

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
MESTRADO EM FARMACOLOGIA / ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM  
FARMACOLOGIA

ESTUDO DOS EFEITOS DO DIABETES, DA HIPOTERMIA E DO  
BLOQUEIO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE NO ESCAPE VASCULAR E  
NA TAQUIFILAXIA DO RIM ISOLADO DE COELHO

RICARDO LIRA DE OLIVEIRA

Fortaleza – Ceará  
2003

Ricardo Lira de Oliveira

ESTUDO DOS EFEITOS DO DIABETES, DA HIPOTERMIA E DO  
BLOQUEIO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE NO ESCAPE VASCULAR E  
NA TAQUIFILAXIA DO RIM ISOLADO DE COELHO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em  
Farmacologia / Área de Concentração em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial  
para obtenção do grau de mestre.

Orientador: **Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FORTALEZA – CE  
2003

O51e      Oliveira, Ricardo Lira  
             Estudo dos efeitos do diabetes, da hipotermia e do  
             bloqueio de óxido nítrico sintetase no escape vascular e  
             na taquifilaxia do rim isolado de coelho / Ricardo Lira de  
             Oliveira – Fortaleza, 2003  
             148f. : il.  
             Orientador: Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles.  
             Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do  
             Ceará. Departamento de Farmacologia e Fisiologia  
             1. *Diabetes mellitus*. 2. Escape vascular. 3. Óxido  
             nítrico. 4. Hipotermia. I Título.

CDD 616.462

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia / Área de Concentração em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Ricardo Lira De Oliveira

Dissertação aprovada em 18 /11 / 2003.

Examinadores:

---

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles  
(Orientador da Dissertação)

---

Profa. Dra. Geanne de Matos Cunha  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro  
Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho à **memória de meu querido pai, Júlio**, que me deu vida, amor e amparo nos momentos de adversidade. Jurista nato e autodidata, seu extraordinário talento profissional e sua obstinação na busca de ideais deixaram-me um legado perene de inspiração e perseverança.

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador e amigo, **Dr. Manassés Claudino Fonteles**, que detectou minha vocação, desde os tempos de monitor da disciplina de Farmacologia Clínica Aplicada à Odontologia; que me encorajou desde o princípio e pavimentou meu caminho até a concretização de um sonho, materializado nesta dissertação.
- A **minha família, especialmente meus pais**, por seu amor a mim e pelo apoio nos momentos mais decisivos de minha vida.
- Ao meu querido amigo e colaborador, o **Prof. Nilberto Robson Falcão Nascimento**, cujo altruísmo e cujo talento foram imprescindíveis à conclusão deste trabalho.
- À amiga e colega, **Dra. Marta Regina Kerntopf**, por sua imensurável bondade e sua disposição em prestar auxílio nas horas críticas; sua colaboração, também foi importante para a finalização deste trabalho.
- Às professoras, **Dra. Geanne de Matos Cunha** e **Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, por terem prontamente aceito compor minha banca de avaliação.
- Aos bolsistas **Max, Beatriz** e **Lucila**, pelas incontáveis horas de trabalho no laboratório.
- Ao funcionário **Jociê Andrade Silva**, pelos inestimáveis serviços prestados no biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas/UFC.

- Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq)**, pela ajuda financeira.
- A **todos os meus colegas de turma da pós-graduação**, pelos momentos de alegria e ajuda mútua durante o convívio em sala de aula e laboratório.
- A **todos aqueles, amigos ou colegas de trabalho**, cujos nomes eventualmente não estejam aqui explicitados, mas que, de forma direta ou indireta, cooperaram para que eu pudesse levar a termo esta dissertação.
- Às **humildes e inocentes criaturas**, cujas vidas foram imoladas em nome do avanço médico-científico e dos benefícios que ele pode prestar às pessoas, a saber, a cura de moléstias e a mitigação do sofrimento humano.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. O Endotélio e o Tônus Vascular.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Revisão de Literatura.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. <i>A via L-arginina/Óxido Nítrico.....</i>	<i>9</i>
1.2.1.1 <i>Óxido Nítrico Sintetases (NOS).....</i>	<i>14</i>
1.2.1.2. <i>Inibidores de NOS.....</i>	<i>17</i>
1.2.1.3. <i>A medição do NO.....</i>	<i>20</i>
1.2.2.1. <i>Características da L-arginina e seu papel na fisiologia humana.....</i>	<i>22</i>
1.2.2.2. <i>Transporte de L-arginina através da Membrana Celular.....</i>	<i>32</i>
1.2.3. <i>A Disfunção Endotelial no Diabetes.....</i>	<i>40</i>
1.2.4. <i>O Estresse Oxidativo.....</i>	<i>51</i>
1.2.5. <i>O Escape Vascular.....</i>	<i>66</i>
1.2.6 <i>A hipotermia.....</i>	<i>73</i>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>77</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>78</b>
<b>3.1. Sistema de perfusão.....</b>	<b>79</b>
<b>3.2. Medidas fisiológicas.....</b>	<b>80</b>
<b>3.3. Protocolo de perfusão.....</b>	<b>82</b>
<b>3.4. Produtos químicos.....</b>	<b>85</b>
<b>3.5. Análise Estatística.....</b>	<b>85</b>



<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1. Grupo Controle.....</b>	<b>87</b>
<b>4.2 Diabéticos não tratados e tratados.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3. Bloqueio de NOS e Hipotermia.....</b>	<b>102</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>5.1. Normoglicêmicos <i>versus</i> Diabéticos.....</b>	<b>117</b>
<b>5.2. Efeitos da Hipotermia e do Bloqueio de NOS.....</b>	<b>121</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>127</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>128</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	A Ach interage com receptores da célula endotelial liberando substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio (Impacto da Hipertensão no envelhecimento vascular, São Paulo: Roche, 1995).....	2
<b>Figura 2.</b>	Via L-arginina-NO, da passagem do aminoácido até o relaxamento do músculo liso da parede do vaso (modificado de Moncada e Higgs, 1993).....	12
<b>Figura 3.</b>	Quadro representativo da nomenclatura das NOS.....	17
<b>Figura 4.</b>	Inibidores de NOS: LNMMA, L-NAME e LNOARG são análogos da L-arginina, os quais competem pela Óxido Nítrico Sintetase (NOS), bloqueando a síntese do NO...	19
<b>Figura 5.</b>	Destinos Metabólicos da L-arginina.....	26
<b>Figura 6.</b>	Mecanismo postulado para a difusão facilitada: uma proteína de membrana (permease) muda de configuração ao se ligar a um determinado tipo de molécula, transportando-a ao meio intracelular a favor de um gradiente de concentração, (GUYTON e HALL, 1996).....	34
<b>Figura 7.</b>	Concentração de uma substância e capacidade de difusão através de membrana, onde ocorre difusão simples e difusão facilitada. A linha tracejada mostra o fluxo máximo.....	36
<b>Figura 8.</b>	Interconversão dos principais grupos de flavonóides. (Adaptado de DOMINGUES, 1973).....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Pressões de perfusão de rins isolados de coelhos normais e diabéticos submetidos a três infusões de NOR, (valores medidos a cada 5 min).....	90
<b>Tabela 2.</b>	Pressões basais de perfusão pela infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH 1 $\mu$ M e rutina 1 $\mu$ M (valores medidos a cada 5 min).....	92
<b>Tabela 3.</b>	Pressões basais de perfusão pela infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M) .....	94
<b>Tabela 4.</b>	Pressões máximas de perfusão pela infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M).....	96
<b>Tabela 5.</b>	Escape vascular após infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M).....	98
<b>Tabela 6.</b>	Incremento pressórico após infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M).....	100
<b>Tabela 7.</b>	Pressões de perfusão durante uma sequência de três infusões de NOR (com intervalos de 20 min) em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e tratados com L-arginina e D-arginina (ambas a 1 $\mu$ M)..<	105
<b>Tabela 8.</b>	Pressões basais de perfusão pela infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos sob hipotermia (25°C), tratados com LNMA (10 $\mu$ M), L-nitro-arginina (10 $\mu$ M), D-arginina (1 $\mu$ M) e L-arginina (1 $\mu$ M)....	107
<b>Tabela 9.</b>	Pressões máximas de perfusão pela infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos sob hipotermia (25°C), tratados com LNMA (10 $\mu$ M), L-nitro-arginina (10 $\mu$ M), D-arginina (1 $\mu$ M) e L-arginina (1 $\mu$ M).....	109

<b>Tabela 10.</b>	Escape vascular de leito arteriolar de rins isolados de coelhos após infusão contínua de NOR, submetidos a hipotermia (25°C) e a tratamento com LNMA (10µM), L-nitro-arginina (10µM), D-arginina (1µM) e L-arginina (1µM).....	111
<b>Tabela 11.</b>	Incremento pressórico após infusão contínua de NOR er leito arteriolar de rins isolados de coelhos, submetidos hipotermia (25°C) e tratamento com LNMA(10µM L-nitro-arginina (10µM), D-arginina (1µM) e L-arginin (1µM).....	113
<b>Tabela 12.</b>	Pressões máximas após três infusões de NOR (curvas 1, 2 e 3, com intervalos de 20 min entre cada uma) em leito arteriolar de rins isolados de coelhos e submetidos a hipotermia (25°C) e a tratamento com LNMA (10µM), L-nitro-arginina (10µM), D-arginina (1µM) e L-arginina (1µM).....	115

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Pressões de perfusão em rim isolado de coelho a partir dos grupos controle (euglicêmicos) e diabéticos. Efeitos da NOR infundida três vezes por 20 min, com intervalos de 20 min para lavagem. Nos animais diabéticos, as pressões basais e máximas estão bastante elevadas e as curvas apresentam maior inclinação. Além disso, nos animais normais - ao contrário dos diabéticos - é perceptível o fenômeno de taquifilaxia. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; # $p < 0.001$  (ANOVA, teste de Tukey)..... 91
- Gráfico 2.** Comparação entre as pressões de perfusão em leito arteriolar de rins isolados de coelhos e submetidos a infusão de NOR. Foram usados animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com GSH ( $1\mu\text{M}$ ) e rutina ( $1\mu\text{M}$ ). Os diabéticos não tratados apresentam pressões basal e máxima superiores às dos normoglicêmicos, além de um prejuízo no escape. O tratamento com GSH parece reduzir as pressões basal e máxima dos diabéticos, além de exibir recuperação no escape. Todavia, o tratamento com rutina não altera significativamente as pressões basais do grupo diabético, mas aumenta a reatividade vascular noradrenérgica e o escape. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.0001$  (Testes 'T' não pareados em relação ao grupo normoglicêmico).. 93
- .....
- Gráfico 3.** Comparação entre as pressões basais do leito arteriolar de rins isolados de coelhos quando submetidos a infusão de NOR. Utilizou-se um sistema de perfusão aberto com solução de Krebs-Henseleit. Constata-se que os níveis pressóricos basais acham-se elevados nos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos, sendo que o tratamento com glutathione reduzida (GSH) reduz parcialmente esse efeito, ao passo que a rutina provoca um ligeiro aumento. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo normoglicêmico \*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo normoglicêmico (ANOVA, teste de Tukey)..... 95

- Gráfico 4.** Comparação entre as pressões máximas de perfusão no leito arteriolar de rins isolados de coelhos, quando submetidos a infusão de NOR. A perfusão foi realizada em sistema aberto, com solução de Krebs-Henseleit. Em todos os grupos de animais diabéticos - inclusive naqueles tratados com glutathione reduzida (GSH) e rutina, a pressão máxima atingida é superior à do grupo de euglicêmicos. No entanto, o tratamento com GSH provoca pequena redução em relação aos diabéticos não tratados. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo normoglicêmico \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo normoglicêmico. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo normoglicêmico..... 97
- Gráfico 5.** Comparação entre os escapes vasculares do leito arteriolar renal de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, após infusão de NOR nos rins isolados e perfundidos em sistema aberto, com solução de Krebs-Henseleit. Durante a perfusão, percebeu-se uma drástica redução do escape nos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos. Por outro lado, os tratamentos com glutathione reduzida (GSH) e rutina, ambas a  $1\mu\text{M}$ , elevaram os escapes para níveis estatisticamente indistinguíveis daqueles do grupo normoglicêmico (embora o tratamento com rutina pareça intensificar o escape mais do que o tratamento com GSH). No grupo normoglicêmico, 80% dos rins perfundidos apresentaram escape, ao passo que, no grupo diabético, apenas 43%. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo normoglicêmico; teste 't' não pareado..... 99
- Gráfico 6.** Comparação entre os incrementos pressóricos do leito arteriolar renal de coelhos normoglicêmicos e diabéticos, após infusão de NOR nos rins isolados. Utilizou-se solução de Krebs-Henseleit em sistema de aberto de perfusão. Nos animais diabéticos, estando os níveis basais aumentados, observa-se uma redução no incremento pressórico relativo. Os tratamentos com GSH ( $1\mu\text{M}$ ) e rutina ( $1\mu\text{M}$ ) parecem restaurá-lo. No entanto, os dados não atingiram o nível de confiança de 95% (ANOVA). Incremento Pressórico=  $(P_{\text{max}} - P_{\text{bas}}) \cdot 100 / P_{\text{bas}}$ ..... 101

- Gráfico 7.** Pressões de perfusão em rim isolado de coelho a partir do grupo controle e dos grupos tratados com L-arginina (1  $\mu$ M) e D-arginina (1  $\mu$ M). Efeitos da NOR infundida por 20 min três vezes consecutivas, com intervalos de 20 min para lavagem. Percebe-se que, no grupo tratado com a forma 'L' do aminoácido (conhecido substrato para a síntese de NO), ocorre uma lentificação da curva pressórica, bem como uma redução drástica na pressão máxima atingida e no escape vascular nas três curvas - resultados opostos àqueles obtidos com a forma 'D' do aminoácido, a qual pode servir como falso substrato para a via do NO. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (ANOVA teste de Tukey)..... 106
- Gráfico 8.** Comparação entre as pressões basais do leito arteriolar de rins isolados de coelhos quando submetidos a infusão de NOR. Utilizou-se um sistema de perfusão aberto com solução de Krebs-Henseleit. Tanto o grupo sob hipotermia (25°C) como os tratados com análogos da L-arginina parecem apresentar pressões basais superiores às do grupo controle, sendo que apenas o tratamento com L-nitro-arginina (10  $\mu$ M) mostrou resultados estatisticamente significativos em relação ao controle. O tratamento com L-arginina (1  $\mu$ M) parece reduzir as pressões basais. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo D-arginina \*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo controle..... 108
- Gráfico 9.** Comparação entre as pressões máximas do leito arteriolar de rins isolados de coelhos quando submetidos a infusão de NOR. Utilizou-se um sistema de perfusão aberto com solução de Krebs-Henseleit. Tanto o grupo sob hipotermia (25°C) como os tratados com LNMA (10  $\mu$ M), L-nitro-arginina (10  $\mu$ M) e D-arginina (1  $\mu$ M) apresentam pressões máximas mais elevadas do que a do grupo controle. No entanto, o tratamento com L-arginina (1  $\mu$ M) reduz a pressão máxima consideravelmente. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo controle e  $p < 0.001$  em relação ao grupo D-arginina..... 110

