização na via da guanilato ciclase (DANDONA *et al.*, 2004).

Estudos experimentais contribuíram de forma marcante para implicar a hipertensão intraglomerular e a hiperfiltração no processo de lesão renal no diabetes. Este aumento da taxa de filtração glomerular tem sido interpretado como resultado de um fluxo plasmático renal aumentado em decorrência de uma redução

na resistência da arteríola aferente que não se acompanha de uma redução proporcional na resistência da arteríola eferente, com conseqüente elevação no gradiente de pressão hidrostática transcápsular glomerular. Vários fatores têm sido implicados como causa desta dilatação preferencial da arteríola aferente incluindo a hiperglicemia, o fator natriurético atrial, a presença de neuropatia autonômica, o acúmulo de prostaglandinas, o aumento da concentração do peptídeo IGFI (*insulin-like growth factor I*) e a síntese aumentada de óxido nítrico (ZANELLA e col., 1992; FELICIO *et al*, 2006; CARLSTRÖM *et al*, 2015).

Associado ao distúrbio da filtração glomerular de origem multifatorial, a incapacidade de autorregulação dos capilares renais torna a vasculatura renal mais vulnerável às flutuações da pressão arterial sistêmica. Uma vez instalada a hipertensão arterial que caracteristicamente acompanha a nefropatia diabética, a transmissão de níveis tensionais elevados aos glomérulos perpetua o processo lesivo, conduzindo à glomerulosclerose, forma nodular ou difusa. Esta lesão estrutural é em geral precedida na sua evolução pela hipertrofia glomerular, expansão mesangial e espessamento da membrana basal glomerular (ZANELLA e col., 1992).

O diabetes, por sua vez, altera a função de vários tipos celulares incluindo o endotélio, células musculares lisas e plaquetas (BECKMAN *et al.*, 2002). A hiperglicemia, o excesso de ácidos graxos livres e a resistência à insulina, três características maiores da perturbação metabólica, provocam disfunção endotelial. A diminuição da síntese do óxido nítrico, que se acompanha do aumento das concentrações de endotelina-1 e angiotensina II, conduzem a um aumento da vasoconstrição e da inflamação e promove a trombose (VERMA & ANDERSON, 2001). Neste sentido, COSTA e FORTI & FONTELES (1998) demonstraram que os efeitos vasodilatadores no endotélio vascular diminuíram em rins de coelhos diabéticos por aloxana.

O diabetes contribui para a instabilidade da placa aterosclerótica a qual confere estabilidade mecânica à cápsula fibrosa da referida placa (UEMURA *et al.*, 2001). Inúmeras foram as tentativas de se explicar o escape vascular, porém seu mecanismo preciso ainda permanece elusivo. Alguns autores sugerem o envolvimento da liberação de mediadores vasodilatadores ainda não identificados secundários à estimulação nervosa simpática, ou à administração de substâncias vasoconstritoras (RICHARDSON e JOHNSON, 1969; FONTELES *et al.*, 1974;

FERREIRA e FONTELES, 1988). Estudos em leito renal de ratos hipertensos e normotensos também demonstraram a ocorrência de EV, embora no grupo dos animais hipertensos esse fenômeno tenha ocorrido com menor intensidade (FONTELES e JESKE, 1976). Ademais, demonstrou-se a ocorrência de escape vascular com agentes não-adrenérgicos, como a angiotensina II (FIGUEIREDO, 1995).

Trabalhos com rins isolados de coelhos demonstraram que um inibidor de cicloxigenases (COX), indometacina, promovia uma redução na intensidade de escape vascular. Como as prostaglandinas dependem da ação destas enzimas para serem formadas, este resultado sugere a participação destes eicosanoides na regulação da PA durante o EV (FONTELES *et al.*, 1974). Experimentos posteriores confirmaram essa hipótese (FONTELES e MOREIRA LIMA, 1984; FONTELES e FORTI, 1993). Além disso, PINTO (1999) em um estudo acerca do papel da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e das cicloxigenases 1 e 2 no escape vascular sistêmico em ratos normotensos concluiu que a inibição da COX-1 e da COX-2 não alterou o escape vascular, porém o bloqueio crônico da NOS promoveu aumento deste fenômeno fisiológico, provavelmente pela estimulação de liberação de outros mediadores vasodilatadores, como as prostaglandinas.

1.6. Escape Vascular

O fenômeno do escape vascular (EV) tem sido abordado em várias publicações desde sua primeira descrição há cerca de 43 anos em experimentos em rins isolados de ratos até o presente (FONTELES *et al.*, 1974). Inúmeros trabalhos demonstraram a ocorrência deste fenômeno adaptativo em sítios vasculares os mais distintos, em diferentes espécies animais. Os resultados apresentados nessas investigações se correlacionam com a ocorrência do escape induzido por noradrenalina à liberação de mediadores vasoativos secundários, localmente produzidos pelo endotélio, ou mesmo tecidos neurais, tais como prostaglandinas, fator de ativação de plaquetas (PAF) e, de óxido nítrico endógeno (ERDF) (FONTELES E FERREIRA, 1994).

De acordo com FONTELES E FERREIRA (1994) o escape vascular é definido como a incapacidade do músculo liso arterial em manter-se contraído quando sobre ele incide um estímulo vasoconstritor constante, como o que ocorre durante a infusão de agonistas adrenérgicos (noradrenalina, fenilefrina, etc.), ou quando da estimulação elétrica do tronco simpático. O escape parece ter um significado

especial como mecanismo protetor frente às variações súbitas e frequentes da tonicidade vascular e por isso tem merecido especial atenção desde suas primeiras descrições, tendo sido pouco reavaliado nesta última década.

O controle local, principalmente através dos fatores múltiplos do endotélio vascular, representa um importante mecanismo de controle do fluxo e da pressão sanguínea (COWLEY, 1992). Certos metabólitos liberados pelos tecidos em determinadas condições fisiológicas podem agir também como mediadores da vasodilatação. Entre estas condições, podemos citar a hipóxia e a tensão de cisalhamento, pois ambos são potentes indutores da liberação de óxido nítrico (NO), sendo considerados os sinais fisiológicos mais importantes de vasodilatação endotélio dependente (ALMEIDA *et al.*, 1993).

Estudos com leito renal de ratos hiper e normotensos também demonstraram a ocorrência de EV, embora no grupo dos animais hipertensos esse fenômeno tenha ocorrido com menor intensidade (FONTELES e cols., 1974). Em outro trabalho, Fonteles e cols (1976) concluíram que o armazenamento a frio prejudica parcialmente o receptor alfa adrenérgico, sem identificar e encontrar receptores beta nestas condições. Uma análise por microscopia eletrônica dos rins estudados mostrou algum grau de autólise das células tubulares e boa preservação das células e membranas de músculo liso vascular. Estes resultados são muito importantes para a preservação renal antes do transplante.

Remark *et. al* (1989) propuseram uma explicação para o EV na circulação intestinal onde vasodilatadores seriam secretados por neurônios. O escape induzido pela estimulação simpática na circulação intestinal de rato foi significativamente inibido pelo tratamento prévio com capsaicina na vida neonatal, pela sua aplicação aguda em nervos periarteriais e por sua injeção aguda no lúmen jejunal. De acordo com OHYANAJR *et al*, 1991, corroborando com essa teoria, a vasoconstrição levaria a um estado de hipóxia, com a formação de metabólitos locais e de outros fatores alterados pela má perfusão tecidual. Em resposta, a ativação de mecanorreceptores e quimiorreceptores, através de reflexos axônicos, poderia estimular fibras sensitivas a liberarem substâncias vasodilatadoras.

Considerado como um mecanismo protetor do vaso e de ocorrência universal no leito arterial, o escape parece ser o resultado da resposta instantânea à liberação de uma ou mais substâncias com ação parácrina sobre o músculo liso vascular. A presença do fenômeno em órgãos isolados e perfundidos com soluções eletrolíticas

de composição semelhante a do plasma, exclui desse processo os elementos sanguíneos sem, no entanto, confirmar inequivocamente a participação isolada de qualquer uma das substâncias estudadas (FONTELES E FERREIRA, 1994).

Conforme os referidos autores acima, as reações de escape no rim isolado e perfundido geralmente começam a ocorrer entre os 5-7 minutos iniciais da infusão de noradrenalina, requerendo, portanto, infusões prolongadas de agentes vasoconstritores, sugerindo que a vasoconstrição necessita de um determinado período de tempo para iniciar a reatividade vascular reversa. É provável que durante esse período, fibras musculares lisas contraídas possam receber sinalização oposta para sinalizar para a produção subjacente de substâncias vasoativas, capazes de tornar o vaso momentaneamente refratário ao efeito vasoconstrictor, ou promover a liberação de fatores vasodilatadores, e com isso, preservar a integridade hemodinâmica de determinado território vascular, protegendo-o dos agravos pela diminuição repentina do fluxo (FONTELES & DE LIMA E FORTI, 1993).

Visto à luz do controle pressórico, *in vivo*, fica claro que a ocorrência das reações de escape exige a presença de populações celulares íntegras, quer sejam elas parietais (músculo liso), de revestimento (endotélio) ou simplesmente participantes do meio onde o leito vascular está localizado (interstício) (FONTELES & FERREIRA, 1994).

Outras linhas de pesquisa sugerem que o EV seja resultado da competição entre mecanismos locais e neuronais. A hipótese de que o receptor α_2 pudesse ser o sítio específico no qual seu bloqueio do receptor aumentasse a capacidade da circulação intestinal de cães de escaparem da estimulação simpática percentual de escape foi significativamente aumentado pela ioimbina (FABER, 1988; CHEN e cols., 1991). Outro composto avaliado em rins isolados de coelho foi o fator de agregação plaquetária (PAF), tendo sido demonstrado o relevante papel do PAF endógeno nos processo vasoativos e hemodinâmicos, incluindo o escape vascular. Todavia, o PAF exogenamente administrado mostrou-se completamente ineficaz (FERREIRA & FONTLES, 1989).

Outro fator local apontado na participação da vasodilatação observada no EV é o pH tecidual – expresso pela concentração plasmática de íons H^+ . Segundo uma teoria, a vasodilatação inicial induzida pelo agente vasopressor ou estimulação ganglionar levaria a um acúmulo de metabólitos ácidos e, conseqüentemente, a uma acidose local que, por sua vez, promoveria uma inibição dos receptores α_2 pós-sinápticos e, conseqüentemente, uma redução na eficácia da noradrenalina em

deflagrar a contração do músculo liso vascular. Por essa razão, os níveis de pressão iniciais não poderiam ser mantidos, resultando no escape vascular (CHEN e SHEPHERD, 1991).

Outro estudo demonstrou que o seccionamento bilateral do nervo vago intensificava o fenômeno de EV, ao passo que o pré-tratamento com reserpina (bloqueador de receptação de catecolaminas) ou indometacina retardavam o início do fenômeno. Por outro lado, os animais que receberam guanetidina e L-nitro-arginina, antes do experimento, apresentaram uma menor velocidade para atingir a pressão arterial mínima após a máxima ter sido registrada (FIGUEIREDO, 1995).

Portanto, percebe-se que o fenômeno de escape vascular em diferentes classes e é exponencialmente complexo e multifatorial. Alguns autores sugerem o envolvimento da liberação de medidores vasodilatadores ainda não identificados, secundários à estimulação nervosa simpática ou à administração de substâncias vasoconstritoras.

1.7 Taquifilaxia

Taquifilaxia refere-se a uma redução dos efeitos de uma substância quando administrada de modo contínuo ou repetido, podendo, também, ser chamada de dessensibilização, tolerância (termo usado para drogas aplicadas clinicamente em doses cada vez maiores para produzir o efeito desejado), refratariedade (perda de eficácia terapêutica) ou resistência (perda da atividade dos antibióticos) (SILVA, 2010).

Os mecanismos envolvidos com a taquifilaxia de rápida evolução foram extensamente estudados em termos moleculares, especialmente para os receptores acoplados à proteína G e, particularmente, para os β -adrenoceptores. Em nível celular, a estimulação adrenérgica com um agonista como o isoproterenol leva à ativação da adenil ciclase e a um aumento abrupto nas concentrações intracelulares do segundo mensageiro: adenosina monofostato cíclico (AMPc). Porém, em muitas células essa capacidade de ativar a adenil ciclase diminui com o tempo, levando a uma diminuição nas concentrações de AMPc intracelulares. A fosforilação dos adrenoceptores e sua associação a outras proteínas e as alterações nas localizações subcelulares dos receptores são todos fatos que podem contribuir com a capacidade reduzida de agonistas adrenérgicos em acumular AMPc (BARNES, 1993; WHALEN, 1999 e BILLINGTON *et. al.*, 2013).

A dessensibilização dos receptores ligados à proteína G pode ocorrer especificamente pela fosforilação dos receptores ligados às substâncias por um receptor quinase ligado à proteína G (GRK). Esses GRKs constituem uma família de quinases (GRK2), originalmente conhecidas como bARK, ou quinase de afinidade a beta-receptores, sendo ocupados por agonistas onde a ocupação desses receptores leva à ligação de um GRK ao receptor e sua posterior fosforilação. Esse mecanismo foi determinado como dessensibilização “homóloga”, uma vez que especificamente envolve receptores ocupados (AIYAR e cols., 1992; RUDOMANOVA & BLAXALL, 2017).

Alkhouri e cols. (2014) mostraram que infecções bacterianas (e não apenas infecções virais) podem causar dessensibilização de receptores beta por ativação de receptores *toll-like 2*. Após a taquifilaxia, os receptores se ligam um membro de proteínas chamada arrestina, levando à inibição estérica entre receptores e proteína G. Os receptores podem ser subsequentemente sequestrados da membrana plasmática e deslocados para a célula o que, interessantemente, podem contribuir para novos mecanismos de sinalização adrenérgica (LUO e cols., 2017).

Um segundo mecanismo para esse evento envolve a retroalimentação de segundos mensageiros que podem levar à dessensibilização não apenas de receptores ativados por agonistas, mas também de diferentes classes de receptores expressos na mesma célula. Essa forma de taquifilaxia foi determinada sendo do tipo “heteróloga”, uma vez que a função de vários tipos de receptores pode ocorrer simultaneamente após a ativação de um tipo apenas de receptor (TRAVIS *et. al.*, 1997). Os β -receptores estimulam o acúmulo de AMPC o que leva à ação da proteína quinase A; a subunidade catalítica dessa enzima pode não apenas fosforilar os adrenoceptores, comprometendo sua função, mas também podem potencialmente fosforilar outros tipos de receptores na mesma célula com locais adequados para a fosforilação da quinase A. Assim, taquifilaxia a um agonista de beta-adrenoceptor representaria um mecanismo potencialmente importante para a regulação em curto prazo do tônus vascular (BRODDE *et. al.* 1990; GNEGY e cols., 1976; PAGE *et. al.*, 2004).

Kume e cols. (2003) descreveram em músculo liso de traqueia de cobaias que a dessensibilização do acoplamento estimulatório de receptores beta-adrenérgicos e canais de K^+ ativados por Ca^{+2} foi evitada antagonizando separadamente o canal Ca^{+2} voltagem-dependente com o verapamil, sugerindo uma relação surpreendente entre o influxo de Ca^{+2} por e a dessensibilização beta-

adrenérgica. Estes resultados indicam que um desacoplamento do receptor beta-adrenérgico dos canais de K^+ / Ca^{+2} aumenta a mobilização de Ca^{+2} e estimula o taquifilaxia.

Na presente pesquisa, a taquifilaxia foi estudada através de estimulação alfa-adrenérgica na vasculatura do rim perfundido conforme a análise dos resultados obtidos no decorrer deste trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

Os aspectos anátomo-fisiológicos do sistema vascular renal são de tal peculiaridade homeostática que esse *locus* fisiológico é alvo de inúmeros estudos científicos acerca das características vasoativas e reativas a substâncias que modulam algumas fisiopatologias bem conhecidas na prática clínica. No *diabetes mellitus* (apesar de não ser o objeto desse estudo) as alterações vasculares já são intensamente investigadas em várias nuances de aspectos *in vivo* e *in vitro*.

Entretanto, quando se pesquisa acerca dos efeitos renovasculares em animais normoglicêmicos produzidos por agentes hipoglicemiantes usados clinicamente no controle de alterações glicêmicas da *diabetes mellitus* tipo 2, ainda há escassas pesquisas em referência a esse assunto. Por isso, esse trabalho, que foi desenvolvido através de uma técnica de perfusão renal *in vitro*, permitiu que isso pudesse ser avaliado por conta de seus efeitos na circulação renal, bem como em outras possíveis ações no escape renovascular, na taquifilaxia α -adrenérgica e de como essas substâncias interferem ou interagem nessas preparações.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos do uso agudo *in vitro* dos fármacos metformina, glimepirida e glibenclamida na reatividade vascular adrenérgica, no escape renovascular e na taquifilaxia do rim isolado de coelho em animais normais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1. Estudar as variações pressóricas durante a perfusão renal em animais normais sob efeito da fenilefrina, medindo o escape renovascular e a taquifilaxia.

3.2.2 Estudar os efeitos da metformina, glimepirida, e da glibenclamida em coelhos normais no rim perfundido durante a interação vascular α -adrenérgica.

3.2.3 Avaliar outras ações farmacológicas desses agentes nos rins isolados, como fluxo de perfusato, fluxo urinário e resistência vascular.

3.2.4 Caracterizar os efeitos pressóricos da glibenclamida em relação à endotelina, utilizando tezosentan, um bloqueador deste efeito.

3.2.5 Pesquisar, em anéis de aorta, a contratilidade induzida pela metformina e pela glimepirida sob infusão de fenilefrina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais Experimentais

Foram utilizados para pesquisa coelhos Califórnia, de ambos os sexos, provenientes da Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, pesando, em média, entre 1,0 e 1,5 kg. Os animais foram mantidos em jejum alimentar, em gaiolas de aço, com livre ingestão de água nas 24 horas prévias aos experimentos realizados no Laboratório de Farmacologia Renal e Metabólica da Unidade de Pesquisas Clínicas da Faculdade de Medicina da UFC.

O projeto foi iniciado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) sob o número **4160237/2015** e os experimentos foram conduzidos de acordo com a legislação brasileira que regulamenta o uso de animais em experimentações científicas, conforme a Lei Arouca 11974 de 2008.

4.2. Procedimento cirúrgico e nefrectomia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uretana (1200 mg/kg) e pentobarbital (40mg/kg) administrados por injeção intramuscular num membro inferior. Por meio de uma incisão abdominal mediana, indo do processo xifoide à região púbica, obteve-se o acesso ao interior da cavidade abdominal. Uma vez expostas, as vísceras foram rebatidas para a direita, expondo o rim esquerdo, o primeiro a ser removido e pesado.

Após limpeza cuidadosa da gordura perirrenal, foram expostos e identificados os vasos renais, fixando por sutura a artéria renal próximo à aorta abdominal, umedecendo as vísceras com salina em gaze. A seguir, artéria e veia renais foram, em conjunto, bloqueadas com pinça hemostática.

Antes da remoção do órgão, verificou-se, cuidadosamente, se as suturas estavam adequadas e que não havia algum ponto de hemorragia que pudesse comprometer a perfusão tecidual das regiões ainda não utilizadas. Para remover o rim, seccionou-se a veia renal junto à pelve renal e o ureter, em seu terço- médio. O rim foi então colocado em uma placa de Petri, contendo solução de Krebs-Henseleit (KH) (KREBS e HENSELEIT, 1932) e procedeu-se a canulação arterial com tubo de polietileno PE 50. Antes de conectar o rim ao sistema de perfusão, realizou-se uma

lavagem rápida com solução salina a 37°C e a cavidade abdominal ficou protegida com gaze embebida da solução e fechada sem sutura a fim de evitar maiores contaminações e desidratação às vísceras.

Iniciou-se, de imediato, a infusão com solução de KH, previamente oxigenado com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), ao mesmo tempo em que o ureter foi também canulado com tubo de polietileno estirado. Na sequência, o órgão foi levado ao sistema onde recebeu solução de KH com pH ajustado entre 7.35 e 7.40, permanecendo aerado com mistura de carbogênio, com temperatura média de 37°C, em média, 5 minutos desde a canulação da artéria renal. Após cada experimento, o rim foi pesado e expresso em gramas (g) a fim de ser usado nos cálculos dos parâmetros de fluxo de perfusato, fluxo urinário e resistência vascular.

4.3. Sistema de perfusão

O sistema de perfusão adotado foi o mesmo descrito por FONTELES *et al.* (1973) e sua principal característica é a de ser um sistema aberto, utilizando o perfusato sem recirculação. O sistema é composto, esquematicamente, por:

- a. Bomba peristáltica marca Watson-Marlow, previamente calibrada para perfusão, fluindo entre 4,0 a 12,0 mL/minuto;
- b. Sistema de borbulhamento em oxigenador específico de fabricação artesanal, acoplada à bomba de perfusão e por onde circula o perfusato oxigenado, com pH final entre 7,2 - 7,4;
- c. Sistema de aquecimento composto por termostato com temperatura mantida em $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- d. Bomba de Infusão Imbracrios®, calibrada para infusão de 0,2 a 0,8mL/minuto;
- e. Manômetro para registro das variações na pressão de perfusão, em mmHg.
- f. Sistema para captação de bolhas.



Figura 4. Desenho esquemático do sistema aberto de perfusão de rim de coelho



Figura 5. Foto do Sistema de Perfusão Aberta em rim isolado de coelho.

4.4. Parâmetros Fisiológicos

Foram estudadas as seguintes medidas da dinâmica de perfusão renal:

4.4.1 Peso do rim: o peso dos rins utilizados nos protocolos experimentais foi determinado após o encerramento de cada perfusão, sendo utilizado para a determinação do fluxo de perfusato, fluxo urinário e cálculo da resistência vascular, sendo expresso em gramas (g).

4.4.2 Pressão de Perfusão (PP): refere-se à pressão existente em todo o leito vascular renal, e registrada continuamente e anotadas a intervalos de 5 minutos ao longo de todo o experimento e foi medida por manômetro aneroide e expressa em mmHg. O registro foi feito através de um polígrafo da Narco Biosystem™ e captado através de um transdutor que monitorava essa medida, registrando em papel milimetrado.

4.4.3. Escape vascular (EV): Considerou-se haver presença de escape renovascular quando, à pressão máxima obtida com a infusão contínua de fenilefrina (PHE), a partir do 20º minuto, registrar decréscimo da pressão de perfusão, independentemente de situarem-se os valores mínimos ao final do período de infusão do α -agonista.

O escape foi calculado segundo HENRICH e LUTZ (1971), FARA e ROSS (1972), adaptado por FONTELES, *et al.*, (1974), sendo expresso de acordo com o que com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ EV} = \frac{(P_{\text{MAX}} - P_{\text{MIN}}) \times 100}{P_{\text{MAX}} - P_i}$$

Onde:

P_{máx.}- pressão de perfusão máxima obtida após a infusão da substância vasoconstritora, antes do escape;

P_{min.} - pressão de perfusão mínima observada durante a infusão de PHE, após o escape;

P_i é a pressão de perfusão registrada imediatamente antes da infusão do α -agonista.

Através do estudo dos padrões de efeitos com vasoconstritores, foi avaliada a taquifilaxia noradrenérgica.

4.4.4 Fluxo de Perfusato e Fluxo Urinário: as medidas foram tomadas durante todos os procedimentos experimentais dos grupos estudados, sendo, tanto o perfusato quanto a urina, colhidos em béqueres volumétricos e depois mensurados, a cada 10 minutos, em mL. Posteriormente, de cada volume coletado, calculou-se a relação entre volume, peso do rim do animal experimentado e a unidade de tempo, obtendo, então, os dados expressos em mL/g/minuto.