- Gráfico 10.** Comparação entre os escapes vasculares do leito arteriolar renal de coelhos euglicêmicos, após infusão de NOR. Os rins foram isolados e perfundidos em sistema aberto com solução de Krebs-Henseleit. Os dados foram obtidos dos grupos controle, sob hipotermia (25°C) e tratados com LNMA (10 µM), L-nitro-arginina (10 µM), D-arginina (1 mM) e L-arginina (1 µM). O grupo submetido a hipotermia apresentou os escapes mais baixos de todos, ao passo que o grupo da L-arginina apresentou os valores mais elevados. Todavia, não se atingiu o nível estatístico de 95% de confiança em qualquer dos grupos se comparados ao controle (ANOVA e teste 't' não pareado)..... 112
- Gráfico 11.** Comparação entre os incrementos pressóricos de rins isolados de coelhos, perfundidos, em sistema aberto, com solução de Krebs-Henseleit e após infusão de NOR. A hipotermia (25°C) e a adição de LNMA (10µM) tendem a elevar o incremento, ao passo que os tratamentos com L-nitro-arginina (10µM) e D-arginina (1µM) parecem reduzi-lo. Todavia, o único resultado estatisticamente significativo em relação ao controle foi a redução do incremento pressórico pelo tratamento com L-arginina (1µM). Incremento Pressórico=  $(P_{max} - P_{bas}) \cdot 100 / P_{bas}$  \*\*p<0.01 em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Tukey)..... 114
- Gráfico 12.** Comparação entre as pressões máximas atingidas durante uma sequência de três infusões de NOR (curvas 1, 2 e 3) em rins isolados de coelhos, com o intuito de avaliar o fenômeno de taquifilaxia. Valores obtidos dos grupos controle, sob hipotermia (25°C) e tratados com LNMA (10 µM), L-nitro-arginina (10 µM), D-arginina (1 µM) e L-arginina (1 µM). Nenhum deles alcançou diferenças significativas (p<0,05; testes 't' pareados). No entanto, o grupo controle é o de resultados mais uniformes, registrando pequenos decréscimos na segunda e na terceira curva..... 116



**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ADMA</b>	Dimetil arginina assimétrica
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DMID</b>	Pacientes diabéticos insulino-dependentes
<b>DMNID</b>	Pacientes diabéticos não insulino-dependentes
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintetase endotelial
<b>ET</b>	Endotelina
<b>EV</b>	Escape Vascular
<b>FRDE</b>	Fator de relaxamento derivado de endotélio
<b>FRP</b>	Fluxo renal plasmático
<b>GC</b>	Guanilil ciclase
<b>GFAT</b>	Glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglicosamina
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>G-S-S-G</b>	Glutathiona oxidada
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HA</b>	Hipertensão arterial
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Oxido nítrico sintetase induzível
<b>IP</b>	Incremento pressórico
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de inositol
<b>KM</b>	Constante de meia saturação

<b>L-NAME</b>	NG-Metil-éster-nitro-L-arginina
<b>LNMA</b>	Nitro-metil-L-arginina
<b>LNMAA</b>	NG-monometil L-arginina
<b>LNOARG</b>	N(omega)-nitro-L-arginina
<b>LPS</b>	Lipopolissacárides
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintetase neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOR</b>	Noradrenalina
<b>OGT</b>	O-GlcNAc transferase
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PAF</b>	Fator de agregação plaquetária
<b>PAI</b>	Inibidor de ativador de plasminogênio
<b>PARP</b>	Poli (ADP-ribose) polimerase
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PKC</b>	Fosfato quinase C
<b>P<sub>máx</sub></b>	Pressão máxima de perfusão
<b>P<sub>mín</sub></b>	Pressão mínima de perfusão
<b>PP</b>	Pressão de perfusão
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>SHR</b>	Ratos espontaneamente hipertensos
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>TGF</b>	Fator de crescimento tumoral
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TX</b>	Tromboxano

<b>VEGF</b>	Fator vascular endotelial de crescimento
<b>VFG</b>	Velocidade de filtração glomerular
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidade máxima
<b>ZDF</b>	Ratos diabéticos obesos Zucker

## RESUMO

### **Estudo dos efeitos do diabetes, da hipotermia e do bloqueio de óxido nítrico sintetase no escape vascular e na taquifilaxia do rim isolado de coelho.**

Ricardo Lira De Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

Dissertação de Mestrado em Farmacologia – UFC, 2003

O endotélio exerce relevante papel no controle do tônus vascular, produzindo substâncias vasoativas relaxantes e constritoras – entre as primeiras, o gás óxido nítrico, produzido a partir do aminoácido L-arginina e um conjunto de enzimas chamadas óxido nítrico sintetases (NOS). Esse estudo avaliou os efeitos da L-arginina, bem como de inibidores de NOS sobre o escape vascular e a taquifilaxia de rins de coelhos. Além disso, os efeitos do diabetes e da hipotermia também foram estudados.

Rins de coelhos normais e com diabetes aloxânico foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit em um sistema aberto e a norepinefrina (NOR)  $10^{-6}$  M foi infundida por três períodos consecutivos de 20 min cada, com intervalos de 10 min para lavagem. No grupo controle, L-arginina e D-arginina foram adicionadas (ambas a  $1\mu\text{M}$ , bem como os inibidores de NOS, nitro-metil-L-arginina ( $10\mu\text{M}$ ) e n(omega)-nitro-L-arginina ( $10\mu\text{M}$ ). Esse grupo foi também submetido a hipotermia ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Os rins de animais diabéticos foram agrupados em não tratados e tratados com glutathione reduzida ( $1\mu\text{M}$ ) e rutina ( $1\mu\text{M}$ ).

O tratamento com LNOARG elevou a pressão basal ( $p<0.001$ ). O tratamento com L-arginina reduziu tanto a pressão basal ( $p<0.05$ ) como a máxima ( $p<0.01$ ). O tratamento com nitro-metil-L-arginina elevou a pressão máxima ( $p<0.05$ ). O diabetes elevou tanto a pressão basal ( $p<0.001$ ) como a máxima ( $p<0.01$ ).

Nos rins do grupo controle, a infusão de NOR promoveu uma intensa vasoconstrição, a qual foi menos intensa durante o segundo e o terceiro período de infusão – caracterizando o fenômeno de taquifilaxia. Os rins sob hipotermia exibiram taquifilaxia apenas no segundo período. Mas, o grupo tratado com L-arginina não mostrou taquifilaxia – ao contrário, os valores tornaram-se mais altos a cada período de infusão de NOR. Todavia, precisamos encarar esses resultados com reserva, pois não atingiram significância estatística ao nível desejado, ou seja,  $p<0.05$ .

O grupo diabético mostrou um escape bastante reduzido se comparado ao grupo controle ( $p<0.05$ ), mas esse efeito foi parcialmente revertido pelo tratamento com glutathione reduzida e rutina. Dentre os rins do grupo de animais euglicêmicos, aqueles tratados com L-arginina – mas não com D-arginina – exibiram um escape elevado se comparados aos do grupo controle. Contudo, esse resultado também não alcançou significância estatística, isto é,  $p<0.05$ . A hipotermia, por sua vez, mostrou uma redução no escape, novamente sem o nível de significância almejado ( $p<0.05$ ).

## ABSTRACT

### **The effects of diabetes, hypothermia and nitric oxide synthase blockade on vascular escape and tachyphylaxis in the rabbit isolated kidney.**

Ricardo Lira de Oliveira.

Mentor: Manassés Claudino Fonteles.

Master Degree Dissertation in Pharmacology-UFC, 2003

The endothelium plays a crucial role in the vascular tone, releasing relaxing and contracting factors – among the first ones the gas nitric oxide, produced from the amino acid L-arginine and a group of enzymes called nitric oxide synthases (NOS). This study evaluated the effects of L-arginine as well as NOS inhibitors on vascular escape and tachyphylaxis of rabbit kidneys. Furthermore the effects of diabetes and hypothermia were studied also.

Normal and alloxan treated diabetic rabbit kidneys were perfused with Krebs-Henseleit solution in a non-recirculating system and norepinephrine (NO)  $10^{-6}$  M was infused for three subsequent periods of 20 min each, with an interval of 10 min for drug wash-out. In the control group L-arginine and D-arginine were added to the solution (both  $1\mu\text{M}$ ) as well as the NOS inhibitors L-NMA ( $10\mu\text{M}$ ) and LNOARG( $10\mu\text{M}$ ). This group was also submitted to hypothermia ( $25^{\circ}\text{C}$ ). The kidneys from diabetic animals were separated in non treated and treated with GSH ( $1\mu\text{M}$ ) and rutin ( $1\mu\text{M}$ ).

The treatment with the NOS inhibitor LNOARG increased the basal (steady state) pressure ( $p<0.001$ ). The L-arginine treatment decreased both basal ( $p<0.05$ ) and maximal ( $p<0.01$ ) pressures (after NOR infusion). The nitro-methyl-L-arginine treatment increased the maximal pressures ( $p<0.05$ ). Diabetes increased both basal ( $p<0.001$ ) and maximal ( $p<0.001$ ) pressures.

In the control kidneys the infusion of NOR promoted an intense vasoconstriction, which was less intense during the second and the third periods of infusion- what is called tachyphylaxis. The kidneys under hypothermia showed tachyphylaxis only in the second period. But the group treated with L-arginine didn't show tachyphylaxis – instead the values became higher and higher at each period of infusion of NOR. However we should be cautious about these results since they didn't reach a  $p<0.05$  value.

The diabetic group showed a substantially decreased escape when compared to control ( $p<0.05$ ), but this effect was partially reversed by the treatment with GSH and rutin. In the kidneys from euglycemic rabbits those treated with L-arginine – but not D-arginine – showed an increased escape when compared to control. But this result wasn't significant. Hypothermia showed a decreased escape too that wasn't significant, either.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. O Endotélio e o Tônus Vascular**

O endotélio vascular tem importante função na regulação da resistência periférica e, portanto, na regulação da pressão arterial (PA) sistêmica. As células endoteliais têm participação direta nos mecanismos contráteis e relaxadores da microcirculação através da produção de substâncias vasoativas que atuam localmente, modulando o tônus das células musculares lisas da parede dos vasos adjacentes (Figura 1). A produção dessas substâncias é ativada por alterações na concentração de mensageiros intracelulares, como monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e cálcio, a partir de interações das células endoteliais com constituintes do plasma (por exemplo, plaquetas). As substâncias vasoativas podem ser classificadas em duas classes: fatores relaxantes - óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio - e fatores constritores - endotelina, tromboxano, angiotensina II e radicais oxigenados livres - do endotélio (MONCADA e HIGGS, 1993; BARRON, 1993; LOSEKANN, 1997).



**Figura 1.** A ACh interage com receptores da célula endotelial liberando substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio Impacto da Hipertensão no envelhecimento vascular, São Paulo: Roche, 1995.

O endotélio vascular também inativa substâncias vasoativas, como serotonina e bradicinina. Há evidências de desequilíbrio na síntese endotelial de vasodilatadores e vasoconstritores na gênese da hipertensão arterial (HA) sistêmica. A disfunção da célula endotelial pode causar HA pelo aumento de produção de agentes vasoconstritores, como endotelina, ou pela reduzida liberação de agentes vasodilatadores, como óxido nítrico (MONCADA e HIGGS, 1993; SELLIGMAN, *et al.*, 1994).

Outro importante mecanismo no controle da contração e relaxamento da microcirculação é a formação de ácido aracdônico, a partir de fosfolipídeos da membrana celular. A ação da ciclo-oxigenase (COX) sobre o ácido aracdônico resulta na produção de uma série de metabólitos que podem levar à vasoconstrição ou vasodilatação. Entre estes metabólitos, estão a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e o tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ).  $\text{PGI}_2$  promove vasodilatação e determina inibição da agregação das plaquetas ao endotélio e  $\text{TXA}_2$  induz vasoconstrição e agregação plaquetária, aumentando a possibilidade de fenômenos de trombose na microcirculação. O equilíbrio da produção desses metabólitos, de ações opostas, é responsável pela adequação da atividade das células endoteliais (LOSEKANN, 1997).

A temperatura também é uma variável relevante para o tônus vascular. O efeito vasoconstritor do frio é conhecido do homem desde longas datas – compressas de gelo têm sido usadas com êxito para reduzir edemas. OHATA, *et al*, 2000, mediram os níveis séricos de nitrato e nitrito em dois grupos de pacientes submetidos a circulação extra-corpórea, um com perfusão a  $28^\circ \text{C}$  e outro a  $34^\circ \text{C}$ . Os resultados demonstraram níveis significativamente mais baixos no primeiro grupo, sugerindo que a queda na produção de NO está envolvida no aumento da resistência vascular sistêmica (RVS) e,



conseqüentemente, da pressão arterial (PA), em pacientes submetidos a perfusão sob hipotermia.