4.4.5 Resistência Vascular: considerou-se o cálculo da resistência vascular a relação entre a pressão de perfusão e o fluxo de perfusato, colhido e calculado de cada grupo experimental. Obteve-se, então, a medida expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹.

4.4.6 Taquifilaxia: segundo a observação gráfica, as curvas de infusão de PHE caracterizam-se por uma tendência à queda dos valores pressóricos máximos, ao longo de todo o experimento. Assim, a observação de três curvas de infusão de PHE, intercaladas por períodos de lavagem de 10 minutos da preparação, mostra uma tendência ao decaimento dos níveis pressóricos nas diferentes curvas. Não há expressões matemáticas para a medida da taquifilaxia, sendo, portanto, adimensional. Medimo-la pela comparação entre os pontos máximos das diferentes curvas nos grupos estudados, calculando as diferenças entre as pressões que compõem as curvas de infusão nos grupos com infusão de fenilefrina. Calculou-se um ΔP que corresponde à diferença entre a pressão de base da curva e as pressões seguintes antes da lavagem do sistema. Percebeu-se o fenômeno da taquifilaxia quando as curvas posteriores não tiveram responsividade igual às iniciais.

4.5. Protocolo de perfusão

Logo após a colocação no sistema, o rim foi perfundido com solução KH (mM/L: NaCl 120, KCl 3, MgSO₄.7, H₂O 0.62, NaH₂PO₄.H₂O 14, NaHCO₃ 25, CaCl₂.2H₂O 2, glicose 8), tendo os tempos experimentais sido divididos em:

A. Período de Controle (20 minutos): necessário à lavagem do leito vascular renal, retirada de sangue remanescente e estabilização da pressão de perfusão;

B. Períodos de Infusão de PHE (20 minutos): compostos de três etapas de infusão de PHE 10^{-6} M a uma vazão de 1mL/min, iniciada a primeira imediatamente após o período de controle realizado.

C. Períodos de Lavagem (10 minutos cada): lavagem com líquido de perfusato, intercalada aos períodos de infusão de PHE, repetidos em três ciclos de 20 minutos. Todas as substâncias antidiabéticas orais estudadas foram preparadas, diluídas e adicionadas à solução de KH para posterior infusão no sistema.

4.6. Grupos de estudo

Os grupos de estudo foram divididos de acordo com o protocolo de infusão com ou sem a substância vasoconstritora nos grupos experimentais e seus subgrupos com as drogas antidiabéticas. Considerou-se o *n* o número de rins perfundidos em cada experimento.

A. Grupo controle ($n = 3$) com infusão apenas de solução de Krebs-Henseleit para a validação com a literatura.

B. Animais perfundidos com fenilefrina (PHE) em grupos com duas curvas ($n=8$) ou três curvas de infusão ($n=14$),

C. Estudo dos efeitos do antidiabético metformina (MET) em infusões sem fenilefrina ($n=6$) e com fenilefrina ($n=14$) em dois grupos experimentais distintos.

D. Estudo dos efeitos do antidiabético glimepirida (GLIM) em infusões sem fenilefrina ($n=5$) e com fenilefrina ($n=9$) em dois grupos experimentais distintos.

E. Estudo dos efeitos do antidiabético glibenclamida (GLIB) em três grupos experimentais: i) infusões sem fenilefrina ($n=11$), ii) infusões com fenilefrina ($n=11$), e iii) um grupo experimental com infusão prévia de tezosentan (TEZO) e posterior de glibenclamida ($n=3$).

F. Estudo dos efeitos do anti-inflamatório não-esteróide indometacina (INDO) em duas curvas de infusões com fenilefrina ($n=2$) como teste avaliativo.

4.7. Anéis de aorta de coelhos

Foi realizado, neste procedimento experimental, o mesmo protocolo anestésico utilizado na nefrectomia com a utilização de uretana (1200 mg/kg) e pentobarbital (40mg/kg) administrados por injeção intramuscular num membro

inferior. Posteriormente, foi feita uma incisão ventral nos animais e abertura da caixa torácica por excisão do esterno e de parte das costelas. O bloco coração-pulmão foi retirado, possibilitando a visualização do arco aórtico que foi então retirada e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritora de Krebs-Henseleit, para se proceder à cuidadosa remoção do tecido adiposo e tecido conectivo aderido. As aortas foram divididas em segmentos cilíndricos de 3-4 mm, denominados anéis de aorta. Os anéis de aorta foram colocados horizontalmente entre dois triângulos (preparados com fios de aço inoxidável) e montados em câmara para órgão isolados, com 5 mL de capacidade, contendo solução de Krebs-Henseleit, ajustada para pH 7.4, oxigenada por borbulhamento de mistura carbogênica (95% O₂ - 5% CO₂) e mantida a 37°C. Um dos fios ficava conectado a uma base fixa e outro conectado verticalmente a um transdutor de força apropriado para registro isométrico das contrações, conectado a um polígrafo analógico (*AUTOMATIC ORGANIC BATH*, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha).

Os sinais elétricos gerados pelo transdutor de força foram decodificados e digitalizados por um sistema de aquisição de dados (Panlab, Barcelona, Espanha) acoplado a um computador e os dados foram registrados através do *software* (Protwin 1.0) para posterior análise.

Após a montagem, as preparações foram submetidas a um período de estabilização (cerca de 30 minutos) e os anéis de aorta torácica de coelho receberam tensão passiva de 1g, reajustados a cada 15 minutos com três trocas de solução de KH. Ao término deste período de estabilização, foi considerado que a preparação atingiu seu tônus basal e todos os protocolos experimentais foram iniciados. Ao banho foi adicionada na solução de KH fenilefrina a 10µg/mL, metformina a 10µg/mL e glimepirida a 2,0µg/mL.

4.8 Produtos químicos

A. Reagentes utilizados no preparo da solução de Krebs-Henseleit: NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄, NaH₂PO₄, CaCl₂, Glicose (Merck).

B. Reagentes utilizados no preparo da solução vasoconstrictora: fenilefrina à dose de 10µg/mL (SIGMA).

C. Anestésicos: uretana e pentobarbital sódico (Merck).

D. Cloridrato de metformina 500mg. Cada comprimido da droga foi dissolvido em

solução de Krebs-Henseleit na razão de 500mg/1000mL onde se chegou à concentração de 0,5mg/mL.

E. Glimpirida 2mg. Preparou-se a partir de um comprimido de glimepirida, pulverizado em um *becker* e ressuspenso em 1,0L de solução de KH, perfazendo, pois, uma concentração de 2µg/mL.

F. Glibenclamida. Cada comprimido da droga (5mg) foi dissolvido em um litro de solução salina na razão de 5mg/1000mL onde se chegou à concentração final de 5µg/mL.

4.9. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA), testes de Dunett e Bonferroni (Análise de comparações intergrupos), testes *t* pareados e/ou não pareados de Student, pelo programa computacional *GraphPad Prism* versão 7.0 para *Windows*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Grupo controle sem infusão de fenilefrina

Os resultados mostraram que a perfusão renal, apenas com solução de Krebs-Henseleit (n=3), não alterou significativamente as pressões ao longo da duração dos experimentos, não obtendo, portanto, alterações estatísticas significantes (Figura 6). As mensurações de fluxo de perfusato não tiveram alterações estatísticas significantes, assim como nas de fluxo urinário. No tocante à resistência vascular, não foram encontradas diferenças entre as médias. Esse grupo estudado, portanto, não mostrou diferenças entre as médias (Quadro 1).

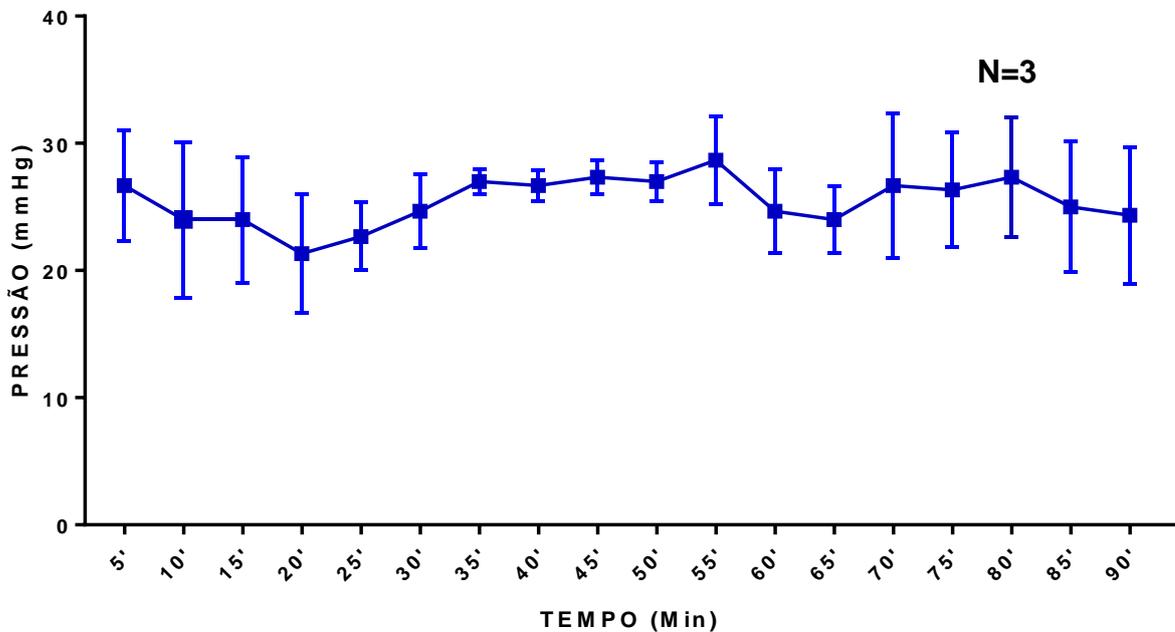


Figura 6. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.

Quadro 1. Dinâmica de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	3,22±0,04	0,16±0,04	5,97±1,12
10'	3,79±1,16	0,20±0,04	6,05±2,02
20'	4,77±0,78	0,27±0,07	6,45±1,29
30'	4,89±1,26	0,30±0,11	6,01±0,95
40'	4,81±1,31	0,34±0,16	6,88±2,47
50'	5,03±1,61	0,35±0,13	7,29±3,22
60'	4,49±1,40	0,36±0,16	8,73±4,18
70'	4,24±1,32	0,31±0,12	7,40±2,08
80'	4,16±1,09	0,30±0,11	7,38±2,03
90'	4,71±1,03	0,30±0,13	5,19±0,57

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹. min⁻¹.

Não houve diferenças estatísticas dentre os parâmetros mensurados

5.2 Grupos controle com infusão de fenilefrina

Os aspectos gerais das pressões verificadas nesses grupos estudados podem ser observados através das várias alterações nas linhas das curvas gráficas plotadas nas figuras 7A e 8A. Primeiramente, há um período de estabilização das pressões logo após a nefrectomia e acomodação do rim no sistema de perfusão. Em seguida à injeção de fenilefrina, vê-se uma súbita e acentuada elevação na pressão de perfusão, seguido de um trecho em que o incremento pressórico diminui rapidamente, tendendo a um período estável e, finalmente, uma redução da pressão, mesmo mantida a infusão do agente vasoconstritor.

Houve, então, dois grupos de experimentos onde se fez infusão de fenilefrina (10µg/mL) nos rins isolados em dois ou três ciclos de infusões a fim de se estudar o comportamento pressórico renal. Salienta-se que essa dose também fora utilizada nos experimentos dos grupos seguintes onde as infusões foram feitas com antidiabéticos orais e fenilefrina. Nos experimentos de duas curvas de infusão (n=8), a segunda infusão de fenilefrina resultou num incremento pressórico menos intenso quando comparado com o primeiro, sendo observado o fenômeno da taquifilaxia onde nas duas curvas houve significativa alteração nas médias: 5'= 73,875±5,62 mmHg; tempo 20'= 154,5±15,42 mmHg; tempo 50'= 84,25±17,78 mmHg e tempo 90'= 63,75±8,7mmHg (Figura 7A).

Nas avaliações estatísticas de fluxo de perfusato e de fluxo urinário não houve divergências entre as médias calculadas. Entretanto, no parâmetro de resistência vascular, notou-se significância estatística entre os tempos iniciais de 0 ($7,78 \pm 0,47$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) e 10' ($8,13 \pm 0,96$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) quando comparados com os de 20' ($21,52 \pm 4,72$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹), 30' ($18,41 \pm 4,55$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) e 40' ($10,75 \pm 2,69$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) (Quadro 2).

Entretanto, no grupo onde se infundiu três vezes o agente agonista adrenérgico (n=14), as curvas foram decrescentemente diferentes, onde após a primeira infusão, uma significativa diferença foi observada desde o minuto 5 ($80,15 \pm 1,88$ mmHg) até o minuto 20 ($152,77 \pm 21,54$ mmHg). Na segunda infusão de fenilefrina, as pressões também variaram significativamente: tempo 50'= $136,0 \pm 24,95$ mmHg e tempo 70'= $87,40 \pm 10,39$ mmHg; na terceira infusão, os valores foram de $123,96 \pm 15,87$ mmHg (tempo de 80') e $94,54 \pm 9,07$ mmHg (tempo de 90'). Até a última infusão as médias de pressão foram também significantes, porém em valores absolutos menores, evidenciando o notório e proporcional efeito taquifilático (Figura 8A). No Quadro 3 são apresentados os valores de perfusato: tempo 0'= $6,7 \pm 0,75$ ml/g/min; tempo 20'= $7,09 \pm 0,89$ ml/g/min; tempo 50'= $6,68 \pm 1,0$ ml/g/min e tempo 90'= $6,48 \pm 0,74$ ml/g/min; fluxo urinário: tempo 0'= $0,44 \pm 0,08$ ml/g/min; tempo 20'= $0,48 \pm 0,07$ ml/g/min; tempo 50'= $0,53 \pm 0,07$ ml/g/min e tempo 90'= $0,50 \pm 0,07$ ml/g/min. Porém, no parâmetro de resistência observou-se acentuada significância nos tempos aferidos: tempo 0'= $8,98 \pm 0,39$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹; tempo 10'= $26,22 \pm 3,3$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹; tempo 50'= $25,92 \pm 3,82$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹ e tempo 90'= $17,24 \pm 2,21$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹.

Na figura 7B, como um anexo do gráfico, foi demonstrada a variação de pressão durante as duas infusões de fenilefrina, referidas como curva A e curva B. Em cada curva calculou-se as variações de pressão a partir da pressão de base de cada intervalo aferido, sendo, pois $\Delta\pi$ a variação entre os pontos de cada curva. Portanto, houve taquifilaxia nesse grupo, uma vez que a resposta pressórica foi menor na segunda curva. Na figura 8B, o gráfico demonstrou a variação de pressão durante as três infusões de fenilefrina, referidas como curva A, curva B e curva C. Em cada curva calculou-se as variações de pressão a partir da pressão de base de cada intervalo aferido, sendo, pois $\Delta\pi$ a variação entre os pontos de cada curva. Portanto, houve taquifilaxia evidente nesse grupo, uma vez que a resposta pressórica foi decrescente nas curvas avaliadas.

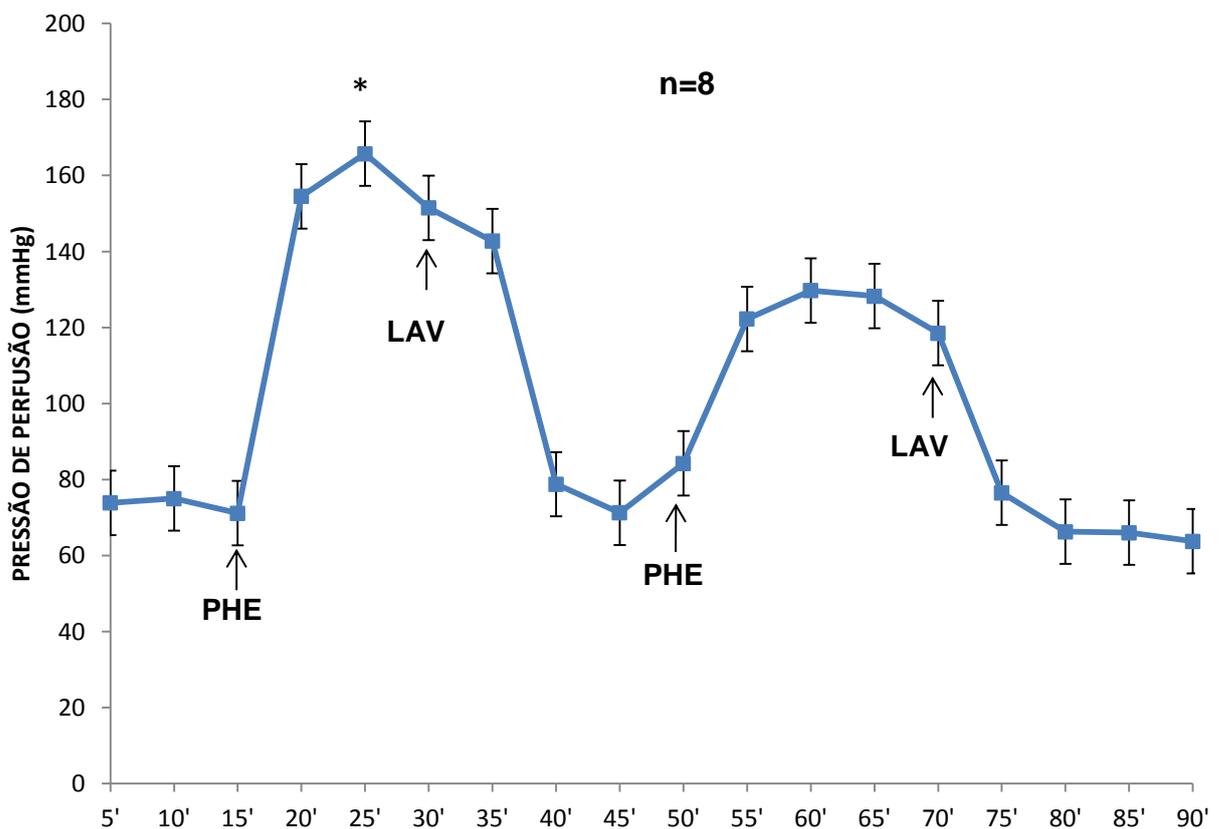


Figura 7A Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit em duas curvas pressóricas em que se observa escape.

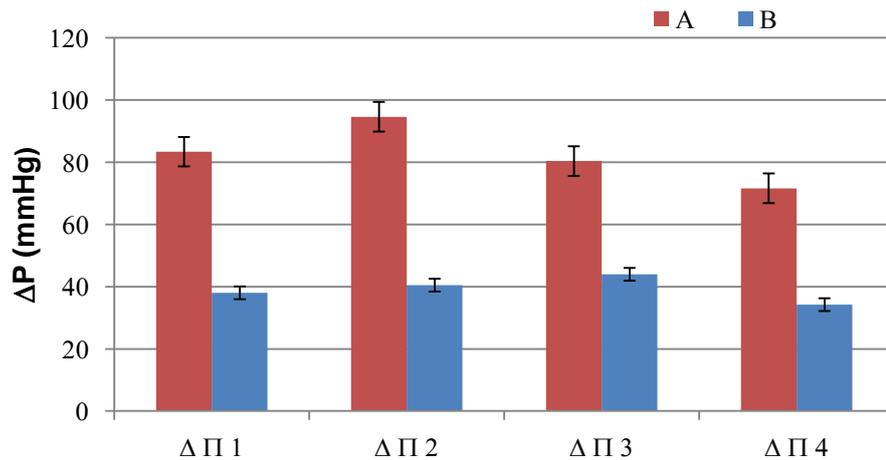


Figura 7B. Comparação das taquifilaxias de ambas as curvas com infusão de fenilefrina, evidenciando a taquifilaxia.

Quadro 2. Efeito da fenilefrina (10µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit, em duas curvas de escape vascular.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	8,74±1,10	0,26±0,10	7,78±0,47
10'	9,15±1,05	0,28±0,05	8,13±0,96
20'	8,49±1,05	0,37±0,07	21,52±4,72 *
30'	9,73±1,16	0,40±0,06	18,41±4,55*
40'	8,29±1,11	0,40±0,07	10,75±2,69*
50'	9,21±1,11	0,50±0,12	11,62±4,37*
60'	8,34±1,03	0,49±0,11	17,66±3,82*
70'	8,82±0,06	0,32±0,064	14,66±1,98*
80'	8,99±0,86	0,34±0,11	8,08±1,64
90'	8,49±0,86	0,38±0,12	7,90±1,63

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹.

***p<0,05 na resistência vascular, os valores nos tempos de 20' até 70' apresentaram diferença estatística quando comparados com os tempos de 0' e 10' e dentre 80' e 90' (teste t pareado)**

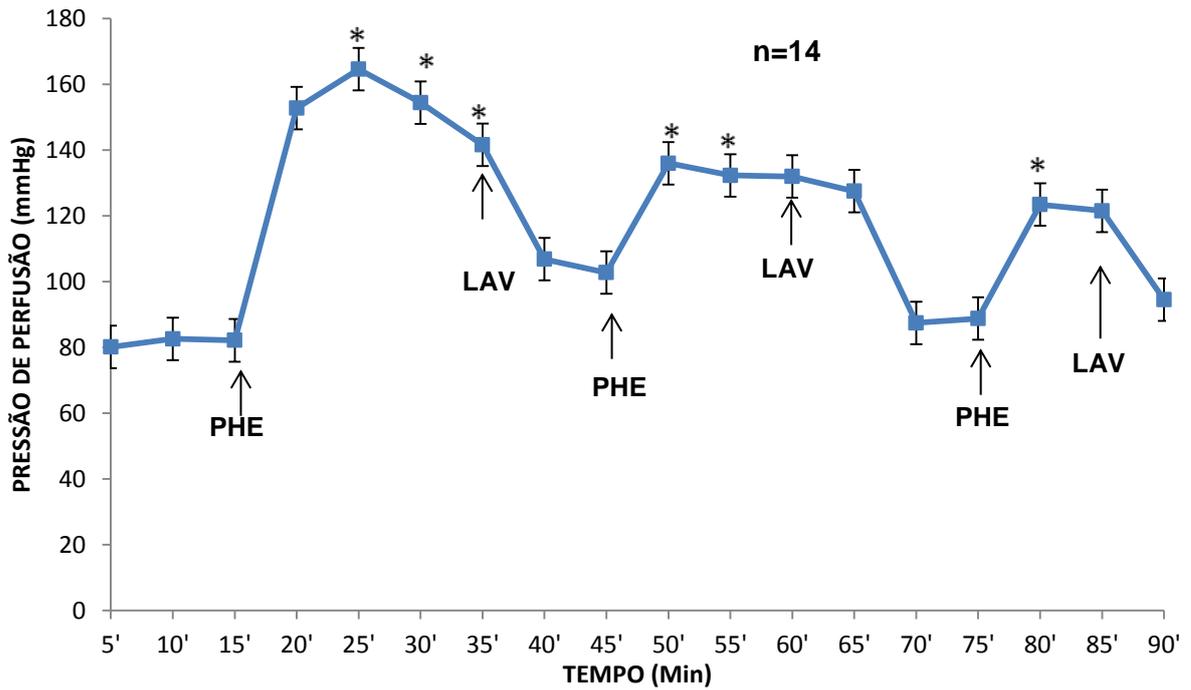


Figura 8A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit em três curvas que se demonstram escape vascular.

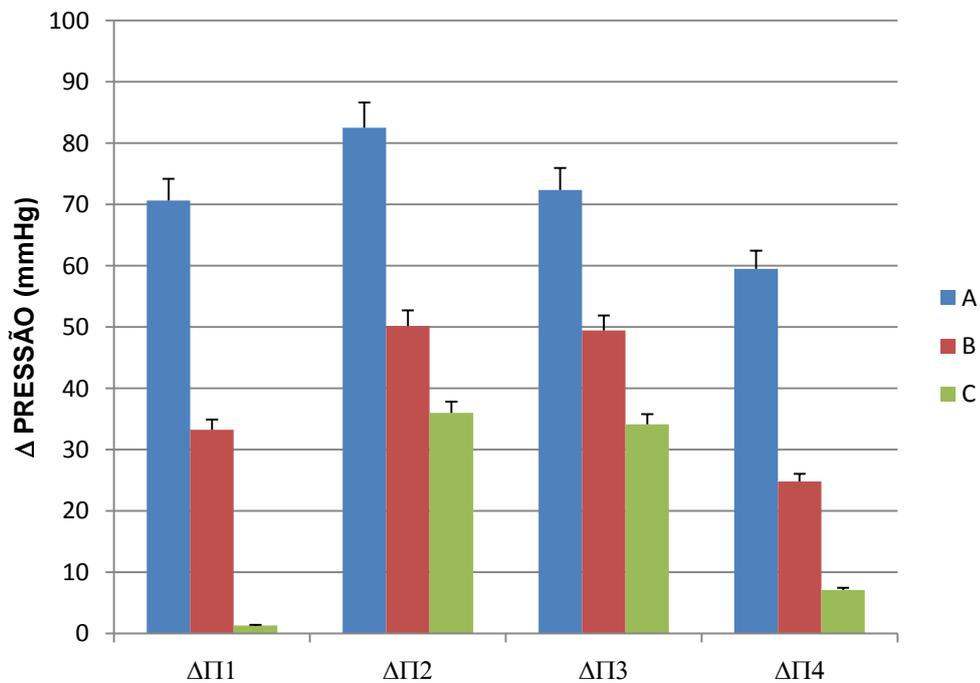


Figura 8B. Comparação das taquifilaxias das três curvas, evidenciando-se através do desenho gráfico acima.

Quadro 3. Efeito da fenilefrina na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit, em três curvas que apresentam escape.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	6,7±0,75	0,44±0,08	8,98±0,39
10'	6,52±0,86	0,41±0,06	9,68±0,55
20'	7,09±0,89	0,48±0,07	26,22±3,3 ***
30'	6,64±0,97	0,50±0,07	29,56±3,7 ***
40'	7,00±0,94	0,54±0,09	17,93±2,07***
50'	6,68±1,00	0,53±0,07	25,92±3,82***
60'	7,16±1,17	0,59±0,09	22,79±3,23***
70'	6,78±0,94	0,59±0,94	16,43±2,15***
80'	6,88±0,91	0,575±0,11	21,41±2,91***
90'	6,48±0,74	0,50±0,07	17,24±2,21***

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹. min⁻¹

*****p<0,0008. Os valores entre os tempos de 40' a 90' não diferiram estatisticamente**

4.3 Grupos de rins perfundidos com cloridrato de metformina (0.5mg/mL)

Com o intuito de se estudar os efeitos do antidiabético metformina foram realizadas infusões sem fenilefrina, e outro grupo com o agonista α -adrenérgico, na dose de 10 μ g/mL e em dois grupos experimentais distintos. No primeiro grupo (n=6), sem infusão de agonista adrenérgico, porém, notou-se que, em comparação às pressões aferidas no grupo de infusão apenas com solução de KH, houve aumento significativo nas pressões de perfusão. Nas aferições deste grupo experimental não houve alterações significativas nas médias pressóricas ao longo dos períodos de tempo mensurados, (Figura 9). Ademais, também não se observaram significantes alterações no tocante ao fluxo de perfusato e nas medidas de fluxo urinário. No tocante à resistência vascular também não se observou diferenças estatísticas significantes (Quadro 4).

No segundo grupo (n=14), seguindo o protocolo de infusões dos rins com fenilefrina, fez-se também a infusão de cloridrato de metformina onde se observou

aumento de pressão significativa à primeira administração do agonista adrenérgico. A partir daí, nas seguintes infusões de fenilefrina, os aumentos de pressão foram menores, mas significantes quando comparados aos primeiros, denotando taquifilaxia ao final das aferições temporais: tempo 5' = $73,28 \pm 4,18$ mmHg; tempo 20' = $153,14 \pm 7,15$ mmHg; tempo 50' = $127,5 \pm 12,05$ mmHg; tempo 90' = $97,07 \pm 12,89$ mmHg (Figura 10A).

Nesse grupo, a resistência vascular teve crescimento significativo após a infusão do agente vasoconstritor, decrescendo um pouco ao final dos experimentos: tempo 0' = $8,38 \pm 0,39$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹; tempo 20' = $24,15 \pm 2,73$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹; tempo 50' = $23,13 \pm 3,71$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹; . Nos tempos de 40' e a partir de 70', os valores alteraram-se menos significativamente. Por outro lado, as taxas de fluxo de perfusato e fluxo urinário não apresentaram diferenças entre as médias calculadas (Quadro 5).

Na figura 10B, o gráfico foi demonstrou a variação de pressão durante as três infusões de fenilefrina, referidas como curva A, curva B e curva C. Em cada curva calculou-se as variações de pressão a partir da pressão de base de cada intervalo aferido, sendo, pois $\Delta\pi$ a variação entre os pontos de cada curva. Portanto, houve taquifilaxia nesse grupo, evidenciada na curva C a qual teve pouca reatividade pressórica.

Em aorta de coelho foi realizado outro protocolo com intuito de avaliar se as respostas vasoconstritoras induzidas pela metformina teriam alguma potencialidade nesse modelo experimental (Figura 11). Observou-se que houve aumento no perfil pressórico da metformina quando se avaliou o perfil miotônico na aorta de coelho, caracterizando, portanto, uma proatividade reativa vascular constritora desse agente antidiabético (Figura 12). Além disso, foi constatado que houve diferença estatística entre os grupos de aorta que receberam fenilefrina e, depois, acrescida de metformina, evidenciando aumento na força contrátil lisa sob a influência do antidiabético. Fato este corroborado quando se constatou um acréscimo na pressão de perfusão nos grupos experimentais, em rim isolado, sem a infusão de fenilefrina, comparada à infusão apenas com solução de KH nos grupos de metformina.

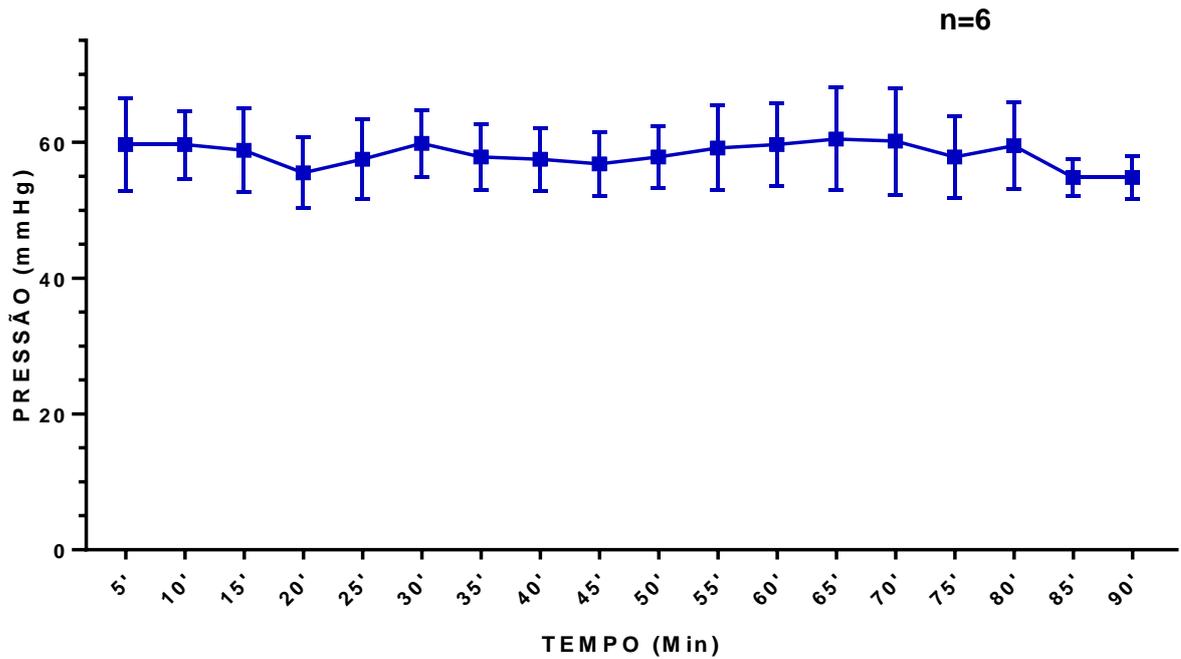


Figura 9. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com cloridrato de metformina (0.5mg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.

Quadro 4. Efeito do cloridrato de metformina (0.5mg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	9,36±0,91	0,31±0,08	6,82±1,15
10'	8,54±1,07	0,37±0,13	7,43±0,91
20'	8,52±1,20	0,35±0,13	6,80±0,59
30'	7,64±0,40	0,38±0,15	7,84±0,47
40'	7,54±0,32	0,39±0,15	7,60±0,42
50'	7,54±0,39	0,41±0,12	7,66±0,39
60'	7,44±0,67	0,43±0,14	8,04±0,38
70'	7,87±0,65	0,45±0,14	7,93±0,68
80'	8,22±0,64	0,43±0,15	7,22±0,75
90'	7,24±0,29	0,44±0,18	7,75±0,18

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹

Não houve diferença estatística na avaliação dos parâmetros estudados.

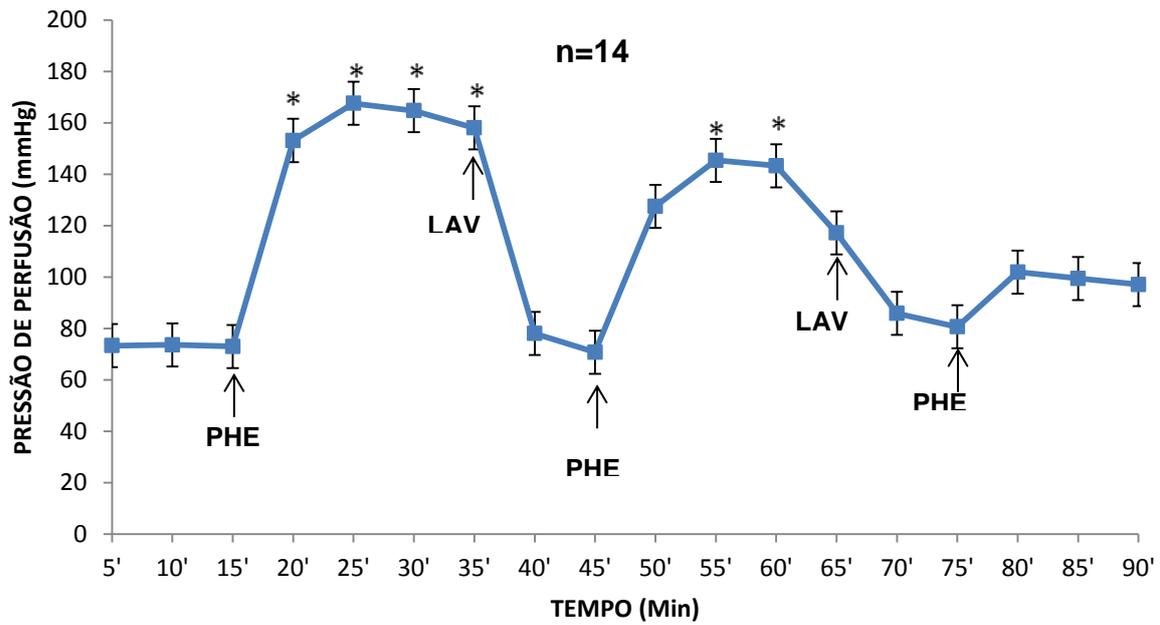


Figura 10A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com cloridrato de metformina (0.5mg/mL) e fenilefrina (10µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit onde se nota a taquifilaxia e o escape vascular nas três curvas de infusão.

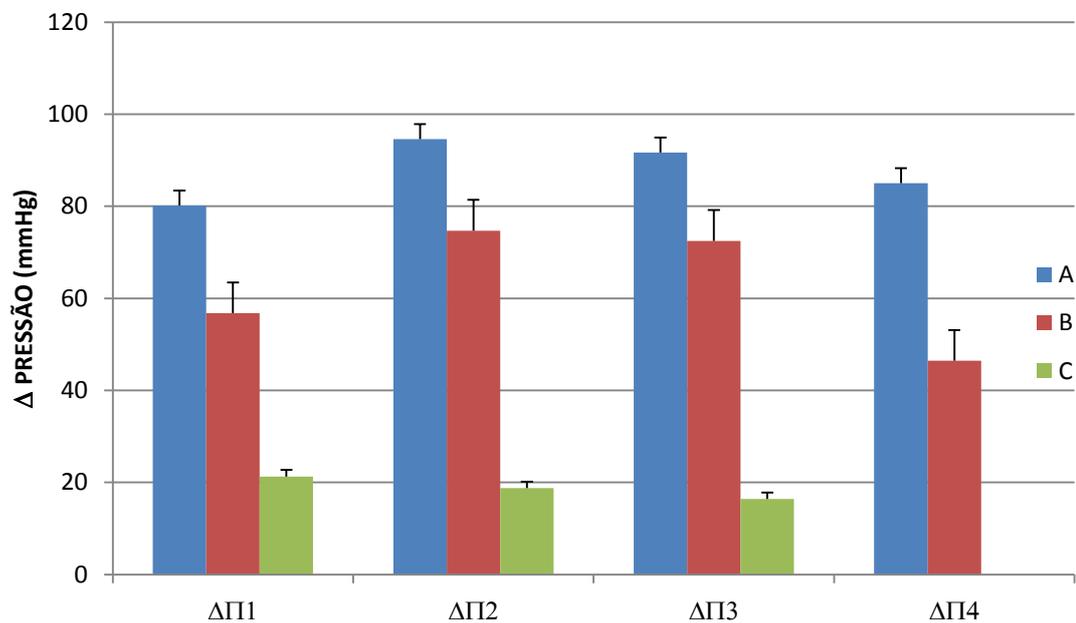


Figura 10B. Comparação das taquifilaxias das três curvas com infusão de metformina, evidenciando-se através do desenho gráfico acima.

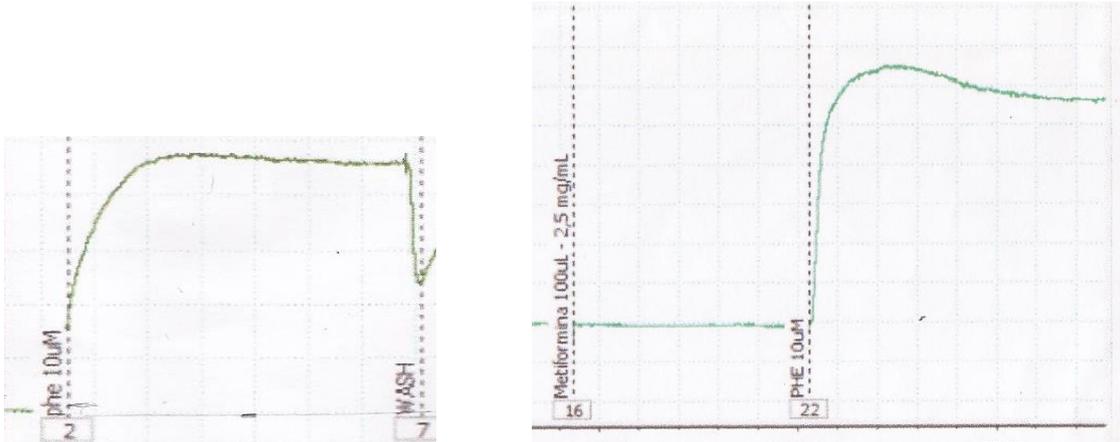


Figura 11. Reatividade contrátil em anéis de aorta em experimentos com infusão controle de fenilefrina ($10\mu\text{M}$) e, após tratamento com metformina, evidenciando aumento na contratilidade induzida pela droga antidiabética.

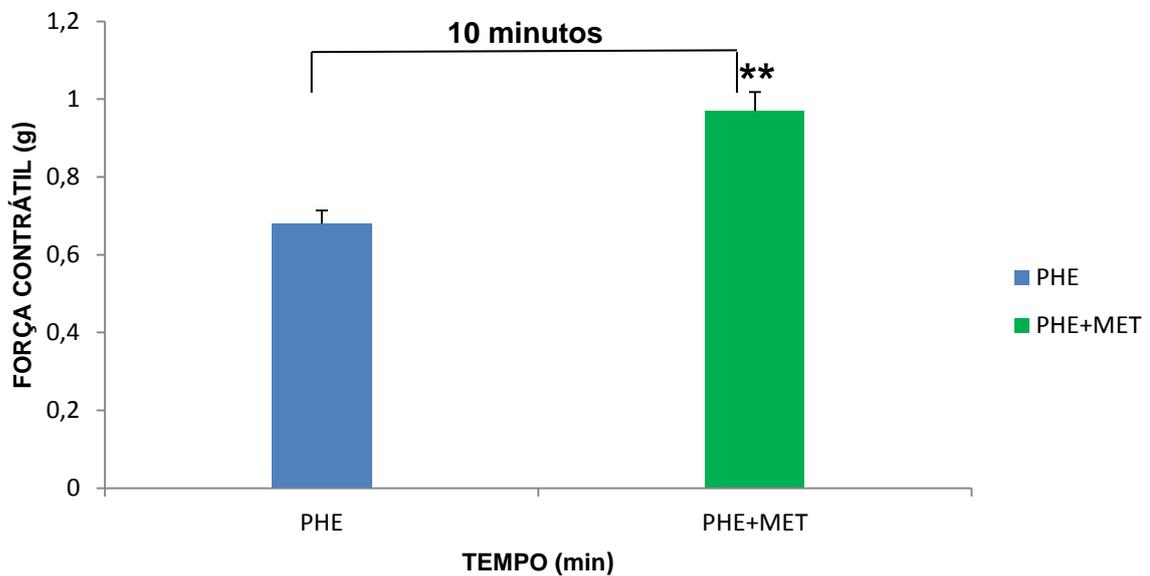


Figura 12. Experimento de anel de aorta de coelho para se validar a potencialidade da metformina em modificar a vasorreatividade contrátil à fenilefrina.

** $p < 0,05$ (teste t de Student não-pareado)

Quadro 5. Efeito do cloridrato de metformina (10µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	6,90±0,71	0,30±0,49	8,38±0,39
10'	7,20±0,83	0,42±0,06	9,20±0,57
20'	7,34±0,77	0,43±0,07	24,15±2,73 ****
30'	7,56±0,69	0,37±0,07	25,51±3,69 ****
40'	7,13±0,65	0,42±0,08	12,25±1,71 ****
50'	6,86±0,61	0,46±0,08	23,13±3,71 *
60'	7,82±0,72	0,49±0,089	20,86±2,39 *
70'	7,15±0,54	0,46±0,08	13,39±1,98 *
80'	7,4±0,69	0,55±0,11	14,7±2,38 *
90'	7,17±0,57	0,51±0,10	14,00±1,86 *

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹

******p<0.0001. Na análise da resistência vascular houve significante diferença entre as médias dos grupos nos tempos de 20', 30' e 40' comparados com o intervalo de 0 a 10' (teste t pareado).**

***p<0.05. Na análise da resistência vascular houve significante diferença entre as médias dos grupos nos tempos de 50' a 90', comparados com o intervalo de 0 a 10' (teste t pareado).**

5.4 Grupos de rins perfundidos com glimepirida (2µg/mL)

Nesses grupos experimentais foram desenvolvidos dois protocolos onde se fez infusão de glimepirida (2µg/mL) em coelhos normais com (n=9) e sem infusão (n=5) de fenilefrina nos rins colocados no sistema de perfusão. Nos rins perfundidos com a droga, mas sem fenilefrina, não houve alterações significantes nas diferenças das pressões médias calculadas (Figura 13). O mesmo perfil estatístico, sem diferenças entre as médias, se mostrou semelhante quando se mediu fluxo de perfusato e resistência vascular. As medidas de fluxo urinário ao longo dos intervalos temporais se mostraram maiores progressivamente, mostrando diferença estatística (p<0,05) quando comparadas ao tempo inicial: tempo 0'=0,26±0,09ml/g/min; tempo 20'=0,44±0,17ml/g/min; tempo 50'= 0,77±0,21ml/g/min e tempo 90'= 0,79±0,16ml/g/min (Quadro 6).

Nos grupos de tratamento com glimepirida com infusão de fenilefrina (n=9) o incremento de pressão foi deveras acentuado, elevando a pressão desde os tempos de 5' ($68,9 \pm 3,82 \text{ mmHg}$) até o minuto 20 ($147,33 \pm 10,18 \text{ mmHg}$) do experimento, atingindo um pico médio de $158 \pm 13,49 \text{ mmHg}$. Após a lavagem do sistema e reinfusão seguinte de fenilefrina na segunda dose, as pressões aumentaram quando foram comparadas às mensurações iniciais, vistas nas médias dos minutos 50 e 90 ($122,0 \pm 15,41$ vs $80,33 \pm 14,58 \text{ mmHg}$, respectivamente), contudo, esse aumento foi menor quando comparada à primeira curva e a terceira, bem como a segunda e a primeira, salientando que a reatividade da terceira curva foi mínima (Figura 14A). As médias de perfusato e fluxo urinário não tiveram divergências estatísticas significantes. Porém, a resistência vascular foi aumentada após a infusão de fenilefrina: nos tempos de 30' a 50' houve diferença significativa quando comparadas aos tempos de 0' e 10' (Quadro 7).

Na figura 14B foi demonstrada a variação de pressão durante as três infusões de fenilefrina, referidas como curva A, curva B e curva C. Em cada curva calculou-se as variações de pressão a partir da pressão de base de cada intervalo aferido, sendo, pois $\Delta\pi$ a variação entre os pontos de cada curva. Portanto, houve taquifilaxia nesse grupo, evidenciada na curva C a qual teve resposta à ação do agonista α -adrenérgico menor quando comparada ao grupo da metformina. Portanto, tanto o escape vascular quanto a taquifilaxia se mostraram mais evidentes nesse grupo estudado, à vista do perfil traçado no gráfico.

Neste protocolo experimental também se procedeu a investigação em aorta de coelho com a finalidade de se estudar as possíveis respostas vasoconstritoras em músculo liso vascular induzidas pela glimepirida (Figura 15), bem como sua provável potência nesse modelo. Observou-se que houve aumento no perfil pressórico da glimepirida quando se avaliou o perfil miotônico na aorta de coelho, caracterizando, portanto, uma proatividade reativa vascular constritora desse agente antidiabético (Figura 16). Além disso, foi constatado que houve diferença estatística entre os grupos de aorta que receberam fenilefrina e, depois, acrescida de glimepirida, evidenciando aumento na força contrátil lisa sob a influência do antidiabético. Fato este corroborado quando se constatou um acréscimo na pressão de perfusão nos grupos experimentais, em rim isolado, sem a infusão de fenilefrina, comparada à infusão apenas com solução de KH nos grupos de glimepirida. Para análise mais detalhada, foi plotado um gráfico comparativo dos experimentos com anéis de aorta quando se pode observar que sob efeito das drogas em estudo,

percebe-se aumento significativo na contratilidade lisa vascular, sendo, também significantes as médias entre metformina e glibeprida, sendo esta mais reativa do que a metformina nesse modelo experimental (Figura 17).