Uma patologia muito comum nos países desenvolvidos, o diabetes, está claramente envolvida na disfunção endotelial. NASCIMENTO (2004), trabalhando com corpos cavernosos de coelhos com diabetes aloxânico, demonstrou um déficit da ordem de 40% no relaxamento mediado por óxido nítrico (NO), em relação ao grupo controle. Com efeito, os portadores de diabetes tipo I e II compartilham a geração deficiente de NO a partir da L-arginina. Essa deficiência reflete-se, em parte, pelas medidas diretas dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito. Diversos fatores influenciam a produção e o metabolismo do NO. Vejamos: como parte do metabolismo natural da L-arginina, certas quantidades de inibidores naturais de NOS são formados – por exemplo, a dimetil-arginina assimétrica ou ADMA. Normalmente, a ADMA não se acumula no sangue, pois é rapidamente eliminada na urina. Todavia, uma função renal comprometida, como conseqüência do envelhecimento (acima de 20% dos americanos com mais de 60 anos têm diabetes tipo II) ou por doença – o que ocorre no diabetes –, pode impedir a eliminação deste inibidor de NOS, limitando, por conseqüência, a produção de NO (BURKE, 1999). Ademais, as óxido nítrico sintetases (NOS) são enzimas dependentes

de pH, demonstrando atividade em condições ligeiramente alcalinas, mas sendo suprimidas em pH ácido (BURKE, 1999). Sabe-se que o diabetes gera uma condição denominada cetoacidose, a qual faz decrescer o pH plasmático. Essa condição pode estar entre os fatores que contribuem para a produção deficiente de NO. Uma oxigenação adequada também é necessária para a atividade das NOS. Contudo, a circulação é notadamente prejudicada no paciente diabético. Por outro lado, a hiperglicemia associada ao diabetes faz com que a glicose incorpore-se à hemoglobina. A hemoglobina glicosilada liga-se fortemente ao NO na forma de nitrosotiol (GOW, *et al.*, 1999). Retido, o NO não fica prontamente disponível para manter o relaxamento muscular. BRODSKY, *et al.*, 2001, demonstraram que a exposição aguda das células endoteliais à glicose – em níveis detectados no plasma de diabéticos - resulta em uma significativa redução nas respostas do NO a certos agonistas da eNOS, a saber, bradicinina e A-23187. Além disso, nesse mesmo trabalho, verificou-se uma acentuada redução na concentração de NO em condições de hiperglicemia. Por sua vez, OBROSOVA, *et al.*, 2003, detectaram estresse oxidativo intensificado no córtex renal de ratos diabéticos.

Em suma, acidose metabólica, baixa oxigenação e/ou acúmulo de ADMA, efeito tipo *scavenging* da glicose sobre o NO,

estresse oxidativo, bem como a ligação do NO à hemoglobina, são fatores que devem ser tomados em conta na averiguação das causas do decréscimo na síntese ou nos níveis de NO. O conjunto dessas condições pode contribuir para a precária circulação nos diabéticos. É importante frisar que o baixo metabolismo do NO em tais pacientes também é considerado por alguns pesquisadores como a causa das neuropatias periféricas comumente associadas ao diabetes.

Por último, precisamos considerar certos mecanismos mantenedores da homeostase vascular – são eles o escape vascular e a taquifilaxia. O primeiro consiste em uma redução progressiva do tônus vascular durante um estímulo pressor prolongado, como ocorre durante a infusão contínua de agonistas adrenérgicos; a segunda consiste, em sentido farmacológico amplo, na dessensibilização rápida de quaisquer receptores celulares quando submetidos a ligações repetitivas com agonistas, sendo, portanto, um fenômeno dependente da frequência do estímulo. Na área de abrangência desta dissertação, taquifilaxia representará a perda progressiva da resposta pressora dos leitos vasculares quando submetidos intermitentemente à ação de agentes vasoconstritores.

Em 1984, GREENWAY publicou importante trabalho retrospectivo que precedeu a reativação das investigações sobre o escape vascular, em leitos arteriais mesentérico e hepático (LAUTT, 1977; LAUTT, 1986).

A produção de mediadores vasoativos com possível relação com escape foi verificada por BENVENISTE, 1974, e FURCHGOTT e ZAWADSKI, 1980. O primeiro descobriu os efeitos do Fator de Ativação de Plaquetas (*Platelet-Activating Factor* – PAF) e o segundo, o Fator de Relaxamento Endotélio-Dependente ou EDRF (*Endotelium-Derived Relaxing Factor*), mais tarde identificado como equivalente ao óxido nítrico (NO).

Um estudo com leito mesentérico de gatos, submetido a estímulos elétricos nas terminações simpáticas, permitiu a FOLKOW, *et al.* (1964), observar o seguinte fenômeno – quando se aplicava o estímulo, os valores pressóricos subiam vertiginosamente, atingiam um valor limite para, em seguida, decrescerem aos níveis basais, mesmo com a manutenção do estímulo inicial. Uma seqüência de estudos investigaria o fenômeno até a década seguinte, entre eles, DRESEL e WALLENTIN, 1966; GREENWAY, *et al.*, 1967; JOHANSON, *et al.*, 1970; HANSON, 1972; LUTZ e HEINRICH, 1973;

LAUTT, 1977; LAUT e GRAHAM, 1977; FINK e BRODY, 1978; GREENWAY, *et al.*, 1967; RICHARDSON e JOHANSON, 1969; HENRICH e LUTZ, 1971; FARA e ROSS, 1972; FONTELES *et al.*, 1974; FONTELES e JESKE, 1980. Empregando técnica similar à de *Folkow* ou por meio de estímulo adrenérgico, esses pesquisadores identificaram o fenômeno de escape vascular em outros dois leitos – hepático e renal. Os trabalhos de FONTELES *et al.*, 1974 e FONTELES, *et al.*, 1980, guardam estreita relação com este trabalho, pois investigaram a ocorrência de escape sob estímulo adrenérgico em leito renal, inclusive em condições de hipotermia.

Quanto à taquifilaxia, vários mecanismos foram propostos para explicá-la: 1) alterações na afinidade do receptor celular à droga indutora; 2) diminuição do número de receptores disponíveis para a ligação; 3) aumento da disponibilidade do agonista para as células, individualmente; 4) diminuição da recaptação ou da inativação do neurotransmissor; e 5) perda do fator endotelial modificador da resposta vascular frente a determinados agonistas (O'MALLEY, *et al.*, 1986).

## 1.2. Revisão de Literatura

### 1.2.1. A via L-arginina/Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma das mais versáteis moléculas ativas do organismo. Essa pequena e simples molécula, talvez a menor de todas as produzidas pelos mamíferos, tem efeitos interessantes que vão desde a manutenção inicial da vida, através do controle da circulação placentária, ou a indução do início da vida através da regulação das contrações uterinas no trabalho de parto, até efeitos letais demonstráveis, por exemplo, no choque séptico. O óxido nítrico é um importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado, apresentando também ações endócrinas, autócrinas e parácrinas. A sua ação na imunorregulação está presente na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade. Essa molécula tem suscitado a revisão de muitos conceitos da medicina moderna, principalmente em neurologia, cardiologia, nefrologia e gastroenterologia.

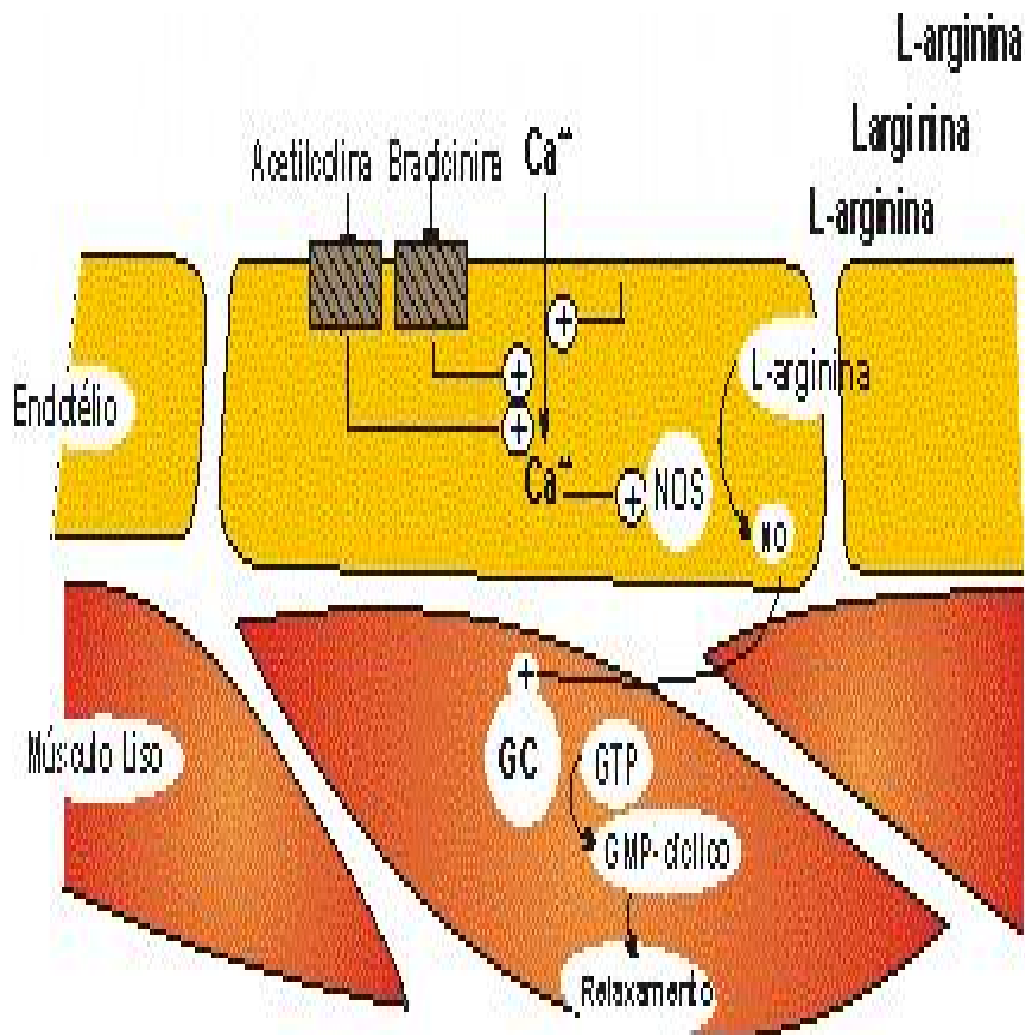
A evidência inicial de óxidos de nitrogênio no metabolismo veio de experimentos que demonstraram produção de nitratos em camundongos *germ-free* no início da década de 80 (GREEN, *et al.*,

1981). Em 1985, demonstrou-se que macrófagos ativados por lipopossacárides bacterianos eram capazes de levar à produção de nitritos e nitratos (STUHER e MARLETTA, 1985). Na seqüência, evidenciou-se que a L-arginina era o substrato e a L-citrulina era formada como co-produto (HIBBS, *et al.*, 1987). Também naquela década, FURCHGOTT e ZAWADZKI (1980), investigavam um fator vasodilatador lábil, associado ao endotélio vascular (endothelium-derived relaxing factor – EDRF ou FRDE). Na década de 1980, concluiu-se ser o óxido nítrico responsável pela atividade biológica do EDRF (IGNARRO e *et al.*, 1987; MONCADA, *et al.*, 1988). Nessa época, também identificou-se o óxido nítrico como o produto da reação de oxirredução da L-arginina (MARLETTA, *et al.*, 1988).

Até então, o NO era, apenas, conhecido como mais um poluente atmosférico. Em contraste, sua participação em vários sistemas biológicos é hoje bem documentada, incluindo regulação da PA, neurotransmissão (que pode responder por várias funções, incluindo a formação da memória), inibição da ação plaquetária, inibição da síntese total de proteínas pelo fígado e papel ainda não bem estabelecido na regulação adrenal (MONCADA, *et al.*, 1991; MONCADA e HIGGS., 1993).

NO é um gás e radical livre altamente difusível. A síntese do NO na célula endotelial do vaso permite a atividade em estruturas vizinhas, como a musculatura lisa da parede vascular, onde pode produzir relaxamento e conseqüente vasodilatação (MONCADA e HIGGS, 1993; MACALLISTER e VALLANCE, 1994). O relaxamento vascular dependente do endotélio parece diminuído em pacientes com HA essencial, sugerindo que a deficiente geração de NO possa contribuir para o desenvolvimento de níveis pressóricos elevados (BERNHEIM, 1997; FORTE, *et al.*, 1997). Tratamentos com inibidores da síntese de NO induzem resposta hipertensiva em animais, acompanhada por diminuição na excreção de sódio, que pode se tornar irreversível por dano glomerular (GABBAI, 1995). O NO é sintetizado por uma família de enzimas - as NO sintetases - a partir do aminoácido L-arginina, através de uma via metabólica denominada rota L-arginina-óxido nítrico (Figura 2). A ação das NO sintases (NOS) sobre a L-arginina leva à formação de NO e citrulina, sendo a citrulina um metabólito aparentemente inativo desta reação. O tratamento com L-arginina previne o desenvolvimento de HA em animais predispostos, causa redução rápida da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), quando o aminoácido é infundido em pessoas saudáveis e em pacientes com HA primária (MONCADA, *et al.*, 1991; MONCADA e HIGGS, 1993).





**Figura 2.** Via L-arginina-NO, da passagem do aminoácido até o relaxamento do músculo liso da parede do vaso (modificado de Moncada e Higgs, 1993)

O óxido nítrico (NO) inicia e mantém a vasodilatação através de uma cascata de eventos biológicos que culmina no relaxamento das células musculares lisas que revestem as artérias, veias e vasos linfáticos. Apesar de ser um processo um tanto complexo, a sequência de eventos que são deflagrados pelo óxido nítrico é descrita a seguir:

- O NO é sintetizado a partir da L-arginina nas células endoteliais e difunde-se até a camada de células musculares lisas dos vasos.
- Uma vez tenha alcançado a célula muscular, o NO se liga a uma enzima, a guanilil ciclase (GC), ativando-a.
- Ativada, a GC é capaz de clivar dois grupos fosfato a partir de outro composto chamado guanosina trifosfato (GTP). Isto resulta na formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), o qual é usado para fosforilar proteínas, inclusive a proteína muscular contrátil chamada miosina.
- Uma vez fosforilada, a miosina relaxa, resultando na vasodilatação; essa dilatação prossegue até que uma enzima do tipo fosfatase

dissocie o grupo fosfato da miosina (o que pode ser retardado, por exemplo, pelo sildenafil ou pela teofilina).

Além de ser um potente vasodilatador e inibidor da adesão e agregação plaquetárias, o óxido nítrico reduz a aderência de leucócitos no endotélio vascular e, também, suprime a proliferação de células da musculatura lisa vascular por inibição de fatores de crescimento. O conhecimento das NO-sintetases (NOS) é de extrema importância científica, não só para o entendimento de novos mecanismos fisiopatológicos, mas, também, por ser um alvo à descoberta de novas intervenções terapêuticas (COOKE e DZAU, 1997).

#### *1.2.1.1 Óxido Nítrico Sintetases (NOS)*

As NOS, do ponto de vista bioquímico, são uma família de enzimas complexas que catalisam a oxidação da L-arginina para formar óxido nítrico e L-citrulina. As três formas humanas da NOS identificadas até agora, eNOS (endotelial), nNOS (neuronal), e iNOS (induzida), são encontradas nos cromossomos humanos 7, 12 e 17, respectivamente, e assim foram nomeadas, com base nos tecidos nos quais foram primeiramente clonadas e caracterizadas (REES, *et al.*, 1989; COOKE e DZAU, 1997).

A atividade da NOS endotelial (eNOS) está por trás da ação do NO na regulação do tônus vascular e da função plaquetária. Sua inativação limita a contribuição do NO na homeostase dos vasos e resulta num aumento do tônus vascular e da adesão e agregação plaquetárias. A via de transdução de sinal, que leva à ativação da eNOS, no seu curso completo, encontra-se representada na figura 3, onde se observa que a atividade da eNOS é regulada pela concentração de cálcio livre intracelular e pelo complexo  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina. A eNOS é uma proteína expressa de maneira constitucional associada, predominantemente, com a fração subcelular, sugerindo que a enzima nativa é uma proteína componente da membrana. Recentes e detalhadas análises da associação da eNOS com a membrana celular, mostraram que esta enzima está localizada no Complexo de Golgi, bem como em estruturas específicas na membrana identificadas como cavéolas. A associação da eNOS com uma região da membrana plasmática, na qual estão concentradas várias chaves dos complexos de transdução de sinal (como as proteínas G), tem, provavelmente, profunda repercussão na atividade enzimática bem como na sua acessibilidade aos processos intracelulares da via de liberação do NO, incluindo processos não associados ao aumento do cálcio intracelular (SCHMIDT, *et al.*, 1994; WANG e MARSDEN, 1995; FLEMING e BUSSE, 1999).

A NOS neuronal (nNOS) está presente nas células neuronais centrais e periféricas, bem como nas células epiteliais. Sua atividade também é regulada por  $\text{Ca}^{++}$  e calmodulina. Suas funções incluem regulação duradoura da transmissão sináptica no sistema nervoso central, regulação central da pressão sangüínea, relaxamento do músculo liso e vasodilatação via nervos nitrérgicos periféricos. Tem sido envolvida também na morte de neurônios no acidente vascular cerebral (FORSTERMANN, *et al.*, 1994).

A expressão da enzima NOS induzível (iNOS) se manifesta em uma multidão de células diferentes, incluindo macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, depois de estimulação com lipopolissacárides (LPS), citocinas (como  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TFN-}\alpha$ ,  $\text{TFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-6}$ ) e outros. Por estas características tem importante papel em atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásicas (FORSTERMANN, 1995). Esta isoforma não é regulada pelo cálcio. Ela produz grande quantidade de NO que tem efeito citostático nas células alvo parasitadas via inibição de enzimas férricas, causando fragmentação do DNA. A indução da iNOS está envolvida na fisiopatologia das doenças auto-imunes e no choque séptico (FORSTERMANN, *et al.*, 1994). Há diferentes nomenclaturas

das isoformas das NOS, de modo que apresentamos um resumo dos possíveis nomes de cada isoforma.

Enzimas	Nomenclaturas
NOS endotelial	eNOS, $\alpha$ NOS, cNOS, NOS III ou NOS3
NOS neuronal	bNOS(brain), NOS I ou NOS1
NOS induzida	iNOS, NOS II ou NOS2

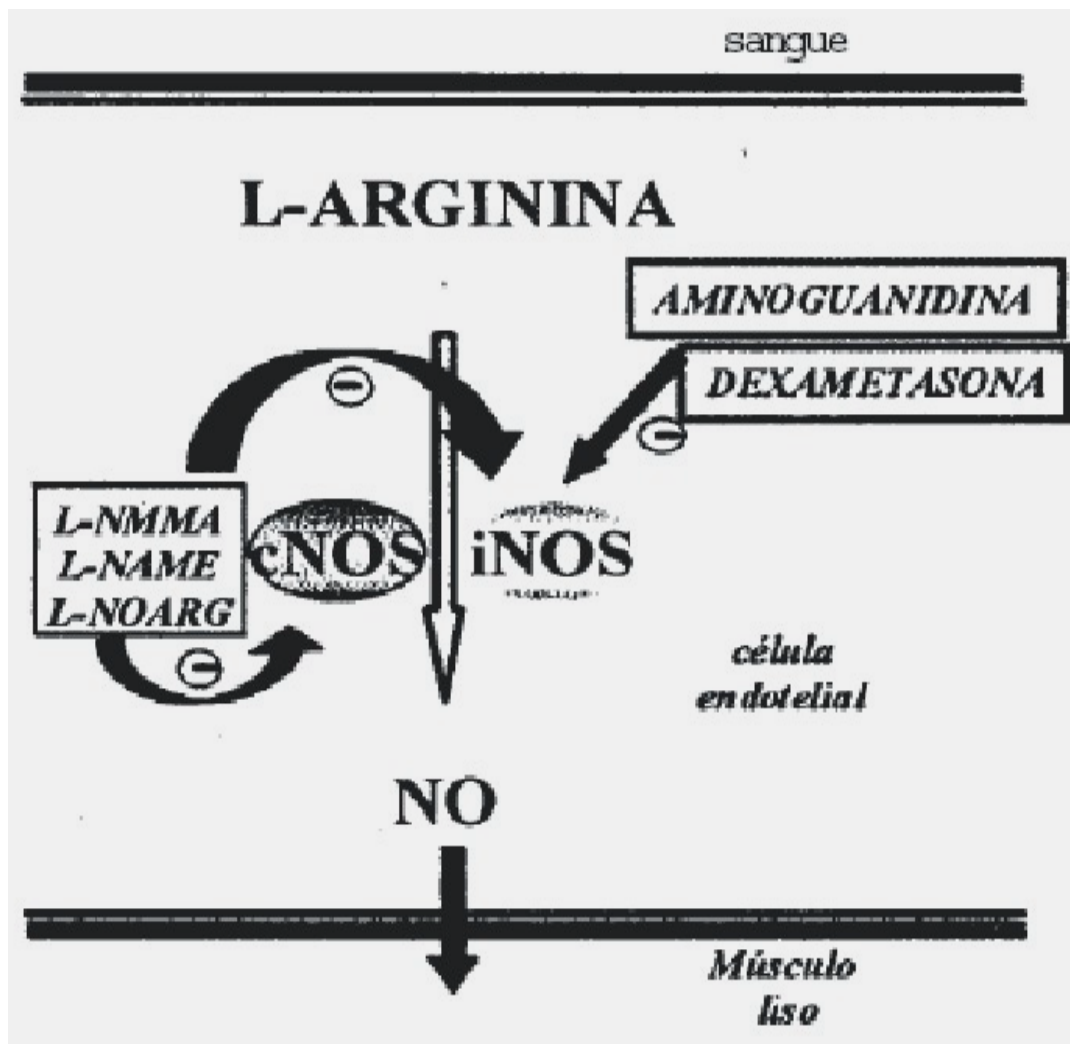
**Figura 3.** Quadro representativo da nomenclatura das NOS

#### 1.2.1.2. Inibidores de NOS

Inibidores inespecíficos são aqueles que inibem tanto a eNOS como, também, a iNOS. Sendo derivados metilados e nítricos da L-arginina, atuam por competição. Entre eles, os mais conhecidos são o L-NMMA, o L-NAME e o LNOARG (N $\omega$ -nitro-L-arginina). Como outro exemplo, pode-se mencionar a dimetilarginina assimétrica (ADMA) que é um inibidor endógeno circulante da NOS. Estudos recentes demonstraram que o nível plasmático de ADMA está positivamente relacionado a fatores de risco para aterosclerose,

sugerindo-se que este antagonista endógeno da NOS possa ser um marcador de aterosclerose (MIYAZAKI, *et al.*, 1999).

Os inibidores específicos têm afinidade pela isoforma iNOS. São eles os glicocorticóides (como a dexametasona), a aminoguanidina, a L-canavanina, a N6-(1-imioetil)-lisina e a 2,4-diamino-6-hidróxi-pirimidina. O conhecimento dos inibidores específicos das NOS é de fundamental importância para ensaios farmacológicos experimentais e terapêuticos (Figura. 4). Algumas comparações entre as atividades das diferentes isoformas são dignas de apresentação dentro da proposição da discussão dos conceitos básicos. Como já foi dito, a eNOS é uma enzima que tem sua localização associada à membrana, enquanto que as formas iNOS e nNOS são amplamente citossólicas (COOKE e DZAU, 1997). Uma outra diferença existente entre as isoformas da NOS é em relação à quantidade e a duração da produção de NO. A molécula de NO é sintetizada por um curto período de tempo (segundos a minutos) quando decorrente da ativação enzimática da eNOS ou nNOS. Em contraste, a iNOS só se expressa depois da ativação celular e então produz NO por, um relativamente longo período de tempo (horas a dias).



**Figura 4.** Inibidores de NOS: LNMMA, L-NAME e LNOARG são análogos da L-arginina, os quais competem pela Óxido Nítrico Sintetase (NOS), bloqueando a síntese do NO.



Derivados metilados da L-arginina, que incluem a N<sup>G</sup>-monometil L-arginina (LNMMA) e nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), podem acumular-se no plasma em algumas situações patológicas – como insuficiência renal aguda. A inibição das NOS por estes compostos pode, em parte, explicar a presença de HA nestas circunstâncias (MONCADA e HIGGS, 1993). Como já foi dito, o NO é um importante fator na vasodilatação homeostática e previne a agregação e adesão plaquetária.

#### *1.2.1.3. A medição do NO*

A mensuração do NO produzido e de sua atividade, pela instabilidade já descrita, é realizada de maneira indireta. Dosagens mais ou menos sofisticadas são efetuadas, desde técnicas de biologia celular e de imunocitoquímica, passando pela avaliação dos níveis intracelulares ou urinários de monofosfato 3'- 5' - cíclico de guanosina (GMPc), chegando à dosagem de nitrito, nitrato inorgânico e citrulina (MONCADA e HIGGS, 1993; GABBAI, 1995). Nitrato inorgânico é o metabólito final, estável, do NO e pode ser medido no soro ou na urina, como índice de produção de NO. A citrulina, por sua vez, é produzida juntamente com o NO, a partir da ação das NO sintetases e constitui, também, possível marcador para a produção de NO. Há, ainda,

possibilidade de dosagem de nitrito no plasma (encontrado em quantidades menores que o nitrato). Em água, ultrafiltrado e plasma, o NO é oxidado a nitrito (que é estável por várias horas). No sangue total, entretanto, nitrito é rapidamente convertido a nitrato (MONCADA e HIGGS, 1993; ROBERTS, 1993; GABBAI, 1995). Investigadores têm usado o índice nitrito/nitrato como marcador da produção de NO (GABBAI, 1995). A partir da dosagem destes metabólitos da rota da L-arginina, muitos trabalhos têm tentado mostrar a relação entre produção deficiente de NO e diversos estados fisiopatológicos. A busca do conhecimento dessa rota levou os autores à mensuração dos mais variados produtos de degradação do NO em animais de experimentação (CONRAD e VERNIER, 1989; WEINER, 1989; DENG, *et al.*, 1996; PODJARNY, *et al.*, 1997) e em humanos (NOBUNAGA, *et al.*, 1996; SCHNEIDER, *et al.*, 1996; SELLIGMAN, *et al.*, 1994; SMARASON, *et al.*, 1997). O Monofosfato 3'- 5' - cíclico de guanosina (GMPc), por exemplo, tem sido utilizado na tentativa de determinar a atividade da rota de L-arginina-óxido nítrico (SCHNEIDER, *et al.*, 1996). Por sua vez, a dosagem plasmática de L-arginina circulante já foi utilizada em algumas circunstâncias para avaliação nutricional de pacientes em diálise (REYES, *et al.*, 1994). No entanto, esse dado apenas evidencia o montante de L-arginina à disposição da célula, no meio extracelular. O transporte desse aminoácido através da

membrana pode sugerir a disponibilidade para o meio intracelular, que é onde ocorre a ativação da rota que chega à produção de NO.

#### *1.2.2.1. Características da L-arginina e seu papel na fisiologia humana*

L-arginina é um aminoácido básico de ocorrência natural, o qual participa de muitas reações bioquímicas associadas à fisiologia normal do organismo. Encontrada na maioria das proteínas que consumimos em nossa dieta diária, a L-arginina tanto pode ser metabolizada para favorecer a síntese de glicose como pode ser degradada para produzir energia, a depender das necessidades do corpo. Além de ser requerido para a síntese protéica e inúmeras outras reações, esse aminoácido é também conhecido como precursor imediato da substância vasodilatadora encontrada nos vasos arteriais – o fator de relaxamento derivado de endotélio (FRDE). O óxido nítrico não deve se confundido com o óxido nitroso ( $N_2O$ ), também conhecido como gás hilariante (MAHER, 1994).

O uso de aminoácidos individuais como agentes terapêuticos ou suplemento alimentar tem se tornado muito popular. Associado a esse uso está o desejo pelos supostos efeitos que a terapia com aminoácidos possa proporcionar. Todavia, para a maioria dos

aminoácidos, toxicidades potenciais podem se manifestar como resultado de desequilíbrio nutricional (MAHER, 1994). Como as dietas conhecidas ao público normalmente não expõem as pessoas a tal desequilíbrio, deve-se ter cautela quanto à implementação de regimes alimentares a longo prazo, pois certos efeitos súbitos podem escapar à detecção inicialmente. Como em toda farmacoterapia, os efeitos benéficos do uso de L-arginina precisam ser avaliados frente aos potenciais riscos. Apenas mediante o conhecimento de ambos os fatores – benefício e risco – uma decisão quanto ao uso deste aminoácido pode ser tomada pelo paciente (MAHER, 1994).

A L-arginina é tradicionalmente classificada como aminoácido não essencial em adultos porque pode ser sintetizada endogenamente a partir da L-citrulina. Todavia, em crianças muito pequenas e em outras situações caracterizadas pela rápida proliferação tissular – como após infecções ou trauma –, a síntese endógena de L-arginina pode não ser suficiente para atender à demanda por esse aminoácido. Assim, a L-arginina pode ser classificada como “semi-essencial” em certos episódios (REYES, *et al.*, 1994).