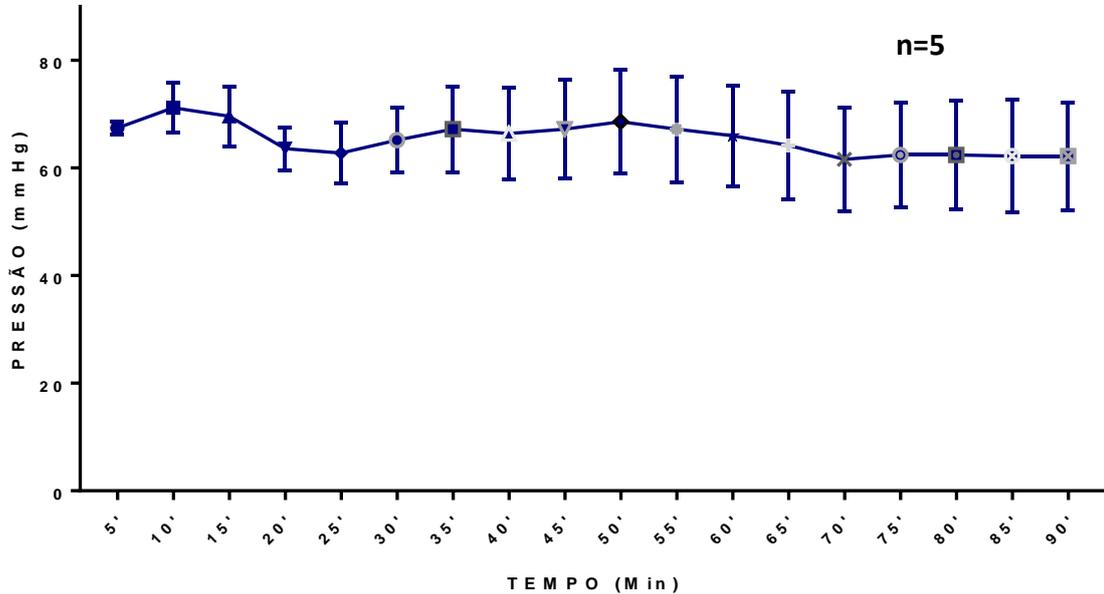


Figura 13. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com glibeprida (2µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.

Quadro 6. Efeito da glibeprida (2µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	10,13±0,9	0,26±0,09	4,25±0,69
10'	9,46±0,71	0,49±0,15*	7,53±0,87
20'	10,07±0,89	0,44±0,17*	6,29±0,46
30'	9,65±0,69	0,55±0,16*	6,94±0,68
40'	9,35±0,91	0,64±0,17*	7,19±0,85
50'	9,54±0,66	0,77±0,21*	6,98±0,79
60'	9,59±0,90	0,79±0,19*	6,57±0,74
70'	9,05±0,9	0,83±0,19*	6,80±0,71
80'	8,55±0,63	0,65±0,12*	7,20±0,95
90'	8,66±0,69	0,79±0,16*	6,93±0,78

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹. min⁻¹

***p<0,05 em relação ao tempo de 0' (teste t pareado).**

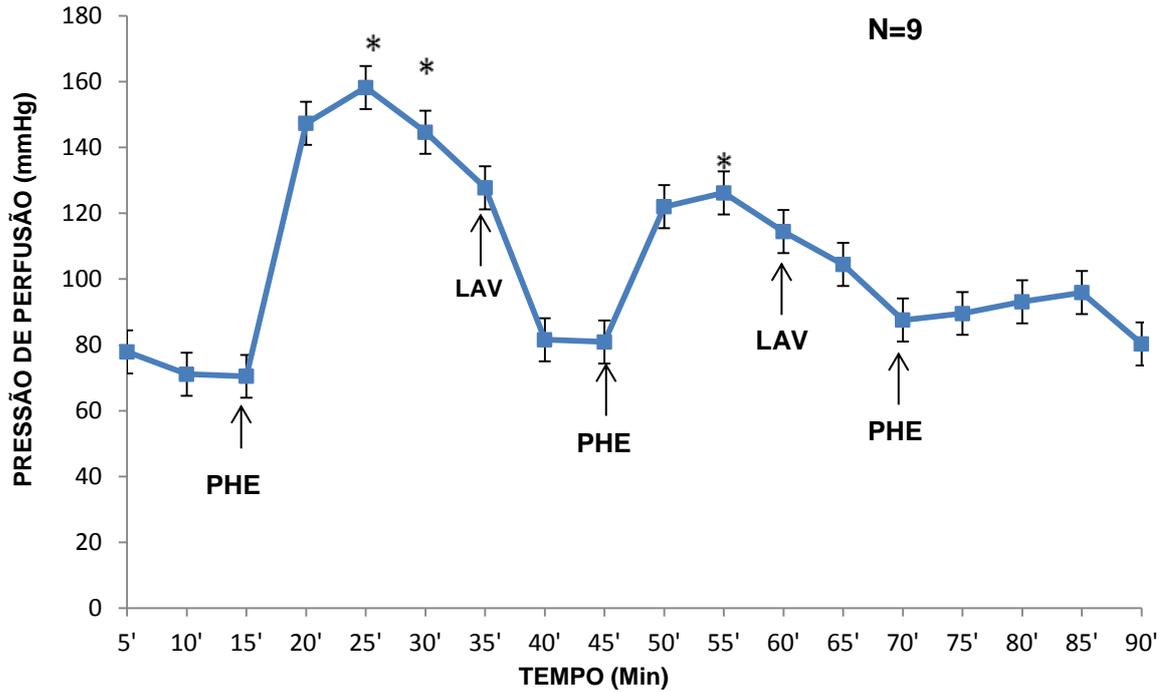


Figura 14A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com glibeprida ($2\mu\text{g}/\text{mL}$) e fenilefrina ($10\mu\text{g}/\text{mL}$) em solução de Krebs-Henseleit.

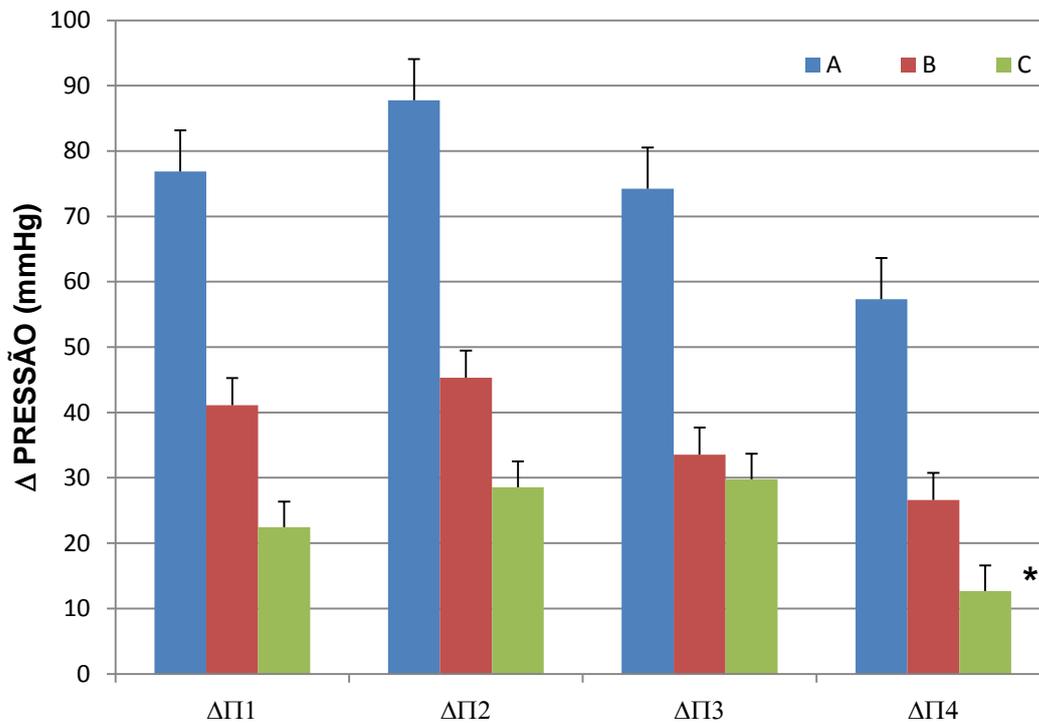


Figura 14B. Comparação das taquifilaxias das três curvas com infusão de glibeprida, evidenciando-se através do desenho gráfico acima.

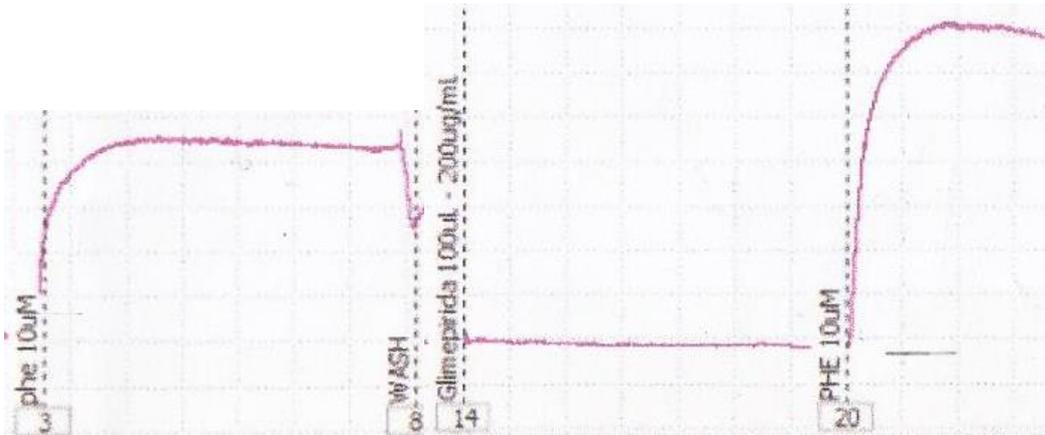


Figura 15. Reatividade contrátil em anéis de aorta em experimentos com infusão controle de fenilefrina ($10\mu\text{M}$) e, posteriormente, glimepirida, evidenciando aumento na contratilidade induzida pela droga antidiabética.

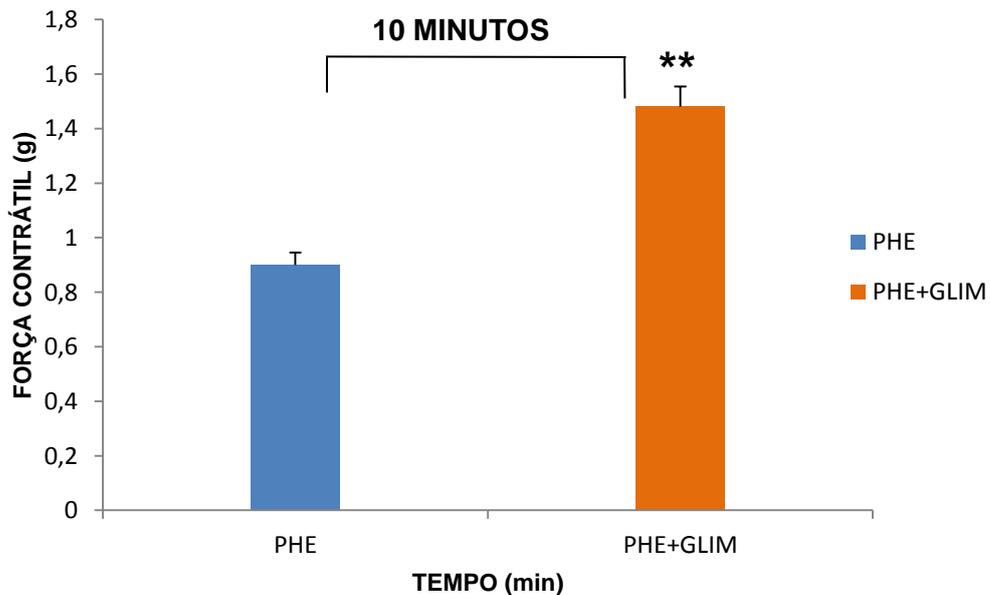


Figura 16. Experimento de anel de aorta de coelho para se validar a potencialidade da glimepirida quanto à vasorreatividade contrátil em infusões com fenilefrina.

** $p < 0,05$ (teste t de Student não-pareado)

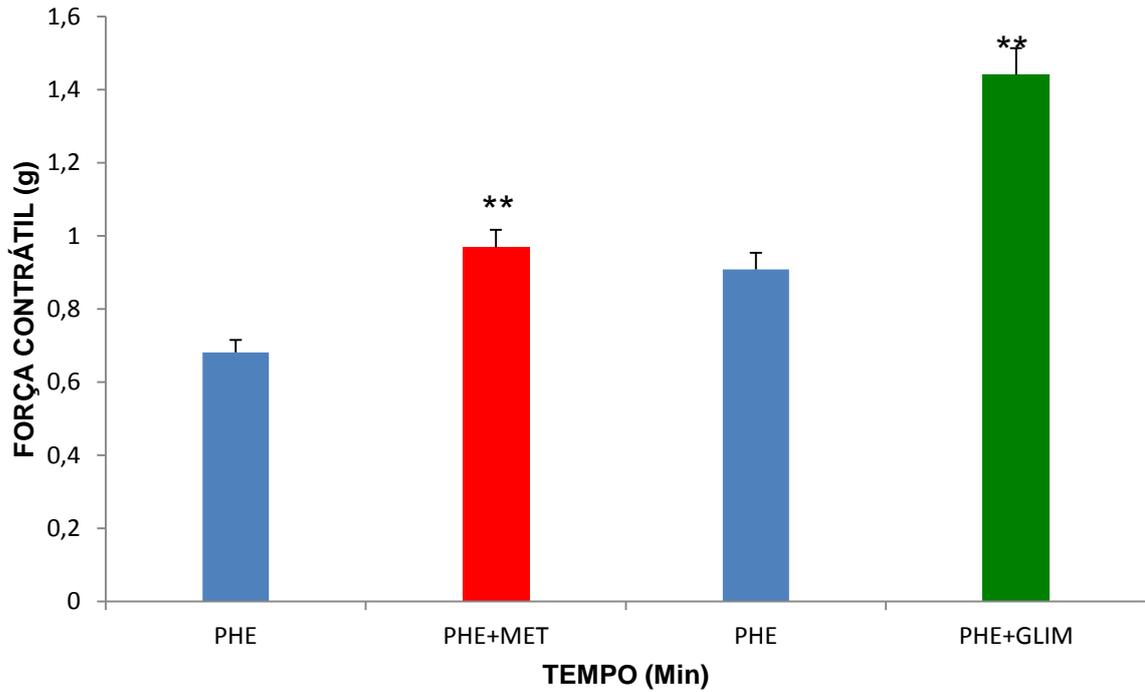


Figura 17. Gráfico comparativo dos experimentos de anel de aorta de coelho para se validar a potencialidade da metformina e glibeprida quanto à vasorreatividade contrátil em infusões com fenilefrina.

****p<0,05 (teste t de Student não-pareado) quando se comparou a fenilefrina com as drogas em estudo.**

#p<0,05 (teste t de Student não-pareado) quando se comparou metformina e glibeprida.

Quadro 7. Efeito da glibeprida (2,0µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	8,6±0,75	0,32±0,03	8,19±0,53
10'	8,56±0,84	0,33±0,09	10,60±1,86
20'	8,13±0,77	0,33±0,09	20,98±2,80 *
30'	8,75±0,93	0,33±0,06	19,30±3,24 *
40'	8,60±0,97	0,35±0,04	13,39±3,43 *
50'	9,04±1,03	0,35±0,05	17,52±3,82*
60'	8,38±0,85	0,38±0,05	15,71±2,11*
70'	8,38±0,80	0,39±0,06	13,99±3,35*
80'	8,70±0,86	0,42±0,08	14,11±3,26*
90'	8,65±0,68	0,39±0,07	10,92±2,26*

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹. min⁻¹.

***p<0,05 a partir do tempo de 20' (teste t pareado).**

5.5 Grupos de rins perfundidos com glibenclamida (5µg/mL)

Esse outro grupo de infusão com drogas antidiabéticas orais seguiu a mesma linha de experimentos onde foram feitos nos dois grupos; o primeiro sem infusão de fenilefrina e o outro com infusão do agonista α -adrenérgico. O grupo sem a infusão do vasoconstritor (n=11) apresentou média pressórica crescente ao longo do tempo, quando comparadas com os outros grupos de drogas também sem fenilefrina (Figura 18). As médias de pressão apresentaram diferenças estatísticas quando se compararam às pressões dos grupos sem infusão de fenilefrina a partir do minuto 40: KH= $27,0 \pm 1,52$ mmHg vs METFORMINA= $57,83 \pm 6,14$ mmHg vs GLIMEPIRIDA= $67,2 \pm 9,81$ mmHg e GLIBENCLAMIDA= $90,73 \pm 9,71$ mmHg. Tais perfis são repetidos e significantes na análise dos tempos de 90 minutos, em ordem crescente: KH= $24,33 \pm 5,36$ mmHg vs METFORMINA= $54,83 \pm 3,16$ mmHg vs GLIMEPIRIDA= $61,8 \pm 10,66$ mmHg e GLIBENCLAMIDA= $141,27 \pm 24,15$ mmHg. Para corroborar esses fatos, os parâmetros de fluxo de perfusato, fluxo urinário e resistência vascular também obtiveram valores médios crescentes ao longo dos tempos aferidos no grupo estudado. Fluxo de perfusato: tempo 0= $6,85 \pm 0,7$ ml/g/min; tempo 20'= $7,55 \pm 0,57$ ml/g/min; tempo 50'= $9,63 \pm 0,25$ ml/g/min e tempo 90'= $10,19 \pm 0,54$ ml/g/min. As medidas de fluxo urinário praticamente triplicam ao longo da análise dos tempos, devido ao aumento da pressão de perfusão. Fluxo urinário: tempo 0= $0,33 \pm 0,06$ ml/g/min; tempo 20'= $0,51 \pm 0,07$ ml/g/min; tempo 50'= $0,64 \pm 0,09$ ml/g/min e tempo 90'= $0,69 \pm 0,11$ ml/g/min. A resistência vascular não se alterou significativamente ao longo dos tempos (Quadro 8).

Procedeu-se, então, um grupo experimental onde se administrou tezosentan (10^{-6} M) na perfusão com solução de KH por 30 minutos e, posteriormente, perfundiuse com glibenclamida (5µg/mL) a fim de se estudar o possível efeito do antidiabético na via de sinalização da endotelina, substância vasoconstritora bastante potente (Figura 19). Os parâmetros estudados foram os mesmos em todos os grupos outros. O fluxo de perfusato, fluxo urinário e a resistência vascular não obtiveram diferenças estatísticas entre os tempos avaliados nesse grupo. No entanto, quando se comparou as pressões de perfusão entre os tempos aferidos, observou-se que houve um decréscimo significativo dos valores de pressão à medida que o efeito do tezosentan se manifestava, denotando que o bloqueio da endotelina, mesmo sem infusão de qualquer substância vasoconstritora, diminuiu os valores pressóricos a partir dos tempos de 40 minutos (Quadro 9).

No grupo de glibenclamida com infusão de fenilefrina, notou-se que a pressão após a infusão no sistema, aumentou significativamente até a lavagem, tendo aumentado menos do que nos primeiros minutos, tendendo também à taquifilaxia. Observou-se, também a mudança de configuração na segunda e terceira curvas que já não são percebidas (Figura 20A). No entanto, quando se compara o grupo sem fenilefrina com o grupo com fenilefrina, constata-se que no primeiro o incremento pressórico se dá de modo mais evidente, apesar de ambos terem, curvas de pressão bem semelhantes: GLIBENCLAMIDA: tempo 5'= 68,9±3,82mmHg; tempo 20'= 75,72±4,25mmHg; tempo 50'= 101,82±12,80mmHg; tempo 90'= 141,27±24,15mmHg. GLIBENCLAMIDA + FENILEFRINA: tempo 5'= 68,72±2,84mmHg; tempo 20'= 151,63±11,64mmHg; tempo 50'= 101,09±11,81mmHg; tempo 90'= 82,27±13,98mmHg.

Na figura 20B, o gráfico demonstrou a variação de pressão durante as três infusões de fenilefrina, referidas como curva A, curva B e curva C. Em cada curva calculou-se as variações de pressão a partir da pressão de base de cada intervalo aferido, sendo, pois $\Delta\pi$ a variação entre os pontos de cada curva. Portanto, houve taquifilaxia nesse grupo, notadamente na curva C a qual teve resposta à ação do agonista α -adrenérgico menor quando compara ao grupo de KH+PHE com três curvas.

Dentre os parâmetros também estudados, a resistência vascular se mostrou com significantes diferenças nas médias entre as aferições dos tempos de 20, 30 e 40 minutos quando comparadas aos tempos iniciais de 0' e 10'. Os parâmetros de fluxo de perfusato e fluxo urinário não diferiram entre as amostras calculadas (Quadro 10).

No gráfico da figura 21, fez-se uma plotagem comparativa de dois grupos de perfusão onde a primeira se demonstra a dinâmica pressórica da glibenclamida sem infusão de fenilefrina, em contraposto com o tezosentan infundido 30 minutos antes da infusão com glibenclamida, revertendo, significativamente, a pressão de perfusão em rim isolado de coelho, postulando-se a participação da endotelina no aumento da pressão de perfusão à luz da glibenclamida. Portanto, ficou evidente uma verdadeira inversão do efeito pressórico de perfusão.

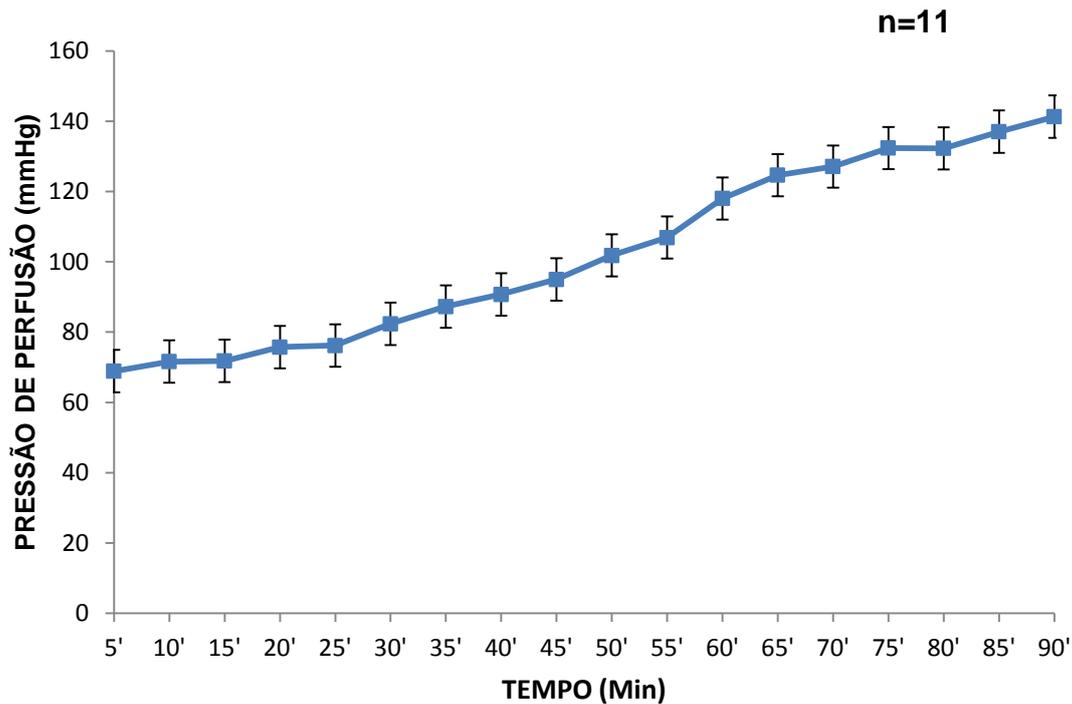


Figura 18. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com glibenclamida (5µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.