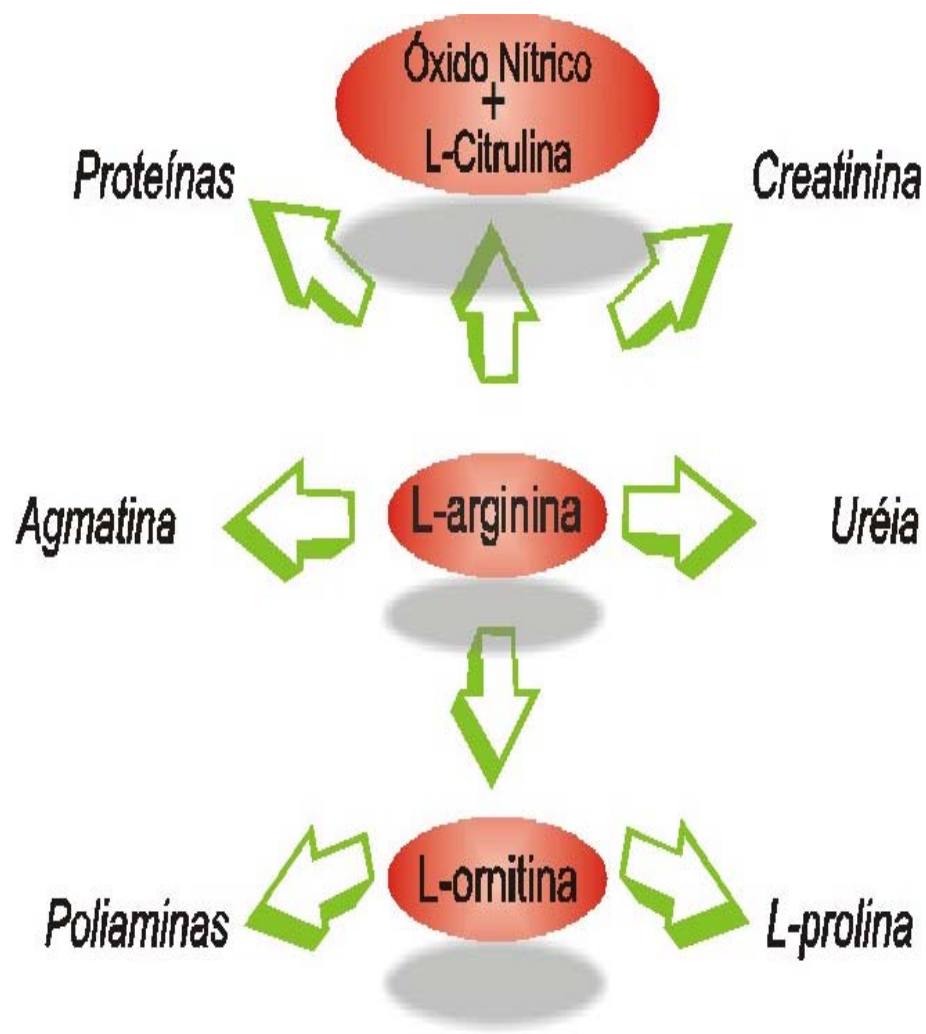
Boa parte da síntese endógena da L-arginina a partir da L-citrulina ocorre nos túbulos proximais do rim. Aí ela ocorre de modo a

reagir, via ciclo de Krebs, com a amônia oriunda do metabolismo dos compostos nitrogenados – convertendo-a na prontamente excretável e pouco tóxica uréia (PETERS e NOBLE, 1996). Sem essa via metabólica, a amônia acumular-se-ia nos tecidos, ocasionando injúrias. Como evidência da importância da inclusão de L-arginina na nutrição, dietas experimentais pobres em L-arginina resultam em rápido aumento na amonemia. Uma porção menor de L-arginina ocorre no fígado, mas a maior parte dela é metabolizada subsequente pela arginase hepática, raramente alcançando a circulação sanguínea.

A L-arginina normalmente corresponde a cerca de 5-7 % do total de aminoácidos presentes na dieta típica de um adulto saudável. Embora algumas proteínas encontradas nos alimentos possam conter níveis ligeiramente mais altos deste aminoácido que outras, há pouca diferença entre as proteínas mais completas nesse respeito. A L-arginina distribuída via trato gastrointestinal é absorvida no jejuno e íleo. Um sistema específico de transporte – o sistema y<sup>+</sup>, do qual falaremos posteriormente - facilita o processo e também é responsável pelo transporte de outros aminoácidos básicos, L-lisina e L-histidina. Cerca de 60% da L-arginina absorvidos são metabolizados pelas células gastrointestinais, de modo que apenas 40% alcançam a circulação sanguínea. A natureza parece ter ‘projetado’ a maioria das

proteínas de tal modo que uma relativamente balanceada mistura está presente nelas, ou seja, a única maneira de suprir um indivíduo seletivamente de L-arginina seria suplementando sua dieta com esse aminoácido (MAHER, 1994).

Além de seu papel como componente de muitas proteínas, a L-arginina têm diversos outros destinos metabólicos, como mostra a figura 5.



**Figura 5.** Destinos Metabólicos da L-arginina

Ao passo que muito interesse foi desenvolvido pela via nitrérgica, é importante frisar que uréia, L-ornitina, L-prolina, L-glutamato e poliaminas tais como a putrecina também são produzidos a partir da L-arginina. A creatina - composto de armazenamento de grupos fosfato altamente energéticos – é formada da L-arginina e é essencial à contração muscular. A reação de descarboxilação da L-arginina (via L-arginina descarboxilase) produz agmatina, a qual se sabe interagir com mesmos receptores a que se ligam os agentes anti-hipertensivos centrais, como a clonidina (LI, *et al.*, 1994). Existe, pois, a possibilidade de que parte do efeito anti-hipertensivo observado nos tratamentos com L-arginina poderia ser resultado da ação da agmatina nos centros regulatórios cardiovasculares.

A L-arginina também é protagonista no processo de secreção de importantes hormônios. Estes incluem hormônio do crescimento (GH), insulina, glucagon, aldosterona, somatostatina e catecolaminas adrenais (PETERS e NOBLE, 1996). Por exemplo, a administração de 30g de L-arginina EV é usada rotineiramente para diagnosticar a incompetência da hipófise em secretar GH. Além disso, há uma série de condições fisiopatológicas que respondem ao tratamento com L-arginina, tais como angina pectoris, arterioscleriose, doença arterial coronariana, hipercolesterolemia, hipertensão, câncer de mama,



nefroesclerose associada ao diabetes melito e esterilidade associada à oligospermia (BOGER, *et al.*, 1998; LERMAN, *et al.*, 1998; PARK, 1992; SANDERS, 1995; KLAHR, 1999; SCHACHTER, *et al.*, 1973).

Em estudos, nos quais administra-se cloridrato de L-arginina parenteralmente, tem se verificado acidose metabólica e alterações em alguns eletrólitos (potássio, por exemplo). No entanto, isto só se verifica com superdosagens do cloridrato administradas parenteralmente, não se seguindo à administração de doses mais modestas pela via oral. Dos estudos disponíveis sobre a administração oral de L-arginina a humanos, poucos relatam efeitos adversos após tratamento agudo ou crônico. Um caso em 1992 demonstrou a duplicação da taxa de síntese de proteínas tumorais em pacientes com câncer de mama que receberam 30g/dia de L-arginina durante 3 dias (PARK, *et al.*, 1992). Todavia, numerosos estudos anteriores (TACHIBANA, *et al.*, 1985; BARBUL, 1986) e posteriores (BRITTENDEN, *et al.*, 1994; HEYS, *et al.*, 1998) àquele relato falharam em reproduzir tais achados. Com base em sua farmacologia, a L-arginina tanto pode ter atividades pró como anti-tumor. Por outro lado, levando-se em conta que os efeitos desse aminoácido em pacientes com atividade tumoral maligna não são bem compreendidos, deve-se exercer extrema cautela quanto a suplementá-lo na dieta. Doses de

até 30g/dia têm sido geralmente bem toleradas, raramente apresentando sintomas adversos como náusea ou diarreia. Nenhuma alteração na função hepática, na glicemia ou na concentração plasmática de eletrólitos tem sido observada. Um estudo com 9 g/dia relatou um paciente com lesões recorrentes de herpes labial, as quais regrediram após a interrupção do uso da L-arginina. Em um estudo recente com 24 pacientes com hipercolesterolemia que receberam 14 g diárias por 12 semanas, não se detectaram alterações na insulina plasmática, hormônio do crescimento (GH) nem em diversas outras substâncias presentes no plasma. Tampouco se notaram alterações nos parâmetros hematológicos, exceto um pequeno aumento na uremia (TANGPHAO, *et al.*, 1999). Não houve relatos sobre quaisquer efeitos adversos nesse estudo. L-arginina (9 g diárias) administrada por 6 meses a pacientes anginosos não parece ter causado qualquer efeito indesejável (LERMAN, *et al.*, 1998).

Um estudo recente utilizou um suplemento alimentar contendo L-arginina (6 g diários) durante 7 dias a 43 pacientes com hipercolesterolemia, demonstrando boa tolerância e respostas vasodilatadoras. Este produto consistia em um suplemento alimentar contendo vitaminas B6, B12, C, E, folato e niacina, associados a proteínas. O produto pareceu altamente eficaz em promover saúde

cardiovascular e nenhum efeito adverso foi relatado (MUELLER, 1999).

Como resultado do papel fisiológico do NO no sistema cardiovascular, uma série de precauções e contra-indicações ao uso L-arginina deve ser considerada. Em razão do efeito vasodilatador do NO associado ao choque séptico, pacientes com infecções severas provavelmente não devem receber L-arginina. Como o NO é capaz de promover angiogênese, pacientes com retinopatia diabética também não devem receber L-arginina. Como descrito acima, pacientes com tumores ativos devem evitar suplementação de L-arginina. Já que os estudos anteriormente relatados falham em documentar sérios efeitos adversos associados ao uso suplementar desse aminoácido, há a necessidade de mais estudos que possam detectar toxicidades súbitas. Na falta de experimentos especialmente voltados a este tema, deve haver cautela no uso de L-arginina em crianças, grávidas, lactentes, idosos e aqueles com a função renal ou hepática seriamente comprometida (MUELLER, 1999).

Produtos à base de L-arginina estão disponíveis como suplementos dietéticos, normalmente na forma de cápsulas e tabletes. Recentemente, um novo produto foi desenvolvido. Trata-se de uma

associação do aminoácido a uma série de antioxidantes, vitaminas e fibras os quais podem proporcionar benefícios a pacientes com doença cardiovascular ou outras (MUELLER, 1999).

#### 1.2.2.2. Transporte de L-arginina através da Membrana Celular

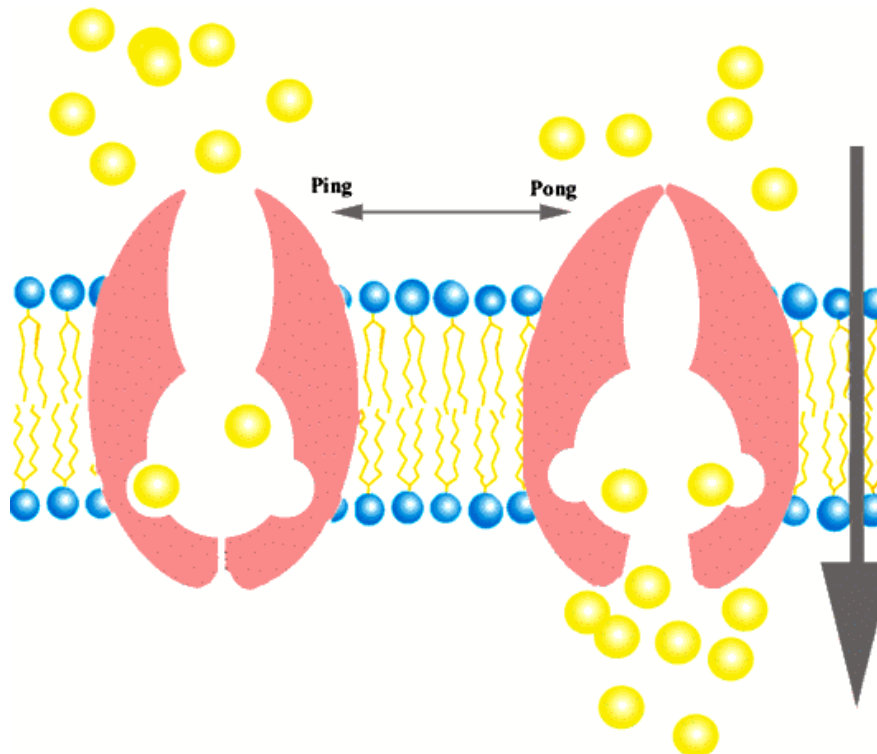
A célula é a unidade funcional de todos os organismos vivos e cada célula é cercada por uma membrana plasmática. Essa membrana é seletivamente permeável, contendo proteínas especializadas no transporte de substâncias para dentro e para fora, de maneira a manter adequado equilíbrio com o meio. Algumas propriedades da membrana dependerão das diferentes funções especializadas da célula (FERVENZA, 1990; ALBERTS, *et al.*, 1994; GUYTON e HALL, 1996). Estas propriedades poderão estar alteradas em diferentes doenças, ajudando a identificá-las adequada e, talvez, precocemente. Situações como hipertensão arterial (HA), uremia e transplante renal têm sido estudadas, evidenciando disfunções celulares e defeitos no transporte de membrana, prováveis fatores envolvidos na patogênese dessas entidades (FERVENZA, 1989; FERVENZA, 1990; OLLOFOSSON, 1995; MENDES, *et al.*, 1997).

A membrana celular é a barreira que controla a passagem de moléculas entre a célula e seu meio. Esta função de barreira é crucial para permitir que a célula mantenha a concentração interna de solutos, que é diferente do compartimento extracelular. Ela é composta de uma camada lipídica, na qual as proteínas estão embebidas junto com

pequena quantidade de carboidratos, tendo uma grande quantidade de funções, além de barreira física. Permite o transporte seletivo de substratos, promove a transmissão de sinais químicos e provê um ambiente adequado às funções intracelulares (ALBERTS, *et al.*, 1994). Transporte de íons inorgânicos e pequenas moléculas orgânicas, através da camada lipídica, é realizado por proteínas especializadas, cada qual com responsabilidade de transferir um íon específico, molécula ou grupo de íons e moléculas. As células podem transferir macromoléculas e mesmo grandes partículas através de suas membranas, mas o mecanismo envolvido, na maioria dos casos, é diferente. A presença de sistemas de transporte especializados possibilita que as células estabeleçam ajustes homeostáticos, quando das mudanças do meio externo e interno (FIGUEIREDO, 1995).

A passagem através da membrana celular ocorre por dois processos básicos: difusão (também chamado de transporte passivo) e transporte ativo. Embora existam variações desses dois mecanismos básicos, difusão é a passagem de substâncias - molécula a molécula - pelos espaços intermoleculares da membrana ou em combinação com uma proteína transportadora. A energia que produz a difusão é a do movimento cinético da matéria. Nos mecanismos de transporte ativo, há exigência de uma fonte adicional de energia para criar e manter

gradientes iônicos, permitindo que a célula ajuste seu meio interno (GUYTON e HALL, 1996).



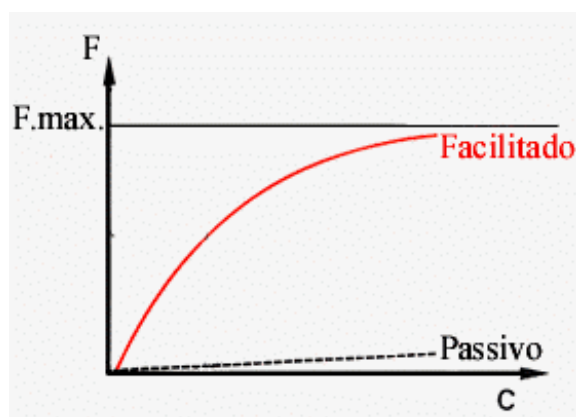
**Figura 6.** Mecanismo postulado para a difusão facilitada: uma proteína de membrana (permease) muda de configuração ao se ligar a um determinado tipo de molécula, transportando-a ao meio intracelular a favor de um gradiente de concentração (GUYTON e HALL, 1996).

Transporte passivo pela membrana pode se dar por difusão simples ou facilitada, como ilustra a figura 6. Na difusão simples, a passagem ocorre pelos espaços intermoleculares da membrana, por movimento cinético das moléculas ou íons, sem necessidade de fixação a proteínas da membrana. A difusão facilitada exige a interação de proteína transportadora e diferença de gradiente. A L-arginina é transportada por difusão facilitada (AVILA-CHAVEZ, 1997; DEVES, *et al.*, 1992; MENDES, *et al.*, 1997). O processo pelo qual um sistema de transporte transfere moléculas através da membrana envolve um transportador com sítios específicos para essa molécula. Quando todos os sítios estão ocupados e todos os carregadores saturados, a taxa de transporte, através da membrana, é máxima para esta molécula, e a essa taxa denominamos  $V_{\text{máx}}$ . Em adição, cada carregador tem uma característica de ligação, constante com seu substrato, denominada  $K_M$ . O  $K_M$  é igual, para uma determinada concentração de substrato, ao valor encontrado quando a taxa de transporte atinge metade do seu nível máximo:  $K_M$  é a constante de meia saturação (ALBERTS, *et al.*, 1994; FERVENZA, 1990; DEVES, *et al.*, 1992; DEVES e BOYD, 1998).

Os processos de transporte facilitado transmembrana ocorrem através de proteínas. No caso da L-arginina, sabe-se haver



dois sistemas de transporte estabelecidos:  $y^+$  e  $y^+ L$ . A função desses transportadores pode ser avaliada de forma análoga à função de enzimas. Emprega-se cinética enzimática através da fórmula de Michaelis-Menten (ELLORY e YOUNG, 1982; DEVES, *et al.*, 1992; DEVES e BOYD, 1998).



**Figura 7.** Concentração de uma substância e capacidade de difusão através de membrana, onde ocorre difusão simples e difusão facilitada. A linha tracejada mostra o fluxo máximo.

Os mecanismos de transporte transmembrana têm despertado o interesse dos pesquisadores há várias décadas. Sabe-se, há décadas, da permeabilidade da membrana de eritrócitos para aminoácidos (LUCIO, *et al.*, 1991). FERVENZA em 1990 descreveu

detalhado estudo de sistemas de transporte de membrana na insuficiência renal, usando como modelo o eritrócito. Sabe-se, também, que os glóbulos vermelhos podem conter aminoácidos em concentrações mais altas do que o meio extracelular (ELLORY e YOUNG, 1982). ELLORY, *et al.* 1982, estudaram sistemas de transporte para aminoácidos em eritrócitos. Sistemas de transporte através da membrana celular podem acumular aminoácidos contra gradiente de concentração; as propriedades cinéticas não podem ser explicadas por difusão passiva (ELLORY, *et al.*, 1982). WINTER e CHRISTENSEN em 1964, descreveram dois sistemas saturáveis de captação de aminoácidos; um para aminoácidos neutros e outro, de baixa capacidade, para alanina e glicina. CHRISTENSEN, *et al.* (1948) descreveram sete sistemas de transporte para aminoácidos, mas somente cinco estão presentes em eritrócitos humanos. Os cinco sistemas, bem caracterizados e cineticamente analisados são;  $y^+$ , ASC, gly, L e T. Um novo sistema, denominado  $y^+L$ , foi descrito, em 1992, em eritrócitos humanos, com alta afinidade por lisina e leucina (DEVES, *et al.*, 1992).

Experimentos demonstraram que a rota biossintética do NO está condicionada ao suprimento de arginina extracelular (PALMER, *et al.*, 1988), de modo que o transporte deste aminoácido é

transitoriamente sobre-regulado por agonistas da produção de NO (BOGLE, *et al.*, 1991). A velocidade de captação é variável e o mecanismo por trás de um influxo aumentado de arginina ao citoplasma pode estar ligado a uma hiperpolarização de membrana induzida por agonistas.

Os métodos para monitorar o rápido influxo de arginina nas células endoteliais são úteis para avaliar o ritmo de produção do NO. O transportador de aminoácidos é inibido por outros aminoácidos catiônicos e assemelha-se ao sistema  $y^+$  identificado em outros tipos celulares. Análogos da arginina - incluindo L-NMMA e L-NAME - inibem as NO sintases (NOS). Todavia, a L-NMMA também inibe o transporte de L-arginina, ao passo que L-NAME não é capaz de fazê-lo. Por outro lado, bradicinina e ATP estimulam simultaneamente o transporte de L-arginina e a liberação de NO via NOS constitutiva. Muito embora o transporte de L-arginina e a geração de NO – estimulados por agonistas – não estejam acoplados diretamente, um aumento no suprimento do aminoácido pode prover um mecanismo para geração sustentada de NO. Evidências recentes sugerem que eNOS, o sistema  $Y^+$  e MAP quinases estão co-localizados no complexo de cavéola associado à plasmalema de células endoteliais.

Experiências com macrófagos revelaram que a captação dos inibidores de NOS L-NMA e L-NNA é mediada por dois mecanismos diferentes. A ativação dessas células mediante citocinas resulta em uma sobre-regulação da captação de L-NMA, mas não afeta o transporte de L-NNA. A caracterização dos sítios de transporte revelou que a captação da primeira ocorre por meio de um transportador de aminoácido catiônico (sistema y<sup>+</sup>), enquanto que um transportador de aminoácido neutro (sistema L) contribui para a captação da segunda (SCHMIDT, KLATT e MAYER, 1994).

O sistema y<sup>+</sup> é específico e carrega aminoácidos básicos, como L-lisina e L-arginina (HENDRY, 1992). É um sistema seletivo, de baixa afinidade e alta capacidade, que pode ser identificado em eritrócitos humanos e de carnívoros (SILVER, *et al.*, 1996). O sistema y<sup>+</sup>L, de alta afinidade e baixa capacidade, é o segundo sistema responsável pelo transporte de L-lisina e L-arginina (DEVES, *et al.*, 1992). Resumindo: o transporte de L-arginina ocorre primariamente via transportador de aminoácido y<sup>+</sup>, é saturável (acima de uma faixa fisiológica de concentração) e independe de Na<sup>+</sup>; além disso, a L-arginina também é transportada através da membrana celular pelo sistema mais recentemente descoberto, y<sup>+</sup>L. O estudo do influxo de L-arginina, através da membrana celular, é o exame de um processo da

rota metabólica L-arginina-óxido nítrico. Esse segmento da rota merece maiores investigações para avaliação dos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos relacionados à PA.

### *1.2.3. A Disfunção Endotelial no Diabetes*

O diabetes altera a função de vários tipos celulares incluindo o endotélio, as células musculares lisas e as 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, conduz a um aumento da vasoconstrição e da inflamação e promove a trombose (VERMA e ANDERSON, 2001). O diabetes contribui para a instabilidade da assim chamada placa ateromatosa (associada a um tipo de arteriosclerose), o qual confere estabilidade mecânica à cápsula fibrosa da referida placa (UEMURA, *et al.*, 2001). Quando o desdobramento do colágeno aumenta e a síntese diminui, a placa pode romper mais facilmente e levar à formação de trombo. O próprio fenômeno trombótico está agravado pela produção do fator tissular que é pró-coagulante. O diabetes estimula a atividade aterogênica das células musculares lisas

vasculares. As lesões ateroscleróticas avançadas em diabéticos têm menos células musculares lisas (LIBBY, 2001) e, portanto, são mais propensas a ruptura e formação de trombo. Finalmente, a diminuição da função plaquetária pode participar, de forma significativa, na formação do trombo. A função plaquetária mostra, nos diabéticos, diminuição da produção de NO e prostaciclina, aumento da produção de fibrinogênio, entre outras alterações (VINIK, *et al.*, 2001). Estes desvios fisiológicos condicionam alterações dos radicais livres de oxigênio e perturbação da homeostase do cálcio, que, no seu conjunto, explicam o aumento do potencial trombótico característico do diabetes.

Realizaram-se investigações da atividade da NOS plaquetária em pacientes diabéticos insulino-dependentes (DMID) e não dependentes (DMNID), os quais foram caracterizados pelo aumento da ativação plaquetária e da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase da membrana de plaquetas em dezenove pacientes DMID, vinte e um DMNID e, como controle, em trinta e um pacientes saudáveis. A expressão da NOS mostrou uma relação positiva significativa com a atividade de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase em pacientes diabéticos, tornando possível a hipótese de que uma atividade diminuída da NOS possa ter um papel na patogênese das complicações vasculares diabéticas (RABINI, *et al.*, 1998). O radical NO é um possível mediador precoce

das lesões das células beta-pancreáticas no diabetes DMID. Existem diferentes isoformas da NOS no contexto das lesões imunológicas das células beta, sendo que o papel da iNOS é o mais relevante. A iNOS da célula beta é semelhante e codificada pelo mesmo gene no cromossomo 17 da iNOS expressada em macrófagos e em outras células nucleadas. A ativação da iNOS depende da transcrição do gene e da re-síntese da enzima, e o NO parece induzir um *feedback* negativo na expressão da iNOS. Enquanto o RNAm da iNOS é induzido somente pela interleucina-1 beta (IL-1 beta), nas células produtoras de insulina em roedores, são necessárias a combinação de duas (IL-1 beta + interferon gama [IFN-gama]) ou três (IL-1 beta + IFN-gama + TNF alfa) citocinas. Para a ativação da iNOS em células pancreáticas humanas, a regulação dos genes da iNOS e outros genes relacionados com as células beta é complexa e difere, em vários aspectos, do que se observa em macrófagos. Existem também importantes diferenças na regulação da iNOS entre células pancreáticas de roedores e células humanas. Um conhecimento detalhado da regulação molecular destes genes nas células beta pode ser um instrumento experimental no desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção da destruição precoce das células pancreáticas beta em pacientes DMID (EIZIRIK, *et al.*, 1996). Evidências indicam que a insulina pode, *in vivo*, sub-regular a via de

liberação da iNOS. A via da iNOS é sobre-regulada em ratos e camundongos com tendência ao diabetes e associa-se no processo auto-imune. Alguns experimentos, entretanto, indicam que a produção de NO por macrófagos e a expressão do RNAm da iNOS estão também aumentadas em roedores tornados diabéticos pela injeção de estreptozotocina (STZ) em que não há um componente auto-imune primário. A administração de insulina reduz a produção de NO em roedores com tendência ao diabetes e naqueles com diabetes induzido pela STZ. Finalmente, a insulina diminui a produção de NO por macrófagos em animais normais. Estes resultados indicam que o paradigma auto-imune é inadequado para explicar o aumento do NO no diabetes.

Como um mecanismo potencial para explicar a regulação da produção do NO mediada pela insulina, o TGF-beta 1 pode estar envolvido porque: 1) macrófagos de ratos diabéticos produzem menos TGF-beta 1 do que macrófagos de animais normais; 2) o nível circulante de TGF-beta 1 é mais baixo em ratos diabéticos e; 3) a administração de insulina aumenta a TGF-beta 1 em ratos normais. Estes resultados juntos evidenciam que o aumento de NO no diabetes não é somente a causa mas, também, um efeito da destruição de



células beta e resultante, em parte, de uma atividade imunorreguladora da insulina até aqui desconhecida (STEVENSON, *et al.*, 1997).

A produção aumentada de NO é descrita no rim diabético e é considerada como envolvida na hiperfiltração glomerular. O mecanismo preciso da produção de NO no rim diabético é, entretanto, desconhecido. Um estudo recente compara a localização da expressão da isoforma eNOS em tecido renal de ratos portadores de diabetes induzida pela STZ e ratos 5/6 nefrectomizados, esclarecendo o papel essencial da eNOS na hiperfiltração glomerular nos estados precoces da nefropatia diabética. Em ratos diabéticos, o diâmetro das arteríolas aferentes, do volume glomerular, o *clearance* de creatinina e o  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  urinário aumentam após a indução de diabetes. As arteríolas eferentes, entretanto, não se alteram. O tratamento com insulina ou L-NAME restaura o diâmetro das arteríolas aferentes, o volume glomerular, o *clearance* de creatinina e os níveis de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ . A expressão da eNOS nas arteríolas aferentes e nos glomérulos de ratos diabéticos aumenta durante os estágios precoces da doença, mas não se alteram nas arteríolas eferentes. O tratamento com insulina ou L-NAME diminui a expressão da eNOS em arteríolas aferentes e nos glomérulos. Em contraste, a expressão da eNOS encontra-se sobre-regulada em ambas as arteríolas, aferente e

eferente, e nos glomérulos de ratos 5/6 nefrectomizados, onde se observam dilatação das arteríolas aferentes e eferentes e aumento dos glomérulos. Tratamento com L-NAME melhora a expressão da eNOS e a dilatação das arteríolas. Conclui-se que o aumento da síntese de NO pela eNOS em arteríolas aferentes e células endoteliais glomerulares, em resposta ao estado hiperglicêmico, pode causar uma dilatação preferencial de arteríolas aferentes, o que, em consequência, induz a dilatação e hiperfiltração glomerulares (SUGIMOTO, *et al.*, 1998).