Quadro 8. Efeito da glibenclamida (5µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO (minutos)	FLUXO DE PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	6,85±0,7	0,33±0,06	8,18±0,57**
10'	7,54±0,72	0,40±0,05	9,60±0,73**
20'	7,55±0,57	0,51±0,07	10,83±1,18**
30'	8,36±0,43	0,56±0,07	10,24±1,03**
40'	8,63±0,55	0,55±0,06	11,12±1,39**
50'	9,63±0,25*	0,64±0,09**	10,78±1,48
60'	9,19±0,26*	0,66±0,10**	12,99±2,19
70'	9,55±0,34*	0,64±0,10**	13,61±2,49
80'	9,08±0,26*	0,69±0,11**	14,59±2,49
90'	10,19±0,54**	0,69±0,11**	14,14±2,72

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹. min⁻¹.

****p<0.05 em relação ao intervalo de tempo entre 0 e 40' (teste t pareado).**

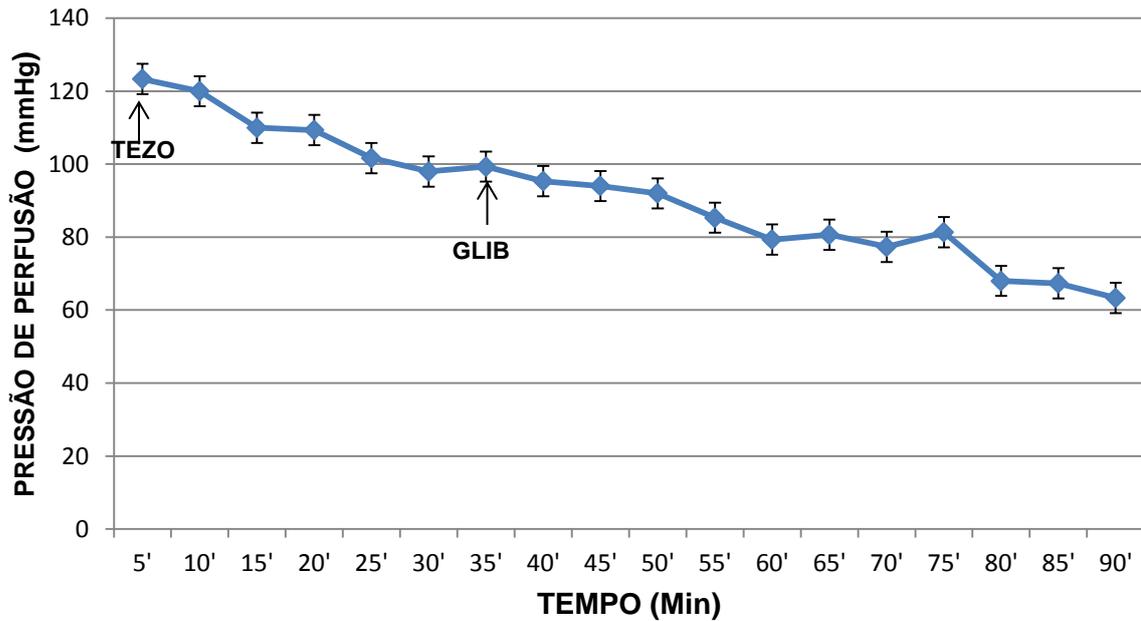


Figura 19 Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com tezosentan (10^{-6}M) por 30 minutos e com glibenclamida ($5\mu\text{g/mL}$) em solução de Krebs-Henseleit.

Quadro 9. Efeito da glibenclamida ($5\mu\text{g/mL}$) e tezosentan (10^{-6}M) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO	PRESSÃO	PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	123,33±8,18	3,58±0,62	0,25±0,05	37,41±8,90
10'	120,0±2,31	2,97±0,038	0,26±0,05	41,75±5,62
20'	109,33±6,35	3,07±0,40	0,29±0,03	39,53±3,32
30'	98,0±9,68	2,64±0,19	0,32±0,06	37,38±4,68
40'	95,33±9,33	2,85±0,66	0,37±0,04	37,22±9,88
50'	92,0±7,02*	3,25±0,53	0,41±0,05	29,48±4,67
60'	79,33±4,05**	2,67±0,55	0,45±0,05	31,76±7,78
70'	77,33±1,76**	2,80±0,52	0,48±0,08	30,51±6,82
80'	68,0±2,0***	2,71±0,55	0,48±0,09	27,74±6,88
90'	63,33±3,52***	2,66±0,51	0,5±0,11	25,31±4,45

Valores de pressão de perfusão expressos em mmHg. Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de $\text{mmHg/mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

* $p < 0.05$ em relação ao intervalo de tempo entre 0 e 40' (teste de Bonferroni).

** $p < 0.05$ em relação ao intervalo de tempo entre 0 e 40' (teste de Bonferroni).

*** $p < 0.05$ em relação ao intervalo de tempo entre 0 e 40' (teste de Bonferroni).

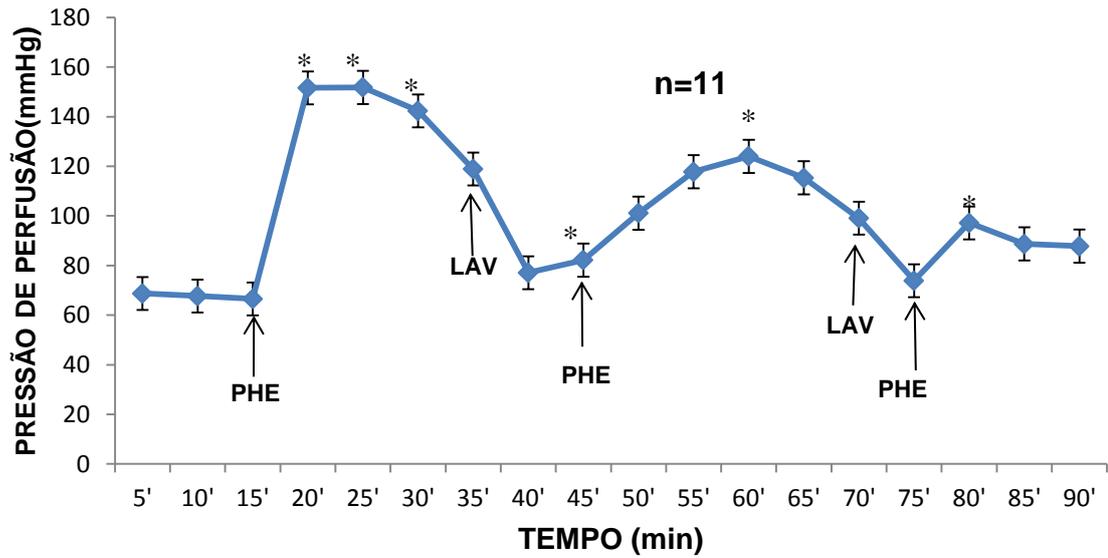


Figura 20A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com glibenclamida (5 μ g/mL) e fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit, observando-se intensa taquifilaxia e escape vascular.

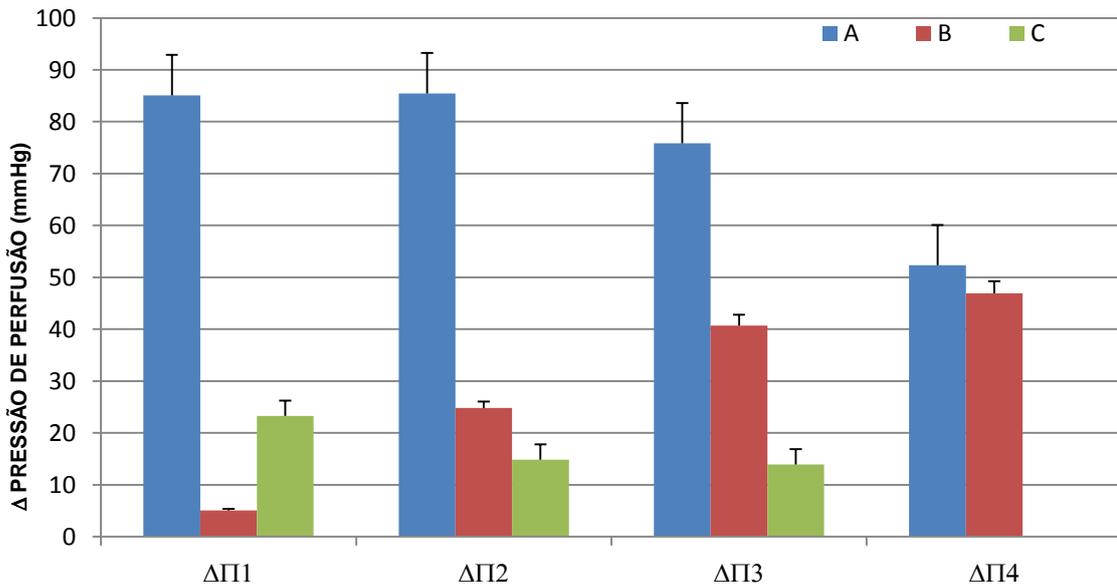


Figura 20B. Comparação das taquifilaxias das três curvas com infusão de glibenclamida, evidenciando-se através do desenho gráfico acima.

Quadro 10 Efeito da glibenclamida (5µg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (1µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO (minutos)	PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	8,67±0,75	0,23±0,04	8,31±0,48
10'	8,56±0,84	0,35±0,09	8,88±0,45
20'	8,13±0,77	0,34±0,09	20,43±1,28 ***
30'	8,75±0,93	0,34±0,06	19,20±1,34***
40'	8,61±0,97	0,35±0,04	10,29±1,94 ***
50'	9,04±1,03	0,35±0,05	13,48±2,31
60'	8,38±0,85	0,38±0,05	16,69±2,7
70'	8,38±0,8	0,39±0,06	14,43±2,98
80'	8,7±0,86	0,41±0,08	12,08±2,01
90'	8,65±0,68	0,39±0,07	11,31±2,32

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹

Entre os tempos de 0' a 40' houve diferença entre as médias.

***p<0.0001 em relação aos tempos iniciais de 0 e 10' (teste t pareado).

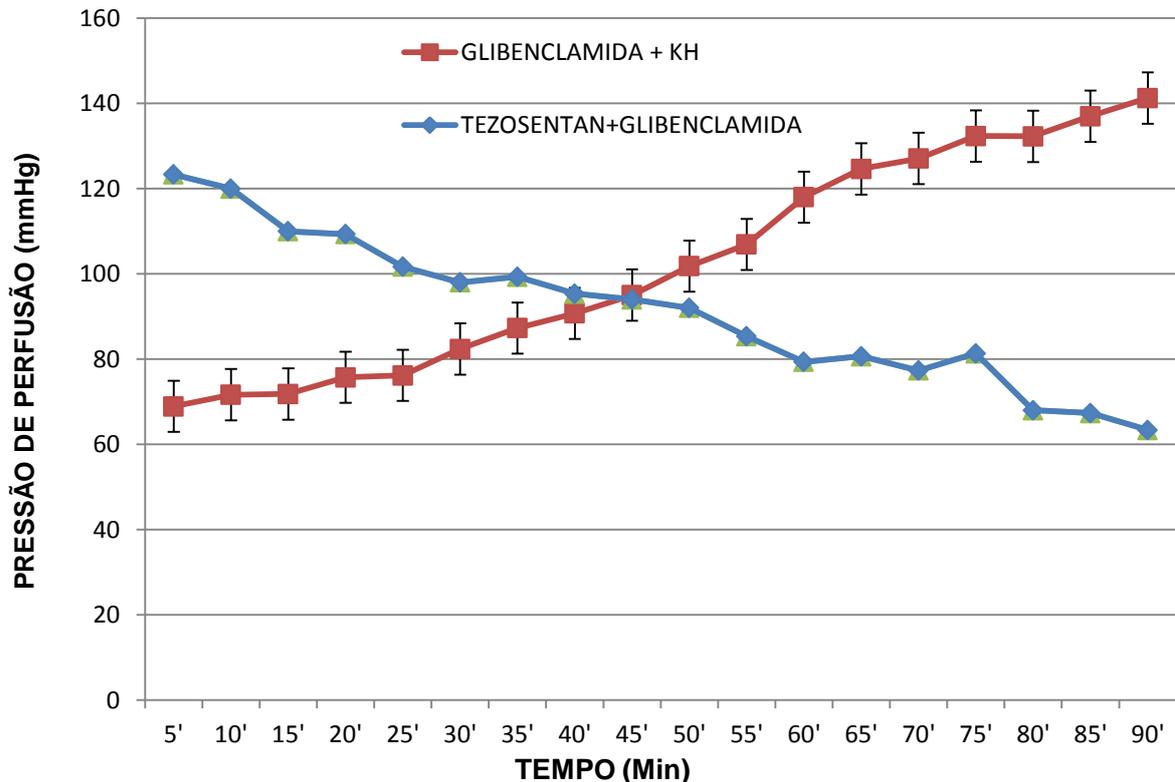


Figura 21. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com tezosentan (10⁻⁶M) e, posteriormente glibenclamida (5µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit quando comparadas às pressões do grupo com infusão de glibenclamida sem fenilefrina.

5.6 Grupos de rins perfundidos com indometacina (0,33mg/mL)

Nos grupos de infusão com indometacina, adicionados com de fenilefrina (n=2) o incremento de pressão foi deveras acentuado, elevando a pressão a partir da infusão do agente adrenérgico ao minuto 15 onde houve incremento máximo de pressão no minuto 20, atingindo valor máximo médio de 205mmHg. Na segunda infusão do vasoconstritor, a segunda curva de pressão teve um perfil de escape compatível com as outras experiências. Dos parâmetros avaliados, a resistência vascular obteve médias bastante elevadas, resultantes da abolição dos efeitos das prostaglandinas pela inibição de COX pela indometacina.

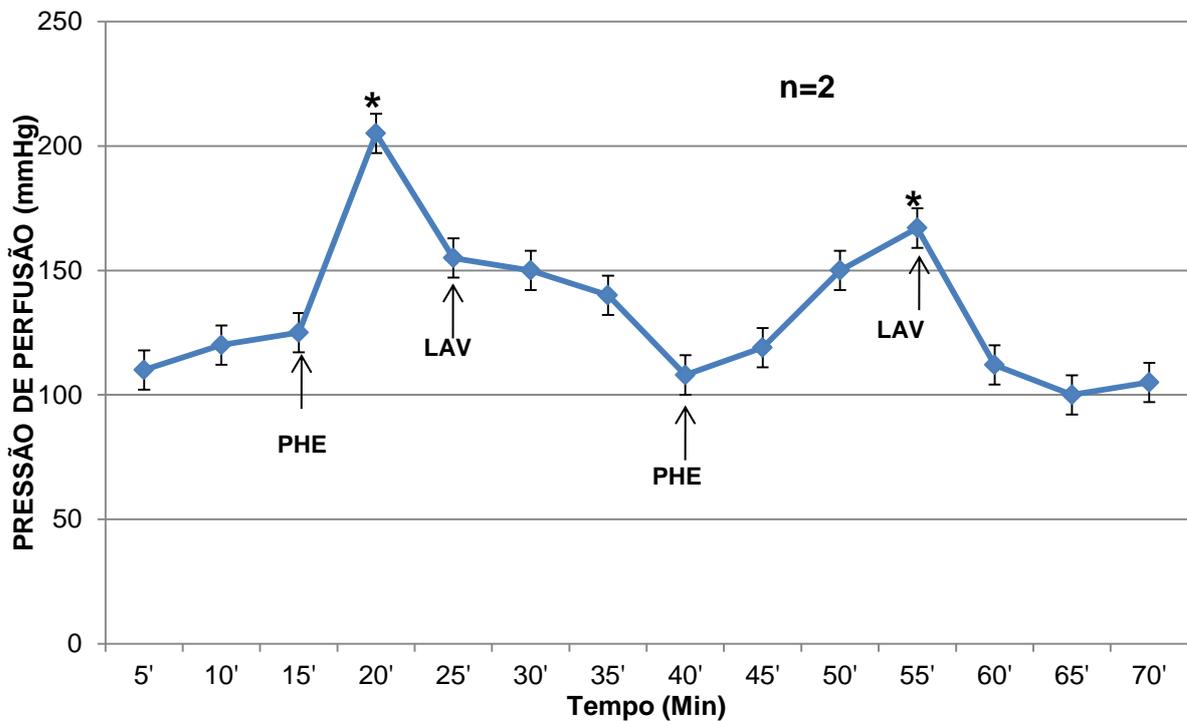


Figura 22A. Pressão de perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com indometacina (0,33mg/mL) e fenilefrina (10 μ g/mL) em solução de Krebs-Henseleit em duas curvas de infusão.

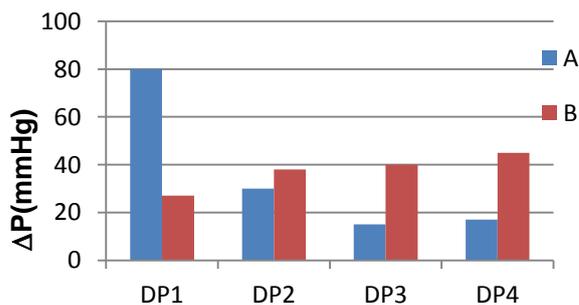


Figura 22B. Comparação das taquifilaxias das três curvas com infusão de indometacina, evidenciando-se através do desenho gráfico acima.

Quadro 11. Efeito da indometacina (0,33mg/mL) na perfusão de rins de coelhos normais, perfundidos com fenilefrina (10µg/mL) em solução de Krebs-Henseleit.

TEMPO	PERFUSATO	FLUXO URINÁRIO	RESISTÊNCIA VASCULAR
0	4,84±2,76	0,32±0,08	38,48±24,0
10'	5,20±3,26	0,37±0,13	38,2±23,64
20'	5,95±3,60	0,38±0,09	35,40±15,6
30'	5,96±3,60	0,43±0,03	31,3±14,33
40'	5,44±2,81	0,39±0,10	25,19±13,09
50'	5,20±2,80	0,36±0,07	37,67±19,02
60'	4,66±2,72	0,34±0,07	38,92±28,09
70'	4,23±2,29	0,34±0,07	31,05±19,5
80'	5,90±4,10	0,40±0,16	32,87±18,67
90'	4,44±2,50	0,37±0,08	30,70±19,2

Valores de fluxo de perfusato e fluxo urinário referidos em média±erro padrão e expressos em unidades de ml/g/min. A resistência vascular referida em média±erro padrão e expressa em unidades de mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹.

5.7 ESCAPE VASCULAR

Após a conclusão de todos os grupos experimentais, foram feitos os cálculos dos escapes vasculares, considerando-se como os grupos controles os rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit, de três curvas de infusão de fenilefrina. Foram analisados e comparados os grupos entre si e os dados de escape dos grupos nas três curvas de infusão com a substância vasoconstritora. Em todas as três curvas que compõem cada grupo experimental houve significância estatística entre as médias.

No grupo controle, houve decréscimo do escape vascular nas curvas de infusão, mostrando-se (C1: 28,4%; C2: 12,03% e C3:5,54%). No grupo com metformina, suas três curvas de infusão com PHE também se mostraram diferentes estatisticamente: C1: 10,25%; C2: 37,86% e C3: 22,23%. Do mesmo modo, após análise estatística, viu-se que os grupos com glimepirida (C1: 34,68%; C2: 25,98% e C3: 55,98%) e glibenclamida (C1: 10,89%; C2: 51,16% e C3:40,27%) também tiveram suas médias diferenciadas e estatisticamente significantes (Figura 23). Nas avaliações estatísticas descritas acima foi utilizado o teste *t* pareado de Student.

De modo geral, os grupos de infusão com as drogas antidiabéticas glimepirida e glibenclamida apresentaram diferenças estatísticas quando se compararam às médias dos escapes vasculares dos grupos com infusão de fenilefrina (Figura 23).

Quando se comparou as curvas dos grupos com as dos outros, a C2 da metformina destacou-se em comparação com a C2 da PHE. Nota-se, também, que, no grupo da glibenclamida com infusão de fenilefrina houve diferença estatística da primeira curva em relação às duas outras curvas (Quadro 12). Na C2 da GLIB destacou-se como a curva de maior percentual de escape vascular descrita nessa pesquisa (Figura 23). Nas avaliações estatísticas descritas acima foi utilizado o teste de Dunett pareado para comparações intergrupos.

Na Figura 23, quando se comparou estatisticamente os grupos entre si, certificou-se que houve diferença entre as médias dos experimentos com glimepirida e glibenclamida em comparação com os de metformina e fenilefrina com três curvas de infusão (PHE 15,19% vs MET 23,45% vs GLIM 38,88% vs GLIB 34,11%).

No grupo da glimepirida mostrou-se o aumento do escape de modo mais evidente, principalmente na última curva, enquanto que a metformina e a glibenclamida também se mostraram também diferentes, mas de modo menos acentuado do que o grupo controle (C3 PHE C3:5,54% vs C3 MET 22,23% vs C3 GLIM 55,98% vs C3 GLIB 40,27%). No grupo da glibenclamida, observou-se a maior média de C2 quando comparada às curvas dos demais grupos estudados (C2 GLIB 51,16% vs C2 GLIM 25,98% vs C2 MET 37,86% e C2 PHE 12,03%), caracterizando-se como a maior percentagem de escape nessas curvas (Figura 23). Nas avaliações estatísticas descritas acima também foi utilizado o teste de Dunett pareado.

ESCAPE VASCULAR (%)				
	KH + PHE (3 CURVAS) N=14	METFORMINA + PHE N= 14	GLIMEPIRIDA + PHE N=9	GLIBENCLAMIDA + PHE N=11
C1	28	10,25	34,68	10,89
C2	12,03	37,86	25,98	51,16 [#]
C3	5,54	22,23	55,98	40,27 [#]
MÉDIA±E.P.M.	15,19±3,09	23,45±3,70	38,88±5,15***	34,11±6,28**

Tabela 1. Escapes renovasculares totais dos grupos de rins perfundidos com antidiabéticos orais em solução de KH e fenilefrina (10µg/mL). C1= primeira curva de infusão de fenilefrina; C2= segunda curva de infusão de fenilefrina e C3= terceira curva de infusão de fenilefrina. Valores expressos em média±erro da média.