Um outro estudo foi dirigido para investigar o papel do NO na patogênese da hiperfiltração e hiperperfusão glomerulares em ratos com diabetes induzido pela STZ. Para a avaliação do papel do NO na hiperfiltração, mediram-se as concentrações plasmáticas e urinárias de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , produtos metabólicos estáveis do NO e a expressão protéica das três isoformas da NOS em ratos com diabetes induzida pela STZ. Investigaram-se, também, as alterações hemodinâmicas renais, como a velocidade de filtração glomerular (VFG) e o fluxo renal plasmático (FRP), em resposta à administração aguda e crônica de L-NAME em ratos diabéticos e controles. Os ratos diabéticos exibiram níveis plasmáticos e urinários de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  aumentados após 28 dias de injeção de STZ, e a excreção total de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  foi, aproximadamente cinco vezes maior nos ratos diabéticos do que nos

ratos controles. As três isoformas da NOS (nNOS, iNOS e eNOS) estavam todas aumentadas no córtex renal, enquanto permaneceram inalteradas na medula renal no 28º dia. A VFG e o FRP estavam significativamente elevados nos ratos diabéticos, e a inibição aguda da síntese de NO pelo L-NAME atenuou as alterações hemodinâmicas renais nos ratos diabéticos. Esses estudos concluem que a síntese de NO está aumentada em ratos diabéticos, devido a um aumento da expressão da NOS, e que o bloqueio crônico atenua a hiperfiltração e hiperperusão renais nesses animais. Em adição, os ratos diabéticos exibem melhora das respostas hemodinâmicas renais pela inibição aguda do NO com aumento da excreção urinária de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ . Esses resultados sugerem que a produção excessiva de NO pode contribuir para a hiperperusão e hiperfiltração renais nos estágios precoces do diabetes (CHOI, *et al.*, 1999).

Finalmente, é importante tentar estabelecer ligações entre NOS, insulina e hipertensão arterial. Tem sido descrito que o tratamento com a insulina melhora a hipertensão em pacientes com diabetes melito. Os mecanismos do efeito anti-hipertensivo da insulina, entretanto, necessita ser completamente elucidado. Um estudo investigou um possível envolvimento do NO na redução da pressão arterial pela insulina em ratos diabéticos obesos Zucker (ZDF – Zucker

*diabetic fatty*), um modelo experimental de diabetes não dependente da insulina. Os animais foram divididos em três grupos e tratados por quatro semanas com injeções subcutâneas diárias de insulina (25U/k) com ou sem a administração do inibidor inespecífico L-NAME (50mg/kg/dia). Solução salina foi injetada pela via subcutânea nos grupos controles. Durante o período experimental, o ganho de peso foi maior no grupo tratado com insulina do que nos animais controles, ao passo que a ingestão de água foi, consideravelmente menor no grupo tratado com insulina. O tratamento com a insulina resultou em decréscimo da glicemia e da pressão arterial e em um aumento plasmático de metabólitos do NO e da atividade da NOS em tecido aórtico. O tratamento com L-NAME não só bloqueou o efeito anti-hipertensivo da insulina, mas também a atividade das NOS. Estes achados sugerem que a insulina reduz a pressão arterial em ratos ZDF por estimular a expressão da NOS e a produção de NO (KAWAGUCHI, *et al.*, 1999).

Um artigo recente de GARCIA SORIANO, *et al.*, 2001, indica que a ativação de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) é um importante fator na patogênese da disfunção endotelial no diabetes. Esses autores descobriram que a destruição das ilhotas pancreáticas com estreptozotocina, em ratos, induzia hiperglicemia grave, produção

de oxidante intravascular, ativação de PARP nos vasos sanguíneos e uma perda da função endotelial. Demonstraram também que a disfunção endotelial em ratos diabéticos é dependente de PARP. Em experiências *ex vivo*, demonstraram que a inibição da ativação PARP com inibidor PJ34t de PARP restituía a função vascular normal sem alterar os níveis de glicose sistêmicos. As experiências *in vitro* utilizando células endoteliais pulmonares de ratos tipo selvagem, e com deficiência de PARP demonstraram que níveis elevados de glicose são um estímulo poderoso para a ativação de PARP. Esses estudos demonstraram também que a ativação de PARP através de níveis elevados de glicose depende, pelo menos em parte, da formação de radicais superóxido. As espécies oxidantes são indutores endógenos de DNA de cadeia simples, o que ativa a PARP (PIEPER, *et al.*, 1999). Tem sido demonstrado que os radicais livres derivados do oxigênio são gerados em células endoteliais expostas a elevados níveis de glicose (NISHIKAWA, *et al.*, 2000). O estudo de GARCIA SORIANO, *et al.*, 2001, confirmou e expandiu essas descobertas anteriores. Esses autores especulam que as espécies reativas de oxigênio são os ativadores prováveis de PARP no endotélio diabético. No que diz respeito à questão de qual é o mecanismo celular da disfunção endotelial mediada por PARP no modelo animal do diabetes, sugerem que a crise energética que se desenvolve na célula endotelial

como resultado da agressão oxidante estimula a ativação de PARP. A PARP é uma enzima nuclear de células eucarióticas que tem sido associada a lesões de DNA (PIEPER, *et al.*, 1999). Foi demonstrado que ativação de PARP está ligada a lesões de células induzidas por oxidante através de uma série complexa de passos que se seguem à lesão de DNA e à ativação de PARP, tem lugar uma rápida depleção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) intracelular (forma oxidada) e ATP, conduzindo à disfunção celular. A PARP também tem sido implicada no processo de expressão genética pró-inflamatória em estudos anteriores (ZINGARELLI, *et al.*, 1998).

Ainda em 2001, BROWNLEE, por meio de uma ampla revisão, sintetizou os danos vasculares mediados pela glicose em quatro mecanismos principais:

1. Fluxo aumentado na rota metabólica dos polióis – uma enzima, a aldose redutase reduz os aldeídos gerados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) a álcoois inativos, e glicose a sorbitol, usando NADPH como co-fator. Em células onde a atividade dessa enzima é suficiente para depletar os níveis de GSH, o estresse oxidativo eleva-se.

2. Aumento na produção intracelular de produtos finais avançados de glicação (AGE) – a modificação covalente de proteínas intracelulares por precursores de AGE altera diversas funções celulares. Além disso, a modificação de proteínas de matriz extracelular causa interação anormal com outras proteínas de matriz e integrinas. Por sua vez, a alteração de proteínas plasmáticas por precursores de AGE cria ligantes que se conectam a receptores de AGE, resultando em mudanças na expressão genética em células endoteliais e mesangiais, bem como macrófagos.

3. Ativação de proteína quinase C (PKC) – a hiperglicemia aumenta a concentração de diacilglicerol (DAG), o que ativa PKC. Essa ativação tem uma série de consequências patogênicas, afetando a expressão das NOSe, da endotelina-1 (ET-1), do fator vascular endotelial de crescimento (VEGF), do fator de crescimento tumoral- $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) e diversos outros.

4. Fluxo aumentado da rota metabólica da hexosamina – o intermediário glicolítico frutose-6-fosfato é convertido em glicosamina-6-fosfato pela enzima glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT). A glicosilação intracelular pela adição de N-acetilglicosamina

(GlcNAc) à serina e à treonina é catalisada pela enzima O-GlcNAc transferase (OGT). Um excesso na adição de GlcNac a resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição como o Sp1, eleva a produção de fatores como o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), TGF- $\beta$  e diversos outros.

Essa incursão ao complexo território da disfunção endotelial no diabetes abre portas à compreensão mais profunda de algumas das expressões clínicas dessa doença, referidas na discussão bem elaborada e esclarecedora que os autores apresentam. Elas estão subjacentes a fenômenos clínicos como a isquemia silenciosa, a neuropatia autonômica, a instabilidade da placa, a perturbação da coagulação e a miocardiopatia diabética.

#### *1.2.4. O Estresse Oxidativo*

Radicais livres são espécies químicas que têm um elétron não-pareado em um orbital externo, o que as faz extremamente instáveis. Reagem espontaneamente com moléculas inorgânicas ou orgânicas, em especial lípidos, proteínas e ácidos nucleicos.



O termo estresse oxidativo refere-se ao conjunto de efeitos deletérios que radicais livres derivados de oxigênio exercem sobre as células. O oxigênio carrega um notável paradoxo, se, por um lado, é indispensável à vida de organismos aeróbicos como acceptor de elétrons, por outro, pode gerar metabólitos lesivos às células destes mesmos organismos. A formação de intermediários reativos de oxigênio provavelmente ocorre de forma contínua na célula, a qual dispõe de mecanismos para inativá-los. Sistemas associados ao transporte e trocas de oxigênio produzem radicais livres como subprodutos da atividade metabólica normal. Muitos destes sistemas possuem íons metálicos como o ferro, que ao passar do estado ferroso  $\text{Fe}^{++}$  ao férrico  $\text{Fe}^{+++}$ , isto é, de um estado de óxido-redução ao outro - doando ou aceitando elétrons -, podem catalisar a formação de radicais livres. A geração de vários tipos tóxicos de  $\text{O}_2$  ocorrem em circunstâncias patológicas, incluindo reações inflamatórias. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de  $\text{O}_2$ , incluindo proteínas, aminoácidos, lipídios, além de ácidos graxos poliinsaturados, que também reagem com  $\text{O}_2$ , formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988). Os danos também incluem alterações enzimáticas e danos no DNA. Essas alterações oxidativas são as responsáveis por uma série de

doenças degenerativas - as angiopatias, por exemplo. Hoje existe uma grande discussão, por exemplo, em relação à doença de Alzheimer, causada pela presença de radicais livres, através do acúmulo de B amilóide. A liberação dessa proteína conduz, por fragmentação, à formação de radicais livres, que modificam as membranas dos neurônios (HENSLEY, 1994). Como já foi dito, o estresse oxidativo também está envolvido na patogênese da nefropatia diabética (OBROSOVA, *et al.*, 2002). Uma das mais importantes conseqüências da “toxicidade” da glicose sobre os tecidos-alvos, no que diz respeito às complicações diabéticas, é a produção aumentada dos derivados reativos de oxigênio. A hiperglicemia inibe o transporte de elétrons no complexo III da cadeia transportadora mitocondrial, aumentando a meia-vida de radicais livres intermediários da ubiquinona e, conseqüentemente, reduzindo o oxigênio a superóxido (BROWNLEE, 2001).

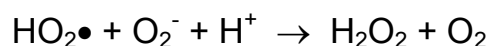
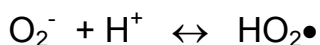
Neste momento, é importante ressaltar que os intermediários reativos do oxigênio, a despeito de seus efeitos deletérios, podem ter papel positivo *in vivo*, como o seu envolvimento em produções energéticas, fagocitoses, regulação no crescimento celular e sinais intercelulares bem como em sínteses de importantes compostos biológicos.

Entre as fontes mais importantes de radicais livres estão: a hemoglobina, o sistema de oxidação conhecido como citocromo P450 e a cadeia respiratória nas mitocôndrias. A maior parte do oxigênio consumido nas células vai para a fosforilação oxidativa ( $O_2 \rightarrow H_2O$ ). Porém, muitas enzimas, que funcionam em várias vias metabólicas, geralmente usando íons metálicos como co-fatores, transferem elétrons a aceptores como  $O_2$  ou NAD. No fígado, a ação dessas enzimas (oxidases) pode chegar a 1/3 do consumo de  $O_2$  do tecido.

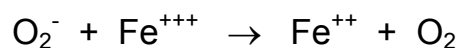
A redução do  $O_2$  a  $2H_2O$  por inserção direta de dois pares de elétrons é um processo energeticamente difícil devido a peculiaridades dos elétrons nos orbitais externos. Não fosse isso, a coexistência de oxigênio molecular com organismos vivos seria improvável. Essa dificuldade é diminuída pela adição sucessiva de elétrons um a um. A adição do primeiro elétron produz o íon superóxido:



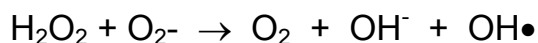
Este é facilmente protonado a  $HO_2$  (radical hidroperoxil), que reage com outro radical igual e se transforma em  $H_2O_2$  e  $O_2$ .



Portanto, qualquer sistema que produza  $\text{O}_2^-$  logo conterá  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, na presença de íons ferro, duas outras reações importantes ocorrem entre o íon superóxido e o peróxido de hidrogênio (água oxigenada):



Esta é a reação de Fenton (RICE-EVANS, 1996). Através dela é gerado o radical livre hidroxila  $\text{OH}\bullet$ , que, dentre os radicais livres, é uma das espécies mais reativas, ainda mais que o íon superóxido. Omitindo-se a participação do ferro, que funciona como catalisador e só atua como acceptor e doador de elétrons, temos a reação de Haber-Weiss:



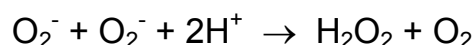
Em resumo, a produção inicial do íon superóxido resultará, através destes intermediários, na produção do radical livre hidroxila. Radicais livres tipo hidroxila são também produzidos na radiólise da água por radiações ionizantes.



O organismo desenvolveu um sistema de defesa antioxidante contra a ação maléfica dos radicais livres. Esses sistemas incluem alguns antioxidantes produzidos pelo organismo (endógenos) e outros obtidos por uma dieta alimentar (exógenos). Os primeiros incluem enzimas como peroxidase, catalase e superóxido dismutase (SOD), a qual metaboliza o superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos. As segundas defesas - não enzimáticas - incluem glutathione (GSH), peptina-histidinas, proteínas de ligação cobre-transferrina e ferritina, ácido di-hidrolipóico, reduzido CoQ10, melatonina, urato e tióis protéicos do plasma. Cada uma destas defesas complementa a outra, de modo que uma alteração em uma delas provoca danos causados pelos intermediários reativos de oxigênio (BUETTNER, 2001; BARROS, 2003).

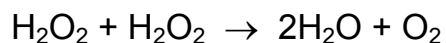
Examinemos, agora, algumas vias de inativação de radicais:

1. O íon superóxido pode ser inativado espontaneamente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ .
2. Além disso, a enzima superóxido-dismutase (SOD) catalisa a seguinte reação (que é mais rápida):



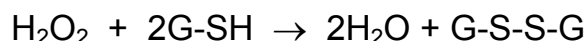
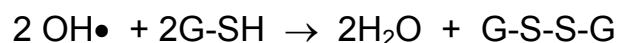
A enzima é encontrada em todos organismos aeróbicos, no citossol e nas mitocôndrias, e tem, como parte da molécula, íons metálicos (cobre, zinco ou manganês).