***P<0,005 em relação ao grupo KH+PHE 3 CURVAS (Teste *t* não-pareado)
 **P<0,0083 em relação ao grupo KH+PHE 3 CURVAS (Teste *t* não-pareado)
 #p<0,0001 em relação à C1 (Teste de Dunett pareado)

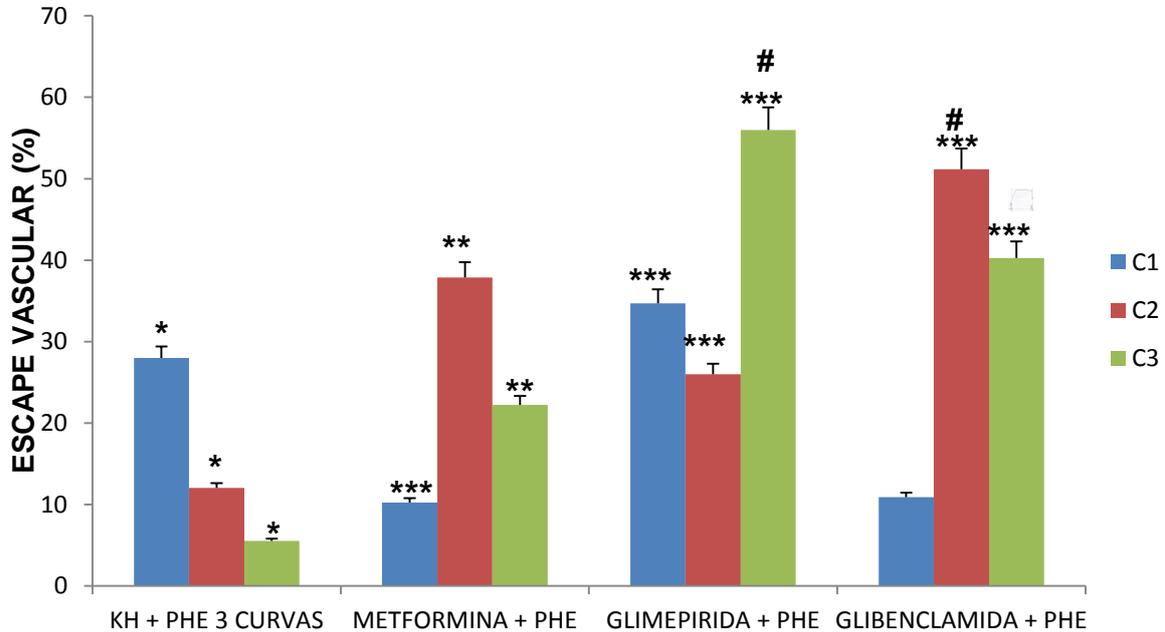


FIGURA 23. Comparativo entre os escapes vasculares dos grupos de rins perfundidos com antidiabéticos orais em solução de KH e fenilefrina (10µg/mL). C1= primeira curva de infusão de fenilefrina; C2= segunda curva de infusão de fenilefrina e C3= terceira curva de infusão de fenilefrina.

*P<0,005 em relação às curvas do grupo com fenilefrina (Teste *t* pareado)
 ***P<0,005 em relação ao grupo KH+PHE 3 CURVAS (Teste *t* não-pareado)
 **P<0,0083 em relação ao grupo KH+PHE 3 CURVAS (Teste *t* não-pareado)
 #p<0,0001 em relação à C1 (Teste Dunett pareado)

Sumarizando, as curvas de escape renovascular do primeiro bloco à esquerda correspondem ao grupo controle, seu tratamento por substâncias hipoglicemiantes. Na segunda, construída pelo tratamento com metformina, observa-se uma queda substancial e significativa na primeira curva, quando comparada ao grupo controle. Já o tratamento com glimepirida apresentou quadro de escape vascular, diferente em todos os níveis com expressão maior na terceira curva e a glibenclamida apresentou valores ainda bem maiores na segunda e na sequência, também na terceira.

6. DISCUSSÃO

6.1 RIM PERFUNDIDO

Esta pesquisa retoma alguns aspectos da dinâmica cardiovascular renal, explorando respostas desconhecidas de três agentes hipoglicemiantes orais de conhecido uso clínico, e como eles reagem no tocante à reatividade α -adrenérgica, se nas possíveis reações vasculares, em um modelo de rim isolado e perfundido de coelho.

Artérias de vários leitos vasculares, muitas vezes compartilham características funcionais semelhantes, a despeito de estarem localizadas em diferentes órgãos e sistemas. Entretanto, existem diferenças proeminentes nas respostas miogênicas às mudanças na pressão transmural e essas respostas são maiores nas artérias cerebrais e renais do que em outros vasos, como por exemplo, a artéria mesentérica, considerados vasos de resistência (JUST, 2007; JUST & ARENDSHORST, 2005; LAI *et al.*, 2012). As células vasculares do músculo liso são derivadas de diversas linhagens embriológicas que podem apresentar diferentes linhagens, explicando a heterogeneidade da função especializada na vasomotricidade e tonicidade contrátil (OWENS *et al.*, 2004; PFALTZGRAFF e cols., 2014). Os vasos renais são formados por angiogênese e vasculogênese díspares (GOMEZ e cols., 1997) e o músculo liso expressa caracteres genéticos contráteis rápidos e lentos, representando fenótipos fásicos e tônicos (REHO e cols., 2014).

A aorta e as arteríolas eferentes são exemplos do fenótipo tônico, enquanto que pequenas artérias resistentes e arteríolas, incluindo a artéria radial cortical (interlobular) e a arteríola aferente, são exemplos do fenótipo fásico. Além disso, existem diferenças significativas na magnitude das respostas vasoconstritoras ao cloreto de potássio (KCl), noradrenalina (NOR) e serotonina e à vasodilatação dependente e independente do endotélio entre a aorta do rato e segmentos arteriais menores (KLEINBONGARD e cols., 2013).

Por outro lado, o rim é ricamente perfundido e o fluxo sanguíneo renal (FSR) normalmente responde por aproximadamente 25% do débito cardíaco total. A autorregulação é um componente fundamental da função renal onde se integram mecanismos intrarrenais intrínsecos que estabilizam o fluxo sanguíneo local e a taxa de filtração glomerular (TFG) durante alterações na pressão de perfusão renal em um intervalo definido (McNAY & KISHIMOTO, 1969; TOLBERT, 2000). Isto

requer que a resistência vascular renal (RVR) acomode-se proporcionalmente à pressão de perfusão renal (PPR). As artérias radiais corticais, e especialmente as arteríolas aferentes são os vasos de resistência pré-glomerular maiores numericamente, embora estruturalmente pequenas cujo tônus medeiam a maior parte da autorregulação induzida pela pressão de fluxo sanguíneo renal (FSR) e TFG (TRONCOSO *et al*, 2008).

As arteríolas eferentes geralmente não participam na autorregulação do FSR, embora possam contribuir para a autorregulação da filtração glomerular em baixas pressões de perfusão, sob certas condições, como dieta com baixo teor de sal e ativação do sistema renina-angiotensina (RAS), diante de altas concentrações de angiotensina II (SEELIGER e cols., 2009) A autorregulação renal é alcançada principalmente por uma ação de dois mecanismos principais: a resposta miogênica e a reação de *feedback* tubuloglomerular regulado pela mácula densa. Juntos, eles ajustam o tônus das células vasculares pré-glomerulares para regular a PPR em constante mudança, seja espontânea ou induzida (YANG e cols., 2016). A resposta miogênica rápida relaciona o tônus das arteríolas aferentes à sua pressão intraluminal através de ajustes intrínsecos na tensão da musculatura lisa vascular (HILL & MEININGER, 2012).

De acordo com Fonteles & Forti (1993), rins isolados de coelhos e perfundidos com solução de Krebs Henseleit, num sistema aberto foram estudados para se prospectar curvas de dose-resposta. Por exemplo, efeitos da indometacina, um inibidor de COX-1 e COX-2 e de reserpina (um depletor de catecolaminas), no escape renovascular induzido por concentrações variadas de noradrenalina foram estudados e avaliados. Indometacina quando administrada duas horas antes da cirurgia seguida de infusão contínua bloqueou o escape renovascular em todas as doses de NOR testadas. Reserpina aplicada por vias intramuscular também suprimiu o escape vascular onde os autores concluíram que houve, provavelmente, a participação de prostaglandinas no escape induzido por noradrenalina, no rim perfundido de coelho.

Segundo Costa e Forti (1979), em experimentos também com perfusão renal de coelhos normais e diabéticos induzidos por aloxana, a norepinefrina (1µg/min) promoveu aumento significativo na pressão de perfusão a qual foi bloqueada pela fentolamina, um agente bloqueador alfa-adrenérgico. Em coelhos diabéticos a norepinefrina induziu um lento aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular, demonstrando que a diminuição na sensibilidade do receptor α -adrenérgico

à droga. O propranolol, um bloqueador beta adrenérgico foi capaz de induzir um bloqueio alfa adrenérgico em rins diabéticos, demonstrando, assim, um defeito no receptor adrenérgico em animais diabéticos os quais foi mostrado três semanas após o tratamento com aloxana e pode refletir uma primeira resposta.

6.2 AGENTES HIPOGLICEMIANTES

Para o estudo das interações fisio-farmacológicas entre os hipoglicemiantes orais e a reatividade vascular no rim perfundido, em primeira instância, hipotenzou-se como essa interação ocorreria no tocante às respostas vasomotoras medidas no sistema de perfusão. Demonstrou-se inicialmente que a metformina produziu pressões de perfusão significativamente elevadas, durante todo o tempo observado, assim como as respostas α -adrenérgicas também se encontraram modificadas (Figura 9). Com isso, percebeu-se que a administração de 10 μ M de fenilefrina produziu uma nova resposta contrátil e com uma clara atividade no escape renovascular e na taquifilaxia, segundo mostrados nas figuras 6, 7 e 8 em experimentos controles, utilizando protocolos com duas ou três curvas de infusão de PHE.

Isso não ocorre na glimepirida, em pacientes com diabetes tipo 2, mas apresentou uma proteção ao músculo cardíaco e certamente em outras estruturas vasculares ou orgânicas (CHAHWALA & ARORA 2009). A observação experimental da glimepirida mostrou-se que ocorreu uma intensa taquifilaxia quando são comparadas as três curvas de fenilefrina, sendo que na última, praticamente nivela com a linha de base. Por um lado se isso ocorreu, percebeu-se que, também, o escape renovascular mostrou-se intenso, de acordo na figura 23.

A glibenclamida atenua as respostas protetoras à abertura de canais de potássio sensíveis a ATP vasculares durante a isquemia. Assim sendo, o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2 com glibenclamida pode ter efeitos em doenças cardiovasculares de modo ameaçador quando utilizada em condições de isquemia. A glimepirida e a metformina parecem não possuir essas características, muito embora não devam prejudicar a função vasodilatadora na abertura do canal de K⁺ sensível a ATP (SIRTORI e cols., 1984; COLE e cols., 1991; ABBINK e cols., 2002).

Pacientes com DM participaram de um estudo de cohort em Berlim em 2009 para avaliar função renal em pessoas com mais de 70 anos, utilizando-se três

drogas antidiabéticas mais comumente aplicadas na clínica da Alemanha: Metformina, glimepirida e glibenclamida. (DOUROS e cols., 2015). Exatamente e por coincidência, as mesmas substâncias avaliadas no presente trabalho, do ponto de vista básico, uma vez que o acesso a essa pesquisa foi posterior.

6.2.1 METFORMINA

A metformina, um derivado de biguanida, é conhecida como o agente antidiabético de primeira linha para o tratamento, sobretudo da *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2). Essa substância reduz a resistência à insulina e diminui a concentração de glicose sanguínea, inibindo a gliconeogênese e suprimindo a produção de glicose hepática com melhora da sensibilidade à insulina no tecido periférico. Como um sensibilizador de insulina, a metformina possui ações pleiotrópicas e exerce efeitos protetores sobre múltiplos órgãos, principalmente nos tecidos alvo de insulina tais como fígado, músculo e tecido adiposo (KLIP & LEITER, 1984; SHI e cols., 2016).

Os mecanismos celulares pelos quais a metformina medeia seus efeitos antidiabéticos permanecem não elucidados, particularmente se a metformina tem uma ação protetora direta sobre a vasculatura (ZHANG e cols., 2013; TRIGGLE & DING, 2010; BOSI, 2009). Ghosh e cols. (2015) indicaram que uma exposição de 3 horas à metformina pode reverter/reduzir o impacto da hiperglicemia no endotélio, através de mecanismos ligados ao aumento da fosforilação de eNOS e Akt.

No tocante à perfusão renal acrescida de metformina, nesta pesquisa, notou-se claramente que sua adição ao líquido perfusor promoveu aumento significativo na pressão de perfusão provocado pela substância. Isso tem permitido sua participação em vários mecanismos moleculares da substância que transcendem seus efeitos hipoglicemiantes. Um trabalho recente de um grupo nacional, utilizando avaliações de diâmetro de artéria carótida demonstrou que a metformina produziu um aumento no diâmetro das carótidas e, por conseguinte, promoveu aumento no fluxo sanguíneo local (MACHADO e cols., 2012); fenômeno esse que se manifesta favorável durante o tratamento da *diabetes mellitus*.

Estudos recentes demonstraram que a metformina também desempenha, em longo prazo, outros papéis essenciais no coração e células β pancreáticas (dois órgãos importantes na regulação metabólica) onde não só protege os pacientes com DM2 acometidos de doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca, mas também restaura as atividades de secreção de insulina e protege as células β

pancreáticas da lipotoxicidade ou da glicotoxicidade (KIRPICHNIKOV *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2016).

Em seus estudos, Davis e cols (2006), observaram que concentrações crescentes de metformina atenuaram drasticamente altos níveis de glicose na associação com a proteína do choque térmico (HSP90), assim como a NO sintase endotelial (eNOS). Isso resultou no aumento da síntese de NO com uma redução na expressão de moléculas de adesão e apoptose endotelial causada por uma elevada exposição à glicose. Isso, pois, indica que a metformina pode melhorar as funções endoteliais vasculares em pacientes com diabetes, aumentando a expressão de AMPK, de HSP90 e a ativação de eNOS.

A metformina diminui a expressão do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT₁R) nas aortas de ratos e atenua a senescência vascular e a aterosclerose induzida por uma dieta rica em lipídeos (HFD), sugerindo a existência de *downregulation* do AT₁R e, pelo menos em parte, medeia o efeito protetor da metformina no sistema vascular. Estes estudos irão ainda elucidar se a metformina pode ser utilizada como uma terapia preventiva para pacientes em risco ou com complicações cardiovasculares mesmo na ausência de diabetes e sugerem que a metformina poderia ter um efeito mais amplo em outras doenças relacionadas à idade e talvez no próprio câncer (FOROUZANDEH *et al.*, 2014; PETRIE e cols., 2017). Nossos dados, contudo, revelaram que a metformina sem estimulação de agentes vasoconstritores, aumenta a pressão de perfusão quando se comparou com o grupo controle sem infusão de PHE (Figura 9), fato esse que hipotetiza algum efeito advindo da metformina que possa mimetizar alterações vasculares pró-constritoras ou por outro mecanismo desconhecido. Além disso, os resultados dessa pesquisa revelaram que o cloridrato de metformina também aumentou a resistência vascular quando infundida no sistema de perfusão à presença de fenilefrina (Quadro 5), tendo os parâmetros de fluxo de perfusato e fluxo urinário sem alterações significativas ao longo dos tempos aferidos. Em adição, quando foram experimentados anéis de aorta, a metformina potenciou o efeito pressórico da PHE, corroborando os achados nas Figuras 11 e 12.

Embora a metformina melhore anormalidades metabólicas, em ratos, como a resistência à insulina (IR), esta ação não parece estar ligada ao seu efeito sobre a função vascular. A metformina *in vivo* e *in vitro* melhorou o relaxamento induzido por ACh em ratos com IR para níveis de controle, aparentemente através de

relaxamento dependente de óxido nítrico, sugerindo que a metformina melhora a função vascular através de um mecanismo direto em vez de atenuar as anormalidades metabólicas (KATAKAM *et al.*, 2000).

O tratamento com metformina reduziu a pressão arterial sem ter qualquer efeito significativo sobre o nível de glicose no sangue, em ratos diabéticos normotensos induzidos por estreptozotocina (STZ). A contração induzida pela fenilefrina (PHE) e o relaxamento diminuído induzido por acetilcolina (ACh) em ratos diabéticos STZ foram restaurados ao normal pelo tratamento com a metformina (MAJITHIYA & BALARAMAN, 2006). O relaxamento induzido por ACh é mais intenso em ratos diabéticos STZ tratados com metformina foi bloqueado devido ao pré-tratamento com 100µM de éster metílico de L-nitro-L-arginina metiléster(L-NAME) ou 10µM de azul de metileno mas não com 10µM de indometacina (MAJITHIYA & BALARAMAN, 2006; NATALI *et al.*, 2006).

Os efeitos da metformina sobre o fluxo da artéria carótida, independentemente dos níveis plasmáticos de glicose ou alterações na pressão arterial sistólica e diastólica, provavelmente proporcionam maior proteção contra as complicações do diabetes cerebral. Sua contratilidade da ação da resistência à insulina provavelmente está implicada (MACHADO *et al.*, 2012; ANDERSEN & CHRISTENSEN, 2016). Várias análises sugeriram efeitos cárdio-protetores com uso de metformina em pacientes com doença cardiovascular, como apresentarem metabólitos de nitroxidantes reduzidos e níveis elevados de óxido nítrico (SCARPELLO & HOWLETT, 2008; BAILEY, 2008; MEANEY *et al.*, 2008).

A metformina quando associada à pioglitazona quando se comparou seus efeitos com a glimepirida, melhorou a função endotelial apesar de o controle glicêmico ter sido reestabelecido normalmente. A melhora na função endotelial foi principalmente devido à redução da resistência à insulina (PAPATHANASSIOU e cols., 2009).

6.2.2 SULFONILUREIAS

Engbersen e cols., 2012 investigaram a potência inibitória de várias sulfonilureias amplamente utilizadas nas artérias de resistência. As artérias mesentéricas isoladas e rins perfundidos isolados foram usadas para medir as respostas medicamentosas onde a glibenclamida demonstrou propriedades constritoras semelhantes em artérias renais isoladas como nos rins perfundidos e

isolados. Assim, exercem efeitos diferenciais no músculo liso vascular do músculo liso dependente de ATP e, portanto, sugere-se que a glibenclamida e a glimepirida interagiram com esses canais em concentrações terapêuticas.

A glimepirida é uma sulfonilureia de segunda geração que estimula as células β pancreáticas a liberar insulina. Este agente estimula principalmente a secreção de insulina, mas também demonstrou ter efeitos extra-pancreáticos adicionais em modelos animais (GOODMAN & GILMAN, 2012; MULLER & WIED, 1993; SATO e cols., 1993). Subjacentes aos efeitos cardiovasculares favoráveis da glimepirida são sua indução de pré-condicionamento isquêmico, supressão da taquicardia ventricular e diminuição da pressão arterial, ao contrário de outras sulfonilureias (NAKAMURA e cols., GOLDBERG *et al.*, 1996; VÉGH & PAPP, 1996).

O uso de glimepirida, quando incubada em banhos de vidro, detectou-se um aumento substancial na sensibilização do receptor α -adrenérgico nos vasos renais de rins de coelho perfundidos. Todavia, surge o questionamento do porquê isso ocorrer e essa sensibilização estar relacionada com um mecanismo de *upregulation* dos receptores, já que a fenilefrina não apresenta fenômenos de maior ou menor captação neuronal pós ou pré-sináptica. O mesmo raciocínio poderia valer para a potenciação induzida, embora em menor escala, pela metformina.

O tratamento com glibenclamida ou glimepirida demonstrou melhora significativa na lesão induzida por reperfusão em rim e pulmão. A glimepirida não tem efeito sobre a produção de ânions superóxido. No entanto, a glibenclamida induziu uma melhora significativa nessas medidas em comparação com o grupo glimepirida. Por outro lado, a suplementação de glibenclamida induziu elevação significativa nesses parâmetros. (TAWFIK *et al.*, 2009).

Hung *et al.*(2013) avaliaram o risco de eventos cardiovasculares não fatais em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) que estão tomando metformina, glimepirida ou gliburida, assim compararam as razões de incidência e risco de doença arterial coronariana, doença arterial periférica, AVC e insuficiência cardíaca entre três estudos de subcoortes. Os pacientes com DM2 que tomavam metformina e glimepirida revelaram o menor risco de eventos cardiovasculares não-fatais do que os que tomam gliburide.

Em outro trabalho, Nissen e cols. (2008), observaram que em pacientes com diabetes tipo 2 e doença arterial coronariana, o tratamento com pioglitazona resultou em uma taxa significativamente menor de progressão da aterosclerose

coronária em comparação com a glimepirida. Num estudo para se avaliar a produção de óxido nítrico nas células endoteliais da artéria coronária humana, viu-se que a glimepirida induziu a síntese de NO, ativando PI3-kinase, e também sugerindo que o uso de glimepirida na diabetes tipo 2 pode ser promissor para a prevenção da doença arterial coronariana (DAC), além de diminuir os níveis de glicose (UEBA e cols., 2007).

A habilidade de uma série de sulfonilureias em antagonizar efeitos vasorrelaxantes do agonista de canais de K^+ dependentes de ATP, como a levcromakalina, e as respostas vasoconstritoras do composto U46619 (mimético de tromboxano A_2) foram testados na artéria coronária de porcos. Os resultados obtidos indicaram que um receptor de sulfonilureia poderia estar associado ao acoplamento excitação-contração com TxA_2 (McPHERSON *et al.*, 1997; BRIETZKE, 2015).

A glimepirida parece causar menos efeitos cardiovasculares do que outras sulfonilureias. Verificou-se que ela estava associada a poucas alterações cardíacas, menos arritmias ventriculares e pouco ou nenhum efeito na pressão sanguínea em comparação com gliburida e glipizida em estudos com animais (ROSENSTOCK, 1996; MASSI-BENEDETTI, 2003; BASIT e cols., 2012). O mecanismo exato desta diferença na atividade cardiovascular ainda não está devidamente esclarecido. Entretanto, o envolvimento dos canais de potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina (KATP) pode desempenhar um papel importante nesse fenômeno (MÜLLER *et al.*, 2008; BRISCOE *et al.*, 2010).

A glimepirida quando avaliada em associação com solução de KH proporcionou, nesta pesquisa, resultados os mais interessantes durante o desenvolvimento dos protocolos experimentais. Nos grupos estudados sem a infusão de PHE, houve um aumento sustentado na pressão de perfusão (Figura 13), bem como incremento no fluxo urinário (Quadro 6) nos rins isolados. Também, foi verificado que a glimepirida teve resposta intensificada quando as preparações com anéis de aorta apontaram para o aumento da força contrátil na presença de fenilefrina (Figuras 15 e 16), ocorrência também verificada com a metformina, mas com menos potência quando se compararam os dois grupos que se apresentaram estatisticamente significantes (Figura 17).

Neste trabalho de pesquisa, no que se refere à glibenclamida, percebeu-se *ab initia* que sua administração elevava bastante a pressão de perfusão de maneira intensa e continuada, embora em algumas experiências, os picos máximos chegassem a mais de 200mmHg. Hipoteticamente, o uso de um bloqueador de

receptor de endotelina, tezosentan, infundido por 30 minutos reverteu completamente esse quadro pressórico, levando-se a acreditar fortemente, que a interação da glibenclamida com o endotélio vascular, poderia levar à liberação de endotelina. Para se ratificar essa premissa, foram comparados esses efeitos através da plotagem do gráfico comparativo das duas experiências.

A experiência com glibenclamida também mostrou, em experimentos sem a infusão de fenilefrina, aumento de todos os parâmetros fisiológicos de fluxo de perfusato, fluxo urinário e resistência vascular (Quadro 8), e isso foi demonstrado dentre todos os agentes hipoglicemiantes estudados neste trabalho. Por outro lado, apenas a resistência vascular teve significativa diferença sob análise estatística no grupo com adição de PHE (Quadro10).

A endotelina-1 (ET-1) é o vasoconstrictor mais potente conhecido, e está envolvido na regulação renal da homeostase de sal e água e quando produzida em excesso no rim, a ET-1 promove proteinúria e lesão tubulointersticial. Existe um grande interesse no uso clínico de antagonistas de receptores de endotelina em doença renal crônica, principalmente em nefropatia diabética e na hipertensão pulmonar (EGIDO e cols., 2017; LAU e cols., 2017). Um evento de *upregulation* do sistema de endotelina (ET) foi relatada em uma ampla gama de doenças cardiovasculares e renais (TRINDADE e cols., 2017).

Os efeitos de ET-1 são mediados por dois receptores acoplados à proteína G: receptores ETA e ETB. Ambos os receptores se ligam ao ET-1 com a mesma afinidade; No entanto, a ativação de cada subtipo de receptor leva a efeitos fisiológicos e fisiopatológicos opostos. Por exemplo, a sobreativação de receptores de ETA no rim promove hipertrofia renal, bem como fibrose e inflamação (KOHAN e cols., 2011, De MIGUEL e cols., 2017). Com isso, antagonistas de receptores de endotelina (como o utilizado nesse trabalho, em animais normais), podem representar uma ferramenta promissora para a renoproteção na nefropatia diabética, individualizando a terapia e mitigando o risco de insuficiência cardíaca, se estes ensaios forem positivos (GEORGIANOS & AGARWAL, 2017; HUNTER e cols., 2017)

Em um trabalho envolvendo alterações renais de uma toxina da serpente *Bothrops moojeni*, investigou-se os possíveis mecanismos envolvidos na produção desses efeitos, utilizando indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase e tezosentan, duas substâncias também utilizadas nos protocolos de perfusão renal

deste trabalho (BARBOSA e cols., 2006). O bloqueio parcial exercido pelo tratamento com indometacina mostrou que as prostaglandinas poderiam ter sido mediadores importantes dos efeitos renais no que concerne à resistência vascular e outros parâmetros fisiológicos renais (CHENG & HARRIS, 2004; SIMONSON, M.S., DUNN, M.J., 1991).

O tezosentan reduziu a lesão renal induzida pela reperfusão isquêmica aórtica em ratos onde como efeito benéfico, através da redução do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica, inibiu a infiltração de leucócitos no tecido renal e promoveu citoproteção de ação nas células tubulares renais (GUDMUNDSSON e cols., 2003; GULMEN e cols, 2009). Em nosso estudo, o tezosentan reduziu a pressão de perfusão quando infundido na presença de glibenclamida, possibilitando um efeito protetor em rim isolado de coelho no que se refere ao evento deletério pressórico do antidiabético oral.

Stanke *et al* (1998) estudaram o efeito inibitório o qual parecia seletivo para contrações induzidas por TxA_2 uma vez que a glibenclamida (30 μ M) não alterou a contração de artérias mamárias em resposta à NA e de safenas em respostas à serotonina e endotelina-1. Porém, a glibenclamida reduziu a contração induzida por endotelina-1 nas artérias mamárias internas. As contrações induzidas por endotelina-1 foram similares às inibidas por GR 32191, um antagonista de receptor de TxA_2 .

Segundo LÓPEZ-VALVERDE *et al.* (2005), a glibenclamida (10 μ M), atenuou o relaxamento hipóxico em artérias sem endotélio e aumentou a vasoconstrição hipóxica sustentada em artérias com endotélio. A contração hipóxica foi mais acentuada na endotelina em comparação com as preparações contraídas com fenilefrina na ausência de glibenclamida. Os efeitos da glibenclamida nas constrições induzidas por agonistas não são suscetíveis de serem através de uma inibição de canais K^+ sensíveis a ATP, e com constrições induzidas por U46619 e U44069. (OCHI & IKEDA, 1999; WAREING *et al.*, 2006).

6.3 ESCAPE RENOVASCULAR E TAQUIFILAXIA

O fenômeno de escape autorregulatório tem sido descrito em vários leitos vasculares onde a estimulação elétrica de nervos simpáticos ou infusão de NOR resulta num decréscimo inicial do fluxo sanguíneo que tende a ser revertido se a infusão continuar por vários minutos. Embora muitos estudos tenham sido feitos em

respostas autônomas em vasos de fígado, em apenas um foi reportado o escape autorregulatório. (HANSON, 1972; SANDOO e cols., 2010).

De acordo com Richardson e Johnson (1969), o escape difere da autorregulação, pois a segunda é limitada pela pressão, enquanto que a distribuição do escape varia com a dose testada e ocorre em qualquer variação de pressões altas de perfusão. Também se evidenciou que as prostaglandinas eram liberadas por meio de estimulação do nervo ou por infusão de norepinefrina (FONTELES & DE LIMA E FORTI, 1993). Esses efeitos foram bloqueados pela fentolamina e durante a infusão de NOR os vasos renais escaparam dos efeitos vasoconstritores. Além disso, o escape pode ser visto mesmo em profunda hipotermia a 15°C (FONTELES *et al.*, 1974)

A reatividade vascular para três ciclos de NOR infundida nos rins tratados com cada um dos antagonistas de PAF foram avaliados durante o escape vascular e taquifilaxia. Este estudo indicou significativa redução de ambos os fenômenos regulatórios promovidos por antagonistas do fator de agregação de plaquetas (PAF), sugerindo a participação dessa substância na resposta do rim de mamíferos (FERREIRA & FONTELES, 1996). Esses efeitos foram bloqueados pela fentolamina e durante a infusão de NOR os vasos renais escaparam os efeitos vasoconstritores.

De acordo com nossos resultados o escape vascular e a taquifilaxia foram eventos esperados em todos os grupos estudados, visto que ambos são fenômenos de natureza vasoativa e compensatória e possuem uma importância fisiológica significativa como mecanismos de proteção vascular às variações súbitas de tonicidade arterial (FERREIRA & FONTELES e cols., 1989). Essas flutuações pressóricas ficaram constatadas quando se analisou os efeitos das drogas antidiabéticas e todas possuíram diferenças significativas entre si e quando comparadas intergrupos. Nas três curvas de infusão de PHE dos grupos estudados, tomando-se por grupo controle os experimentos com infusão somente do agonista α_1 -adrenérgico, a metformina apresentou aumento mais evidente de escape vascular na segunda curva (Figura 23). A glimepirida o apresentou, na terceira curva como maior escape vascular quando se comparou aos demais grupos; já a glibenclamida, por sua vez, mostrou-se com o maior grau de escape vascular, na segunda curva, o que pode nos levar a supor numa possível potenciação desse evento graças à liberação de outros fatores endoteliais. Quando atuam tanto a glibenclamida quanto a fenilefrina, de maneira muito intensa e até aqui sem explicação comprobatória, o

músculo liso reage, promovendo um estímulo desse efeito na terceira curva, fato esse comprovado na Figura 23. Até os dias atuais, não é de nosso conhecimento que o fenômeno do escape vascular seja uma resposta mediada pelos muitos fatores regulatórios conhecidos, mas nenhum fator único foi comprovado até agora, sendo possível que estejamos contemplando um fenômeno multifatorial.

7. CONCLUSÕES

7.1 Este trabalho de pesquisa revelou a existência de forte interação fisiofarmacológica das drogas antidiabéticas orais infundidas em rim isolado de coelho normal sob a luz do aumento da pressão de perfusão, fluxo de perfusato e resistência vascular;

7.2 Metformina, glimepirida e glibenclamida promoveram intensos eventos de escape vascular e de taquifilaxia quando infundidos com três curvas subsequentes de fenilefrina;

7.3 Metformina e glimepirida potencializam a reatividade α -adrenérgica endotelial, fato comprovado nas infusões sem fenilefrina em solução de Krebs-Henseleit, em anéis de aorta;

7.4 A modulação farmacológica da glibenclamida em rim perfundido envolve a participação da endotelina, o mais potente agente vasoconstritor conhecido, caracterizando sua vasoconstrição na reatividade vascular;

7.5 Pela primeira vez foi demonstrado que o escape renovascular pode ser intensificado pelo efeito de agentes hipoglicemiantes como a metformina e glimepirida.

REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

AAMER, S.; JET, J.C.S.; VELDHUIJZEN, van ZANTEN.; GEORGE, S. METSIOS, D.C., and GEORGE, D. K. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **Open Cardiovasc. Med. J.** 2010; 4: 302.

ABBINK, E.J.; PICKKERS, P.; JANSEN, van ROSENDAAL A.; LUTTERMAN, J.A. TACK,C.J.; RUSSELG, S..Vascular effects of glibenclamide vs. glimepiride and metformin in Type 2 diabetic patients **Diabet Med.** 2002 Feb;19(2):136-43.

AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J.; NAKAZAKI, M. Of mice and men: K(ATP) channels and insulin secretion. **Recent Prog Horm Res.** 2001 ;56:47-68.

AIYAR, N.; GRIFFIN, E.; ALBRIGHTSON-WINSLOW, C.; FEUERSTEIN G, NAMBI P. Homologous desensitization of calcitonin gene-related peptide response in rat glomerular mesangial cells in culture. **Mol. Cell. Biochem.** 1992. Jul 6;113(1):17-23.

ALKHOURI, H.; RUMZHUM, N.N.; RAHMAN, M.M.; FITZPATRICK, M.; de PEDRO, M.; OLIVER, B.G.; BOURKE, J.E.; AMMIT, A.J. TLR2 activation causes tachyphylaxis to β_2 -agonists *in vitro* and *ex vivo*: modelling bacterial exacerbation. **Allergy.** 2014, Sep;69(9):1215-22. doi: 10.1111/all.12449. Epub 2014 Jul 3.

ALMEIDA, P.J.; CABRAL, A.D.E.M.; VASQUEZ, E.C. The endothelium as a modulator of vasomotor responses **Arq. Bras. Cardiol.**; 1993. May;60(5):347-56.

ASHCROFT, F.M., GRIBBLE, F.M. New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers. **Trends Pharmacol. Sci.** 2000, Nov;21(11):439-45.

ATKINSON, M.A.; MACLAREN, N.K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. **N Engl J Med.**, 1994. Nov 24;331(21):1428-36.

BAILEY, C.J. Metformin: Effects on micro and macro vascular complications in type 2

diabetes. **Cardiovascular Drugs Ther.** 2008;22(3):215–24.

BALDA, C. A. ; PACHECO-SILVA, A. **Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1.** Rev. Ass. Med. Brasil, 1999 v. 45, n. 2, p. 175-80.

BARBOSA, P.S.; MARTINS, A.M.; ALVES, R.S.; AMORA, D.N.; MARTINS, R.D.; TOYAMA, M.H.; HAVT, A.; NASCIMENTO, N.R.; ROCHA, V.L.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. **Toxicon.** 2006 Jun 15;47(8):831-7.

BARNES, P.J. Beta-adrenoceptors on smooth muscle, nerves and inflammatory cells. **Life Sci.** 1993. ;52(26):2101-9.

BARNETT, P. S. & BRAUNSTEIN, G. D. Diabetes melito. *in*: ANDREOLI, T. E. *et al.* **Cecil– Medicina Interna Básica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

BASIT, ABDUL, MUSARRAT RIAZ, AND ASHER FAWWAD. Glimepiride: evidence-based facts, trends, and observations. **Vasc. Health Risk Manag.** 2012; 8: 463–472.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK. **Bioquímica médica.** 3ª. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

BECKMAN, J.A.; CREAGER, M.A.; LIBBY; P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **JAMA.**, 2002, May 15;287(19):2570-81.

BEREZIN, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. **Diabetes Metab. Syndr.**, 2016. Apr-Jun;10(2 Suppl 1):S176-83.

BILLINGTON, C.K.; OJO, O.O.; PENN, R.B.; ITO, S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, 2013, Feb;26(1):112-20.

BOSI, E. Metformin-the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us, **Diabetes Obes. Metab.** 2 (Suppl) (2009) 3–8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica **Diabetes Mellitus** Secretaria de Atenção a Saúde Departamento de Atenção Básica, Serie A. Normas e Manuais Técnicos n. 16. Brasília DF, 2006.

BRISCOE, V.J.; GRIFFITH, M.L.; DAVIS, S.N. The role of glimepiride in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6(2):225–235.

BRODDE, O.E.; DAUL, A.; MICHEL-REHER, M.; BOOMSMA, F.; MAN in't VELD, A.J.; SCHLIEPER, P.; MICHEL, M.C. Agonist-induced desensitization of beta-adrenoceptor function in humans. Subtype-selective reduction in beta 1- or beta 2-adrenoceptor-mediated physiological effects by xamoterol or procaterol. **Circulation**, 1990. Mar; 81(3):914-21.

BRYAN, J.; CRANE, A.; VILA-CARRILES, W.H, BABENKO, A.P.; AGUILAR-BRYAN L. Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. **Curr. Pharm. Des.**, 2005, 11(21):2699-716.

CANO, N., Bench-to-bedside review: Glucose production from the kidney **Critical Care**, 2002. Aug; 6(4):317-21.

CARLSTRÖM, M.; WILCOX, C. S.; ARENDSHORST, W. J. Renal Autoregulation in Health and Disease. **Physiol. Rev.** 2015. Apr;95(2):405-511.

CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, Disfunção Endotelial e

Resistência à Insulina, **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 2006. Apr;50(2):304-12.

CERSOSIMO, E.A. Importância do Rim na Manutenção da Homeostase da Glicose: Aspectos Teóricos e Práticos do Controle da Glicemia em Pacientes Diabéticos Portadores de Insuficiência Renal, **J. Bras. Nefrol.**, 2004.

CHAHWALA, V.; ARORA, R. Cardiovascular manifestations of insulin resistance. **Am J Ther.** 2009 Sep-Oct;16(5):e14-28.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. e FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CHANDRAMOULI, V.; EKBERG, K.; SCHUMANN, W.; KALHAN, S.; WAHREN, J.; LANDAU, B. Quantifying gluconeogenesis during fasting. **Am. J. Physiol.** 1997. Dec;273(6 Pt 1) Dec;273(6 Pt 1).

CHEN, L.Q.; RIEDEL, G.L.; SHEPHERD, A.P. Norepinephrine release during autoregulatory escape: effects of alpha 2-receptor blockade. **Am. J. Physiol.**, 1991. Feb; 260 (2 Pt 2):H400-8.

CHENG, H.F., HARRIS, R.C. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. **Hypertension.** 2004; 43 (3), 525–530. Mar;43(3):525-30.

COLE, W.C.; McPHERSON, C.D.; SONTAG, D. ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. **Circ Res** 1991; 69: 571–581.

COSTA E FORTI, A.; FONTELES, M.C. Decreased endothelium dependent relaxation (nitric oxide) in diabetic kidneys. **Horm Metab Res.**, 1998. Jan;30(1):55-7

COSTA E FORTI, A.; FONTELES, M.C. Effect of insulin on renal vascular escape in normal and diabetic kidney. **Horm. Metab. Res.**, 1995. Jan;27(1):6-9.

COWLEY, A.W. JR. Long-term control of blood pressure. **Physiol. Ref.**, 1992.

Jan;72(1):231-300. Review

DANDONA, P.; ALJADA, A.; CHAUDHURI, A.; MOHANTY, P. Endothelial dysfunction, inflammation and diabetes. **Rev. Endocr. Metab. Dis.**, 2004. Aug;5(3):189-97.

DAVIS, B.J.; XIE, Z.; VIOLLET, B.; ZOU, M.H. Activation of the AMP- activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. **Diabetes**. 2006. Feb;55(2):496-505.

De MIGUEL, C.; HAMRICK WC; HOBBS JL, POLLOCK DM, CARMINES PK, POLLOCK JS. Endothelin receptor specific control of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the kidney. **Sci. Rep.** 2017 Feb 23;7:43152.

DELAEY, C. & VAN de VOORDE, J. Heterogeneity of the inhibitory influence of sulfonylureas on prostanoid-induced smooth muscle contraction. **Eur. J. Pharmacol.**; 1997. Apr 23;325(1):41-6.

DELAEY, C. & VAN de VOORDE, J. Prostanoid-induced contractions are blocked by sulfonylureas. **Eur. J. Pharmacol.**; 1995. Jul 4;280(2):179-84.

DeWITT, D.E, HIRSCH, I.B. Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review. **JAMA**. 2003. May 7;289(17):2254-64.

DRUCKER, D.J. The biology of incretin hormones. **Cell. Metab.** 2006. May;132(6):2131-57. Review.

EGIDO, J.; ROJAS-RIVERA, J.; MAS, S.; RUIZ-ORTEGA, M.; SANZ A.B.; GONZALEZ PARRA E, GOMEZ-GUERRERO C. Atrasentan for the treatment of diabetic nephropathy. **Expert. Opin. Investig. Drugs**. 2017 Jun;26(6):741-750.

ENGBERSEN, R.; MASEREEUW, R.; van GESTEL M.A.; SIERO, H.L.; MOONS, M.M.; SMITS, P.; RUSSEL, F.G. Differential effects of sulfonylurea derivatives on vascular ATP-sensitive potassium channels. **Eur. J. Pharmacol.** 2012. Apr 15;681(1-3):75-9.

ERTUNA, E.; YASA M. Vasorelaxant effects of glibenclamide on rat thoracic aorta. **J. Fac. Pharm. Ankara**, 2005.

FABER, J.E.; GETTES, D.R.; GIANTURCO, D.P. Microvascular effects of atrial natriuretic factor: interaction with alpha 1- and alpha 2- adrenoceptors. **Circ. Res.** 1988. Aug;63(2):415-28.

FARA, J.W.; ROSS, G. Escape from drug-induced constriction of isolated arterial segments from various vascular beds. **Angiologica**, 1972; 9(1):27-33.

FELICIO, J.S.; PACHECO, J.T.; FERREIRA,S.R.; FRIDA PLAVNIK, F.; MOISÉS, V.A.; KOHLMANN, JR, O.; RIBEIRO,A.B.; ZANELLA, M.T. Hyperglycemia and nocturnal systolic blood pressure are associated with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in hypertensive diabetic patients. **Cardiovasc. Diabetol.** 2006. Sep 12;5:19.

FERREIRA & FONTELES, 1988. Uma avaliação da participação do fator de relaxamento endotélio dependente (EDRF) e do fator de ativação de ativação de plaquetas (PAF) no escape vascular e na taquifilaxia do rim isolado de coelho. **Dissertação de Mestrado em Farmacologia– Universidade Federal do Ceará (UFC)**, 5/10/89.

FERREIRA, M.G.; FONTELES, M.C. Different classes of PAF-antagonists block norepinephrine induced vascular escape and tachyphylaxis in the isolated rabbit kidney. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, 1996. Nov;94(2):147-55.

FIGUEIREDO, I.M.B. Contribuição ao estudo do escape vascular “in vivo” em animais

hipertensos (SHR) e normotensos (WISTAR). **Tese de Doutorado em Farmacologia** – Universidade Federal do Ceará, 1995.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J. ALONSO-VALE, M. I. C. e LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.** v. 50 n. 2 p. 216-229, abr, 2006.

FONTELES, M. C.; FERREIRA, M. G. Renal Vascular Escape, **Rev. Med. UFC**, 1994.

FONTELES, M. C.; JESKE, A. H.; KAROW JR, A. M. Functional preservation of the mammalian kidney. I. Normothermia, low flow perfusion. **J. Surg. Res.** 1973. Jan;14(1):7-15.

FONTELES, M. C.; JESKE, A.H.; KAROW, A.M. JR. Vascular escape in the isolated perfused rabbit kidney. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**,1974. Jan;7(1):153-64.

FONTELES, M.C.; LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, 1982. Oct;90(3):159-61 Oct;90(3):159-61 Oct;90(3):159-61.

FONTELES, M.C.; LIMA E FORTI, C. The effect of indomethacin and reserpine on renal vascular escape. **Research Communications in Chemical Pathology and Phamacology**, 1993. Jul;81(1):103-12.

FONTELES, M.C.; MOREIRA LIMA A.A. A study of tachyphylaxis and vascular escape in the isolated rabbit kidney: effects of PGE 1. **Rev. Med. Univ. Fed. Ce**, 1984.

FONTELES, M.C.; KAROW, A.M. JR; JESKE, A.H. The effect of cold storage on the sensitivity to alpha and beta agonists in the isolated rabbit kidney. **Gen. Pharmacol.** 1976. Aug;7(2-3):195-200.

FOROUZANDEH, F.; SALAZAR, G.; PATRUSHEV, N.; XIONG, S.; HILENSKI, L.; FEI, B.; ALEXANDER, R. W. Metformin Beyond Diabetes: Pleiotropic Benefits of Metformin in Attenuation of Atherosclerosis. **J Am Heart Assoc.** 2014. Dec;3(6):e001202.

FORTI, A.C.; FONTELES, M.C. An alphasadrenotropic study of the normal and diabetic rabbit kidney. **Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie**, 1979. Dec;87(5):887-97.

GABBAY, M.; CESARINI, P. R. e DIB, S. A. Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. **Jornal de Pediatria.** 2003; v. 79, n. 3.

GAMA, M. P. R. Do milagre canadense do século XX às esperanças de cura do século XXI. **Endocr. e Diab. Clin. e Exp.** 2002 v. 2, n. 2, p. 3-5.

GHELMAN, L. G. **O cotidiano do adolescente portador de diabetes: um estudo na perspectiva fenomenológica.** Rio de Janeiro - RJ, 2009. 136 f. Tese (Doutorado em Enfermagem). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Enfermagem. Rio de Janeiro - RJ, 2009.

GHOSH, S.; LAKSHMANAN, A.P.; HWANG, M.J.; KUBBA, H.; MUSHANNEN, A.; TRIGGLE, CR. Metformin improves endothelial function in aortic tissue and microvascular endothelia I cells subjected to diabetic hyperglycaemia conditions. **Biochem. Pharmacol.** 2015, Dec. 1; 98(3): 412-21.

GNEGY, M.E.; UZUNOV, P.; COSTA. Regulation of dopamine stimulation of striatal adenylate cyclase by an endogenous Ca⁺⁺-binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1976. Nov;73(11):3887-90.

GOLDBERG, R.B.; HOLVEY, S.M.; SCHNEIDER. J. A dose response study of glimepiride in patients with NIDDM who have previously received sulfonylurea

agents. **Diabetes Care**. 1996. Aug;19(8):849-56.

GOMEZ, R.A.; NORWOOD, V.F.; TUFRO-MCREDDIE, A. Development of the kidney vasculature. **Microscopy Res Tech** 39: 254–260, 1997. Nov 1;39(3):254-60. Review.

GOO, A.K.; CARSON, D.S.; BJELAJAC, A. Metformin: a new treatment option for non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Fam. Pract.** 1996. Jun;42(6):612-8.

GROSS, J. L.; FERREIRA, S. R. G.; FRANCO, L. J.; SCHIMIDT, M. I.; MOTTA, D. G. QUINTÃO, E. e NETTO, A. P. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 44 n. 1, p. 5-32, 2000.

GUDMUNDSSON, F.F.; VISTE, A.; MYKING, O.L.; GRONG, K.; BOSTAD, L.; SVANES, K. Effects of the endothelin-1 receptor antagonist tezosentan on renal blood flow and diuresis during prolonged increased intra-abdominal pressure. **J. Surg. Res.** 2003 Nov;115(1):33-40.

GULMEN, S.; KIRIS, I.; NARIN, C.; CEYLAN, B.G.; MERMI, B.; SUTCU, R.; METEOGLU I. Tezosentan reduces the renal injury induced by abdominal aortic ischemia-reperfusion in rats. **J. Surg. Res.** 2009 Nov;157(1):e7-e13.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Regulação da osmolaridade e da concentração de sódio do líquido extracelular. **In: Tratado de Fisiologia Médica.** 11ª ed. Rio de Janeiro, ELSEVIER Ltda. Cap. 28: 358-64, 2006.

HANSON, K.M. Escape of the liver vasculature from adrenergic vasoconstriction. **Proc. Soc. Exp. Biol. And Med.**, 1972. Oct;141(1):385-90.

HARDIE, D.G. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade the key sensor of cellular energy status. **Endocrinology.** 2003; Dec;144(12):5179-83.

HENRICH, H.; LUTZ, J. Vascular escape-phenomenon in the intestinal circulation and

its induction by different vasoconstrictor agents. **Pflugers Arch.**, 1971: 329(1):82-94.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** 20 ed. Barueri SP: Manole, 2008.

HILL, M.A.; MEININGER, G.A. Arteriolar vascular smooth muscle cells: mechanotransducers in a complex environment. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 44: 1505–1510, 2012.

HUNG, Y.C.; LIN, C.C.; WANG, T.Y.; CHANG, M.P.; SUNG, F.C.; CHEN, C.C. Oral hypoglycaemic agents and the development of non-fatal cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metab Res Rev.** 2013 Nov;29(8):673-9.

HUNTER, R.W.; MOORHOUSE, R., FARRAH, T.E.; MACINTYRE, I.M.; ASAI, T.; GALLACHER, P.J.; KERR, D.; MELVILLE, V.; CZOPEK, A.; MORRISON, E.E.; IVY, JR., DEAR, J.W.; BAILEY MA, GODDARD J, WEBB DJ, DHAUN N. First-in-Man Demonstration of Direct Endothelin-Mediated Natriuresis and Diuresis. **Hypertension.** 2017 Jul;70(1):192-200.

JUST, A. Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 2007 Jan;292(1):R1-17.

JUST, A.; ARENDSHORST, W.J. Nitric oxide blunts myogenic autoregulation in rat renal but not skeletal muscle circulation via tubuloglomerular feedback. **J Physiol** 569: 959–974, 2005. Dec 15;569(Pt 3):959-74.

KAHN, S.E.; PRIGEON, R.L.; McCULLOCH, D.K.; BOYKO, E.J.; BERGMAN, R.N.; SCHWARTZ, M.W.; *et al.* Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. **Diabetes.** 1993: Nov;42(11):1663-72.

KATAKAM, P.V., UJHELYI MR, HOENIG M, MILLER AW. Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. **Hypertension**. 2000 Jan;35(1 Pt 1):108-12.

KATZUNG. B. **FARMACOLOGIA BÁSICA E CLÍNICA**. 12ª Edição. Editora Elsevier, 2014.

KIRPICHNIKOV, D.; McFARLANE, S.I.; SOWERS, JR. Metformin: an update. **Ann. Intern. Med.** 2002 Jul 2;137(1):25-33.

KLEINBONGARD, P.; SCHLEIGER, A.; HEUSCH, G. Characterization of vasomotor responses in different vascular territories of C57BL/6J mice. **Exp. Biol. Med.** 238: 1180–1191, 2013.

KLIP A¹, LEITER LA. Cellular mechanism of action of metformin. **Diabetes Care**. 1990 Jun;13(6):696-704.

KOHAN, D.E, INSCHO, E.W, WESSON, D, POLLOCK, D.M. Physiology of endothelin and the kidney **Compr. Physiol.** 2011 Apr; 1(2):883-919.

KREBS, H.A.; HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper in Hoppe-Seyler's Zeitschrift für **Physiol. Chemie.**, 1932.

KRENTZ, A.J., BAILEY, C.J. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. **Drugs** 2005: 65(3):385-411.

KUME, H.; ISHIKAWA, T.; OGUMA T.; ITO, S.; SHIMOKATA, K.; KOTLIKOFF, M.I. Involvement of Ca⁺² mobilization in tachyphylaxis to beta-adrenergic receptors in trachealis. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 2003.

KUMMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. e ASTER, J. **Patologia bases patológicas das doenças**. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LACAVAL, V.; PELLICANÒ, V.; FERRAJOLO, C.; CERNARO, V.; VISCONTI, L.; CONTI, G.; BUEMI, M.; SANTORO, D. Novel avenues for treating diabetic nephropathy: new investigational drugs. **Expert. Opin. Investig. Drugs**. 2017; Apr; 26(4):445-462.

LAI E.Y, LUO Z.; ONOZATO ML, RUDOLPH, E.H, SOLIS, G.; JOSE, P.A, WELLSTEIN, A.; ASLAM, S.; QUINN MT, GRIENDLING, K.; LE, T.; LI P, PALM F, WELCH, W.J, WILCOX, CS. Effects of the antioxidant drug tempol on renal oxygenation in mice with reduced renal mass. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. 303: F64–F74, 2012.

LANKHORST, S.; KAPPERS, M.H, van ESCH JH, DANSER, A.H, van den MEIRACKER, A.H. Mechanism of hypertension and proteinuria during angiogenesis inhibition: evolving role of endothelin-1. **J. Hypertens**. 2013 Mar; 31(3):444-54).

LAU, E.M.T.; GIANNOULATOU, E.; CELERMAJER, D.S.; HUMBERT, M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. **Nat. Rev. Cardiol**. 2017 Jun 8.

LÓPEZ-VALVERDE V.; ANDERSEN, C.U.; LAURSEN, B.E.; MULVANY, M.J.; SIMONSEN, U. Glibenclamide reveals role for endothelin in hypoxia-induced vasoconstriction in rat intrapulmonary arteries. **J. Cardiovasc. Pharmacol**. 2005 Oct; 46(4):422-9.

LUND, S.S.; TARNOW L, STEHOUWER, C.D.; SCHALKWIJK, C.G.; TEERLINK, T.; GRAM, J.; WINTHER, K.; FRANDSEN, M.; SMIDT, U.M.; PEDERSEN, O.; PARVING, H.H.; VAAG, A.A. Impact of metformin versus repaglinide on non-glycaemic cardiovascular risk markers related to inflammation and endothelial dysfunction in non-obese patients with type 2 diabetes. **Eur. J. Endocrinol.**, 2008; May; 158(5):631-41.

LUO, J; BUSILLO, J.M.; STUMM, R.; BENOVIC, J.L. G Protein-Coupled Receptor Kinase 3 and Protein Kinase C Phosphorylate the Distal C-Terminal Tail of the Chemokine Receptor CXCR4 and Mediate Recruitment of Beta-Arrestin. **Mol. Pharmacol.** 2017: Jun;91(6):554-566.

MACHADO, H.A.; VIEIRA, M.; CUNHA MR, CORREIA MR, FUKUI RT, SANTOS RF, ROCHA DM, WAJCHENBERG BL, LAGE SG, SILVA ME. Metformin, but not glimepiride, improves carotid artery diameter and blood flow in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinics (Sao Paulo)**. 2012: Jul;67(7):711-7.

MAJITHIYA, J.B.; BALARAMAN, R. Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci.** 2006 Apr 25;78(22):2615-24.

MASSI-BENEDETTI, M. Glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a review of the worldwide therapeutic experience. **Clin. Ther.** 2003 Mar;25(3):799-816.

McNAY, J.L.; KISHIMOTO, T. Association between autoregulation and pressure dependency of renal vascular responsiveness in dogs. **Circ. Res.** 24: 599–605, 1969.

McPHEE, S. J.; GANONG, W. F. **Fisiopatologia da doença: uma abordagem clínica**. 5ª. ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda. Porto Alegre, 2011.

McPHERSON, G.A.; CHOI, R.T.; KONG, D.C.; ISKANDER, M.N. The thromboxane A₂ and K(ATP) channel antagonist actions of a series of sulphonylurea derivatives in the pig coronary artery. **Eur. J. Pharmacol.**, 1997: Apr 18;324(2-3):193-200..

MEANEY, E.; VELA, A.; SAMANIEGO, V.; MEANEY, A.; ASBÚN, J.; ZEMPOALTECA, J.C, *et al.* Metformin, arterial function, intima-media thickness and nitrooxidation in metabolic syndrome: the mefisto study. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 2008: Aug;35(8):895-903.

MELANDER, A. Oral antidiabetic drugs: an overview. **Diabet. Med.** 1996: Sep;13(9 Suppl 6):S143-7.

MITCHELL, R. N.; KUMMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. e ASTER, J. C. **Robbins e Cotran fundamentos de patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MONTANI, J.P.; ANTIC, V.; YANG, Z.; DULLOO, A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. **Int. J. Obesity**. 2002: Sep;26 Suppl 2:S28-38..

MONTEIRO, A. G.; ROSÁRIO, F. e TORRE, J. B. Complicações cardiovasculares na diabetes: Prevenções Primária e Secundária nos CSP. **Rev. Port. Clin. Geral**. v. 23, n. 6, p. 627-647, 2007.

MÜLLER, G.; WIED, S.; STRAUB, J.; JUNG, C. Coordinated regulation of esterification and lipolysis by palmitate, H₂O₂ and the anti-diabetic sulfonylurea drug, glimepiride, in rat adipocytes. **Eur. J. Pharmacol**. 2008: 597(1–3):6–18.

NAKA, K.K.; PAPATHANASSIOU, K.; BECHLIOULIS, A.; PAPPAS, K.; KAZAKOS, N.; KANIOGLOU, C.; KOSTOULA, A.; VEZYRAKI, P.; MAKRIYIANNIS, D.; TSATSOULIS, A.; MICHALIS, L.K. Effects of pioglitazone and metformin on vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes treated with sulfonylureas. **Diab. Vasc. Dis. Res**. 2012 Jan;9(1):52-8.

NAKAMURA, I.; JUN-ICHI OYAMA, HIROSHI KOMODA, AYA SHIRAKI; YOSHIKO SAKAMOTO, ISAO TAGUCHI; ATSUSHI HIWATASHI, AIKO KOMATSU, MASAYOSHI TAKEUCHI, SHO-ICHI YAMAGISHI, TERUO INOUE, and KOICHI NODE. Possible effects of glimepiride beyond glycemic control in patients with type 2 diabetes: a preliminary report. **Cardiovasc. Diabetol**. 2014; 13: 15.

NASCIMENTO, N.R.; LESSA, L.M.; KERNTOPF, M.R.; SOUSA, C.M.; ALVES, R.S.; QUEIROZ, M.G.; PRICE, J.; HEIMARK, D.B.; LARNER, J.; DU, X.; BROWNLEE, M.; GOW, A.; DAVIS, C.; FONTELES, M.C. Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 2006: Jan 3;103(1):218-23.

NATALI, A.; TOSCHI, E.; BALDEWEG, S.; CASOLARO, A.; BALDI, S.; SIRONI, A.M.; YUDKIN, J.S.; FERRANNINI, E. Haematocrit, type 2 diabetes, and endothelium-dependent vasodilatation of resistance vessels. **Eur. Heart J.** 2005 Mar;26(5):464-71.

NATHAN, D.M. Initial management of glycemia in type 2 diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** 2002: Oct 24;347(17):1342-9.

NIELSEN-KUDSK, J.E.; THIRSTRUP, S. Antidiabetic sulfonylureas relax isolated rabbit coronary arteries. **Eur. J. Pharmacol.** 1991: Dec 17;209(3):273-5.

NIEMAN, D. C. **Exercício e saúde: como se prevenir de doenças usando o exercício como seu medicamento.** São Paulo: Manole, 1999.

NISSEN, S.E.; NICHOLLS, S.J.; WOLSKI, K.; NESTO, R.; KUPFER, S.; PEREZ, A.; JURE, H.; de LAROCHELLIÈRE, R.; STANILOAE, C.S; MAVROMATIS K, SAW J, HU B, LINCOFF AM, TUZCU EM. Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. **JAMA.** 2008 Apr 2;299(13):1561-73

OCHI, H., IKEDA, T. Sulfonylureas stimulate renin secretion from the perfused kidney of the rat. **Nephron.** 1999 Jan;81(1):67-71.

OHYANAJR, M.; FABER, J.E., NISHGAKI, K. Differential activation of α_1 e α_2 adrenoceptors on microvascular smooth muscle during sympathetic nerve stimulation. **Circulation Research**, 1991; V. 68, n. 1, p. 232,

OWEN, O.E.; FELIG, P.; MORGAN, A.P., *et al.* Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. **J. Clin. Invest.**, 1969: Mar;48(3):574-83.

PAGE, C; CURTIS, M. SUTTER, M.; WALKER, M.; HOFFMAN, B. **Farmacologia Integrada.** 2ª Edição. Editora Manole, 2004.

PAPATHANASSIOU, K.; NAKA, K.K; KAZAKOS N, KANIOGLOU C, MAKRIYIANNIS

D, PAPPAS K, KATSOURAS CS, LIVERIS K, KOLETTIS T, TSATSOULIS A, MICHALIS LK. Pioglitazone vs glimepiride: Differential effects on vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**. 2009 Jul;205(1):221-6.

PEREIRA, F. R. F. **Diabetes melito em pequenos animais**. Curitiba, 2006, 60 f. Monografia Graduação (Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Curitiba, 2006.

PEREIRA, L. S. R. **Diabetes mellitus do tipo 2: influência da farmacogenômica na terapêutica oral**. Algarve, 2011, 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Algarve, 2011.

PETERSEN, K.F.; PRICE, T.; CLINE, G.W.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I. Contribution of net hepatic glycogenolysis to glucose production during the early postprandial period. **Am. J. Physiol.** 1996 Jan;270(1 Pt 1):E186-91.

PETRIE, J.R.; CHATURVEDI, N.; FORD, I.; HRAMIAK, I.; HUGHES, A.D.; JENKINS, A.J.E.; KLEIN, B.; KLEIN, R.; OOI, T.C.; ROSSING, P.; SATTAR, N.; STEHOUSER, C.D.; COLHOUN, H.M. Metformin in adults with type 1 diabetes: Design and methods of reducing with Metformin Vascular Adverse Lesions (REMOVAL): An international multicentre trial. **Diabetes Obes. Metab.** 2017: Apr;19(4):509-516.

PFALTZGRAFF, E.R.; SHELTON, E.L. GALINDO, C.L, NELMS, B.L, HOOPER, C.W, POOLE, S.D, LABOSKY, P,A, BADER, D.M, REESE, J. Embryonic domains of the aorta derived from diverse origins exhibit distinct properties that converge into a common phenotype in the adult. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 69: 88–96, 2014.

PINTO, A.R. Papel da óxido nítrico sintase e das cicloxigenases 1 e 2 no escape vascular sistêmico em ratos normotensos. **Dissertação de Mestrado em Farmacologia**. Universidade Federal do Ceará, 1999.

PLUTZKY, J. Macrovascular effects and safety issues of therapies for type 2 diabetes. **Am. J. Cardiol.**, 2011: Aug 2;108(3 Suppl):25B-32B. .

QUAST, U.; COOK, N.S. Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. **Trends. Pharmacol. Sci.** 1989: Nov;10(11):431-5..

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **TRATAMENTO DO DIABETE MELITO. In: FARMACOLOGIA**, 7ª Edição. Rio de Janeiro, ELSEVIER Editora Ltda, 2012.

RAVINDRAN, S.; KURUVILLA, V.; WILBUR, K.; MUNUSAMY, S. Nephroprotective Effects of Metformin in Diabetic Nephropathy. **J. Cell. Physiol.** 2017: Apr;232(4):731-742.

REHO, J.J.; ZHENG, X.; FISHER, S.A. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 306: H163–H172, 2014.

REIS, A. F. e VELHO, G. Bases genéticas do *diabetes mellitus* tipo 2. **Rev. Bras. Endocrinol. e Metabol.**, v. 46 n. 4, ago. 2002.

REMARK, G.; HOTTENSTEIN, O. D.; JACOBSON, E.D. Primary sensory nerves are involved in neurogenic escape of the rat mesenteric circulation (abstract). 1989; **FASEBJ**. V. 3, p. A714,

RICHARDSON, D. R.; JOHNSON, P. C. Comparison of autoregulatory escape and autoregulation in the intestinal vascular bed. **Am. J. Physiol.**, 1969: Aug;217 (2):586-90.

RODRIGUES, I. K. C. **Diabetes mellitus: aspectos clínicos, farmacológicos e o papel da atenção farmacêutica ao paciente hospitalizado**. Recife - PE, 2012. 33 f. Monografia (especialização em farmácia hospitalar e clínica), Faculdade Santa Emília. Recife - PE, 2012.

ROSENSTOCK, J.; SAMOLS, E.; MUCHMORE, D.B.; SCHNEIDER, J. Glimepiride, a new once-daily sulphonylurea. a double-blind placebo-controlled study of NIDDM patients. Glimepiride Study Group. **Diabetes Care**. 1996;19:1194–1199.

RUDOMANOVA, V.; BLAXALL, B.C. Targeting GPCR-G $\beta\gamma$ -GRK2 signaling as a novel strategy for treating cardiorenal pathologies. **Biochim. Biophys. Acta**. 2017: Aug;1863(8):1883-1892.

RÜEGG, T.; CADUFF, B. Accumulation of Metformin-associated Lactic Acidosis. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, 2017: Mar;142(6):428-431.

SARTORI, E. R.; SUAREZ, W. T.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação condutométrica de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas empregando nitrato de prata como titulante **QUÍM. NOVA**, 2009.

SATO, J.; OHSAWA, I.; OSHIDA, Y.; SATO, Y.; SAKAMOTO N. Effects of glimepiride on in vivo insulin action in normal and diabetic rats. **Diabet. Res. Clin. Pract.** 1993;22:3–9

SCARPELLO, J.H.B.; HOWLETT, H.C.S. Metformin therapy and clinical uses. **Diabetes and Vascular Disease Research**. 2008;5:157–67.

SEELIGER, E.; WRONSKI, T.; LADWIG, M.; DOBROWOLSKI, L.; VOGEL, T.; GODES, M.; PERSSON, P.B; FLEMMING, B. The renin-angiotensin system and the third mechanism of renal blood flow autoregulation. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 296: F1334–F1345, 2009.

SHI, L.; TAN, G.S.; ZHANG, K. Relationship of the Serum CRP Level With the Efficacy of Metformin in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. **J. Clin. Lab. Anal.**, 2016: Jan;30(1):13-22.

SILVA, P. **FARMACOLOGIA**. 8ª Edição. Ed. Guanabara Koogan, 2010.

SIMONSON, M.S., DUNN, M.J. Endothelins: a family of regulatory peptides. State-of-the-art lecture. **Hypertension** 2, ., 1991 (6 Pt 2), 856–863

SIRTORI, C.R.; FRANCESCHINI, G.; GIANFRANCESCHI, G.; SIRTORI, M.; MONTANARI, G.; BOSISIO, E. *et al.* Metformin improves peripheral vascular flow in nonhyperlipidemic patients with arterial disease. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 1984; 6: 914–923.

SKYLER, J. S. *Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies.* **Journ. Med. Chem.**, 2004: Aug 12;47(17):4113-7.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. **Tratado de enfermagem médico - cirúrgica.** 10^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SONG, D.; ASHCROFT, F. M. Glimepiride block of cloned β -cell, cardiac and smooth muscle K_{ATP} channels. **Br. J. Pharmacol.** 2001: Mar-Apr;17(2 Suppl):11-5.

STANKE, F.; CRACOWSKI, J.L.; CHAVANON, O.; MAGNE, J.L.; BLIN, D.; BESSARD, G. DEVILLIER P. Glibenclamide inhibits thromboxane A₂-induced contraction in human internal mammary artery and saphenous vein. **Eur. J. Pharmacol.** 1998: Jan 2;341(1):65-71..

TAWFIK, M.K.; ABO-ELMATTY, D.M.; AHMED, A.A. The role of ATP-sensitive potassium channel blockers in ischemia-reperfusion-induced renal injury versus their effects on cardiac ischemia reperfusion in rats. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.** 2009: Mar-Apr;13(2):81-93..

TIKOO, K.; SHARMA, E.; AMARA, V.R.; PAMULAPATI, H.; DHAWALE, V.S. Metformin improves metabolic memory in high fat diet (HFD)-induced renal dysfunction. **J. Biol. Chem.** 2016: Aug 22. pii: jbc.C116.732990. .

TOLBERT, E.M.; WEISSTUCH, J.; FEINER, H.D.; DWORKIN, L.D. Onset of glomerular hypertension with aging precedes injury in the spontaneously hypertensive

rat. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 278: F839–F846, 2000.

TRAVIS, M.D.; WHALEN, E.J.; LEWIS, S.J.; Heterologous desensitization of beta.-adrenoceptor signal transduction *in vivo*. **Eur. J. Pharmacol.**, 1997: Jun 5;328(1):R1-3.

TRIGGLE, C.R.; DING, H. A review of endothelial dysfunction in diabetes: a focus on the contribution of a dysfunctional eNOS, **J. Am. Soc. Hypertens.** 4 (2010) 102–115.

TRINDADE, M.; OIGMAN, W, NEVES MF Potential role of endothelin in early vascular aging. **Curr. Hypertens. Rev.**, 2017 Apr 14.

TRONCOSO, C.M.; FALLET, R,W.; LANE, P.H.; CARMINES, P.K. Potassium channel contributions to afferent arteriolar tone in normal and diabetic rat kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 295: F171–F178, 2008.

UEBA, H.; KUROKI, M, HASHIMOTO, S, UMEMOTO, T, YASU T, ISHIKAWA SE, SAITO M, KAWAKAMI M. Glimepiride induces nitric oxide production in human coronary artery endothelial cells via a PI3-kinase-Akt dependent pathway. **Atherosclerosis.** 2005 Nov;183(1):35-9.

UEMURA, S.; MATSUSHITA, H.; LI, W.; GLASSFORD, A.J.; ASAGAMI, T.; LEE, K.H.; HARRISON, D.G.; TSAO, P. S. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. **Circ. Res.** 22; 88(12):1291-8. 2001.

van der MEER, .R.W.; RIJZEWIJK, L.J.; DE JONG, H.W.; LAMB, H.J.; LUBBERINK, M.; ROMIJN, J.A.; BAX, J.J.; DE ROOS, A.; KAMP, O.; PAULUS, W.J.; HEINE, R.J.; LAMMERTSMA, A,A.; SMIT, J.W.; DIAMANT, M. Pioglitazone improves cardiac function and alters myocardial substrate metabolism without affecting cardiac triglyceride accumulation and high-energy phosphate metabolism in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. **Circulation.** 2009: Apr 21;119(15):2069-77.

VÉGH, A.; PAPP, J.G. Haemodynamic and other effects of sulphonylurea drugs on the

heart. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 1996: Jul;31 Suppl:S43-53.

VERMA, S.; ANDERSON, T.J. The ten most commonly asked questions about endothelial function in cardiology. **Cardiol. Rev.**, 2001: Sep-Oct;9(5):250-2.

VIANA, M. R. e RODRIGUEZ, T. T. Complicações cardiovasculares e renais no *diabetes mellitus*. **Rev. Cienc. Med. Biol.** Salvador, v.10, n. 3, p. 290-296, set/dez, 2011

WAI-KEI CHAN, XIAOQIANG YAO, WING-HUNG KO, YU HUANG. Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta. **Cardiovasc. Res.** 2000: Apr;46(1):180-7..

WANG, C.C.L.; GOALSTONE, M.L.; DRAZNIN B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes.**, 2004: Nov;53(11):2735-40..

WAREING, M., GREENWOOD, S.L.; FYFE, GK, BAKER, PN, TAGGART, MJ. Glibenclamide inhibits agonist-induced vasoconstriction of placental chorionic plate arteries. **Placenta.** 2006 Jun-Jul;27(6-7):660-8.

WHALEN, E.J.; JOHNSON, A.K.; LEWIS, S.J. Tachyphylaxis to PACAP-27 after inhibition of NO synthesis: a loss of adenylate cyclase activation. **Am. J. Physiol.**, 1999: Nov;277(5 Pt 2):R1453-61.

YANG, Y.; SOHMA, Y.; NOURIAN, Z.; ELLA, S.R.; LI, M.; STUPICA, A.; KORTHUIS RJ, DAVIS MJ, BRAUN AP, HILL MA. Mechanisms underlying regional differences in the Ca²⁺ sensitivity of BKCa current in arteriolar smooth muscle. **J. Physiol.** 591: 1277–1293, 2013.

ZANELLA, M.T.; FREIRE, M.B.S.; MILAGRES, R.; FERREIRA, S.R.G.; BONOMO, P.P.; KOHLMANN JR, O.; RIBEIRO, A.B. Blood pressure disturbances in diabetes mellitus. **J. Hypert.**, 1992: Dec;10(7):S59-70. Review.

ZHANG,T.X.; XU J.X., PENG, F., CHAI, D.J.; LIN, J.X. Metformin reduces vascular endothelial dysfunction caused by an acute glucose load in patients with hypertension, **Blood Press.** 22 (2013) 106–113.**E**