3. A enzima catalase é importante para impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Catalisa a reação:



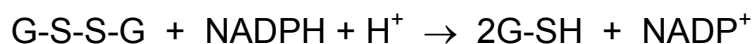
A catalase de fígado de boi contém 4 porções hemes e decompõe 44.000 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por segundo. Peroxidases fazem reação semelhante.

4. O tripeptídeo glutathiona é amplamente distribuído em seres vivos, sendo constituído de  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina. Normalmente, está na forma reduzida, isto é, o radical -SH da cisteína está intacto. Representa-se como GSH. Este radical pode facilmente doar um hidrogênio a radicais livres hidroxila, sob catálise da enzima glutathiona-peroxidase, produzindo água. Também pode reduzir peróxido de hidrogênio a água:



(G-S-S-G: Glutathiona oxidada)

A glutathiona oxidada é novamente reduzida pela enzima glutathiona-redutase, que catalisa a reação:



A glutathiona participa de diversas vias de proteção da célula contra radicais livres: destruição de peróxidos endógenos e radicais

livres hidroxila, manutenção de grupos SH em proteínas e detoxificação de produtos exógenos (BUETTNER, 2001).

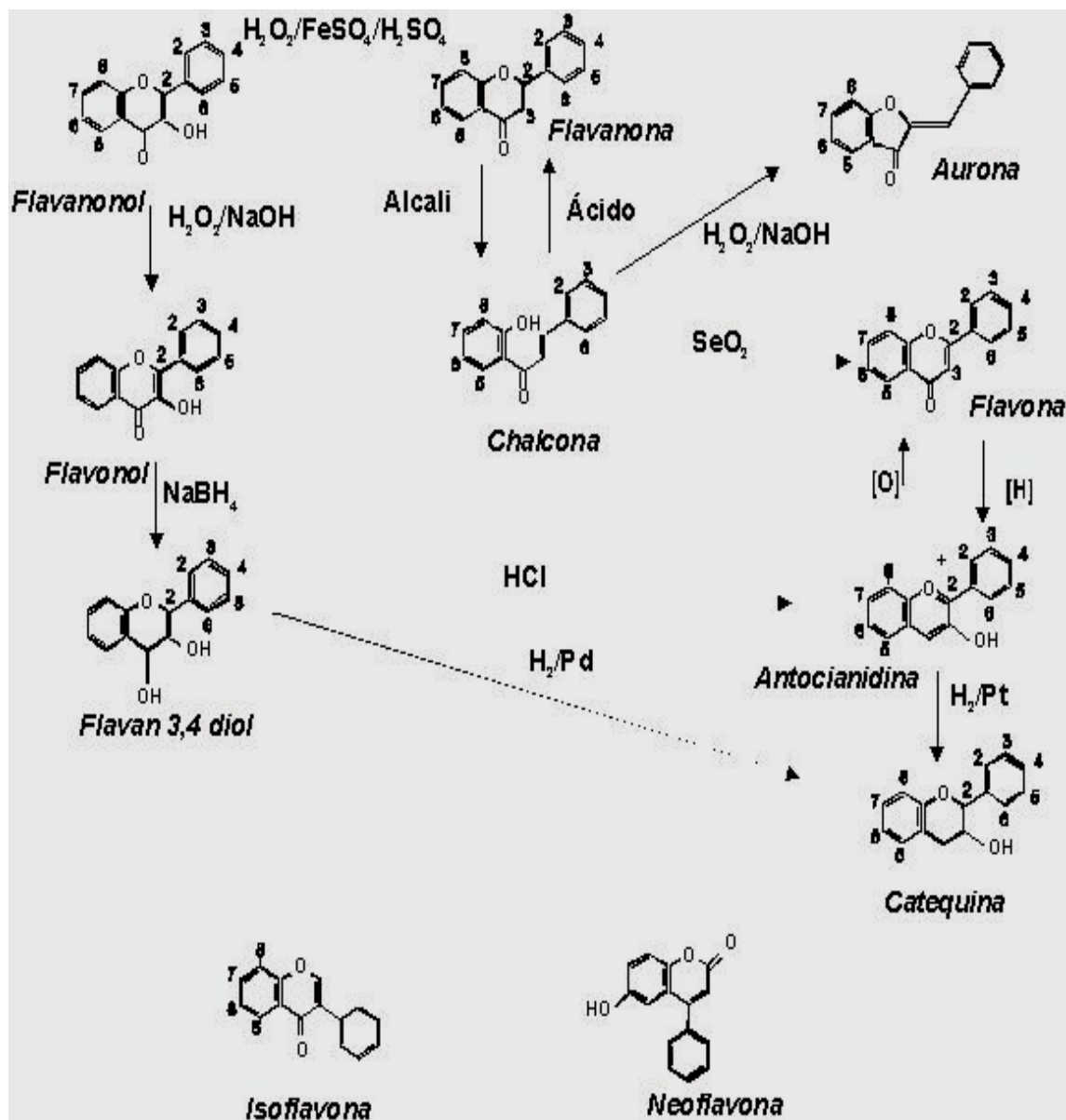
As substâncias que neutralizam os radicais livres ou seus efeitos são chamadas antioxidantes. Alimentos antioxidantes são aqueles ricos em substâncias que podem “varrer” os radicais livres ou então fortalecer a membrana celular, para que os danos do “bombardeamento” não afetem o núcleo e o DNA da célula. Os benefícios do consumo de alimentos antioxidantes são imensos, como proteção contra doenças degenerativas. Certos alimentos, como peixe, nozes, frutas e diversos óleos vegetais são fontes ricas de antioxidantes. Frutos e vegetais, por sua vez, são ricos em fenóis, ácidos fenólicos, linhases, taninos e flavonóides (BARROS, 2003).

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana. Estudando sua ação como antioxidante, pesquisas envolvendo não só flavonóides, como também os seus precursores biossintéticos, foram bastante desenvolvidas



(RICHARDSON, *et al.*, 1974; PRATT e BIRAC, 1979; RIOS, *et al.*, 1992). Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (PETERSON e DWYER, 1998).

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C6-C3-C6. O esqueleto C15 dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6-C3) e três unidades de acetato (C6). Portanto, flavonóides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal (YOKOZAWA, *et al.*, 1997), podendo haver facilmente interconversão entre eles (Figura 8).



**Figura 8.** Interconversão dos principais grupos de flavonóides.

(Adaptado de DOMINGUES, 1973).

A existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides é explicada pelas modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (KOES, *et al.*, 1994).

Consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular, os flavonóides são encontrados em vegetais, legumes, frutas, chás de ervas, mel, entre outros produtos de consumo cotidiano. Apesar do termo "flavonóide" derivar do latim *flavus*, que significa amarelo, observa-se que os grupos flavonóis e flavonas são incolores e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul.

Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonóidicos. Segundo RATTY e DAS, 1998, algumas dessas propriedades farmacológicas já foram observadas (RUSZNYAK and SZENT-GYORGI, 1936). Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidante (esta constitui a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos); atividades antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra

o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica; efeito antiplaquetário, bem como ações antimicrobianas e antivirais. Pesquisas recentes demonstraram que alguns flavonóides atuam na inibição da replicação viral do agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana – HIV (LIN, *et al.*, 1997).

Sabe-se que os flavonóides podem inibir vários estágios dos processos que estão diretamente relacionados com o início da aterosclerose, como ativação de leucócitos, adesão, agregação e secreção de plaquetas (HLAVODEC, 1986), além de atividades hipolipidêmicas (LIN, *et al.*, 1986) e aumento de atividades de receptores de LDL (KIRK, *et al.*, 1998). Diversos compostos flavonoídicos de diferentes plantas, uma vez extraídos, isolados, identificados e quantificados, foram transformados quimicamente e empregados em ensaios biológicos para avaliações dos seus potenciais farmacológicos sobre lipídios em ratos (SANTOS, *et al.*, 1999a; NAGEM, *et al.*, 1995; SANTOS, *et al.*, 1999b).

Segundo ANTON e BERETZ, 1990, as propriedades farmacológicas dos flavonóides ainda não foram totalmente avaliadas. Após uma década de avanços nessa linha de pesquisa, pode-se afirmar que novos estudos toxicológicos e farmacológicos devem ser

realizados, uma vez que a ampla diversidade estrutural desses compostos - bem como a capacidade de interação com outras substâncias, nos leva a imaginar que novas descobertas ainda podem e devem ser realizadas.

A atividade antioxidante dos flavonóides é devida à sua grande capacidade em captar/sequestrar os radicais livres, formar complexos com íons metálicos e inibir a peroxidação lipídica das membranas celulares através do ataque de espécies reativas de oxigênio às camadas fosfolípídicas. Os flavonóides inibem também enzimas responsáveis pela formação de ânions superóxido, tais como, a xantina oxidase, proteína quinase C, assim como ciclooxigenase, monooxigenase microssomal, succinoxidase mitocondrial - todas elas geradoras de espécies reativas de oxigênio (RICE-EVANS, 1996). Numerosos flavonóides ligam-se eficazmente a íons metálicos, tais como  $\text{Fe}^{++}$  e  $\text{Cu}^+$ , que são conhecidos por induzirem estresse oxidativo em sistemas biológicos, atuando como catalisadores nos danos causados pelos radicais de oxigênio. Há evidências de que flavonóides podem interagir e penetrar nas bicamadas lipídicas das membranas, mostrando que estes podem alterar as barreiras destas membranas. Estes efeitos podem explicar diversos fatores, como conformação e lipossolubilidade de drogas. Os flavonóides, alterando a

permeabilidade das membranas celulares, podem ser um fator crítico na explicação de muitas das suas atividades biológicas. Flavonóides também modulam a resistência dos vasos sanguíneos, causando um aumento na fluidez lipídica.

A ação dos ácidos fenólicos como ácido caféico, ácido clorogênico e seus isômeros, incluindo ácido 4-O-cafeioil-quínico e ácido ferúlico, mostrou sua potencialidade em diminuir efeitos deletérios (PINCEMAIL, *et al.*, 1987). PRATT e BIRAC (1979) estudaram os efeitos da quercetina, quercitrina, myricetina, myricetina-3-monoglucosídeo, quercetina 3-monoglucosídeo e quercetina 3-triglucosídeo, extraídos de sementes de diversas plantas. A determinação da atividade antioxidante foi feita utilizando etanol absoluto e fazendo determinações espectrométricas, enquanto RIOS, *et al.*, 1992, testaram os efeitos de cinco flavonóides glicosilados de *Sideritis javalambrensis* como inibidores da peroxidação de lipídeos nos microssomas. RICHARSON, *et al.*, 1974, testaram o efeito de flavonas e derivados de flavonas como antioxidantes em amostras de leite e comprovaram a eficácia de suas ações. Antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, também foram encontrados em vários vegetais (HAREL e KANNER, 1984; FARR, *et al.* 1988;

SHEABAR e NEEMAN 1988; ZHAO, *et al.* 1989; NAMIKI 1990; PRATT e HUDSON 1990; LOLIGER 1991 e KANNER, *et al.*, 1994).

Alguns fatores externos como a poluição, fumo, álcool, sol em excesso, distúrbios de sono, stress, drogas, alterações constantes do peso, excesso de atividade física, entre outros, contribuem para o aumento de radicais livres e alterações da aparência da pele. Para combater os radicais livres, a ingestão de alimentos antioxidantes é fundamental, pois ajuda a diminuir o seu efeito, e aparentemente, retarda o processo de envelhecimento precoce.

#### *1.2.5. O Escape Vascular*

Como dissemos anteriormente, entende-se por escape vascular (EV) a reversão da resposta pressora vascular, mesmo mantido o estímulo vasoconstritor. Muitos estudos foram feitos na tentativa de desvendar seu(s) mecanismo(s). Todavia, trata-se ainda de um tema não esclarecido. Dentre as hipóteses propostas para explicá-lo, podemos citar:

- a) Redistribuição do fluxo sangüíneo para outros leitos, principalmente no leito mesentérico, através das anastomoses arterio-venosas (FOLKOW, 1964).
- b) Dilatação das arteríolas (SCANVIK, 1973); posteriormente, essa hipótese foi contestada por RICHARDSON e JOHNSON, 1969; FARA e ROSS, 1972 e GUTH e SMITH, 1976, cujos trabalhos, em conjunto, demonstraram que o fenômeno ocorria tanto por estímulo ganglionar como por agentes vasoconstritores.
- c) Uma depleção dos neurotransmissores ou uma falência na transmissão (JOHNSON, *et al.*, 1970). Diversos estudos enfraqueceram esta teoria. Vejamos: o escape ocorre mesmo em estimulação de baixa freqüência, o que dificilmente esgotaria as reservas de NOR. Alguns vasos sequer exibem escape. Para a teoria de a fadiga neuronal explicar esse padrão de resposta da microvasculatura, a depleção de neurotransmissores deveria ocorrer seletivamente na proximidade dos vasos de resistência, mas não em outros microvasos. O escape não pode ser considerado como uma fadiga induzida por métodos artificiais, já que estímulos fisiológicos também promovem esse fenômeno. Quarto, o fato do aumento da freqüência de estimulação após o



escape ter ocorrido causa vasoconstricção, indicando que neurotransmissor adicional pode existir. Finalmente, ocorre escape mesmo quando a NOR é infundida por via endovenosa e constantemente.

- d) Distribuição seletiva das fibras adrenérgicas vasoconstrictoras, o que envolveria os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (DRESSEL e VALLENTIN, 1966). Todavia, ROSS, 1971, sugeriu que o fenômeno de EV relaciona-se mais à natureza do agente vasopressor, não à distribuição dos receptores adrenérgicos.
- e) Efeito mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos. No entanto, vários pesquisadores descartaram esta hipótese (HEINRICH, *et al.*, 1974; SINGBARTL e HENRICH, 1974 e GREENWAY, *et al.*, 1976). Ademais, demonstrou-se a ocorrência de EV com agente não-adrenérgico, no caso angiotensina II (FIGUEIREDO, 1995).

Como se vê, trata-se fenômeno complexo, cuja natureza os estudos realizados nas últimas quatro décadas têm, cada vez mais, demonstrado ser multifatorial. De fato, inúmeras foram as tentativas para a explicação do EV. Entretanto, seu mecanismo preciso ainda

permanece desconhecido. 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).

Diversos experimentos controlados procuram analisar o efeito sobre o EV de variáveis isoladas como, por exemplo, a temperatura. A influência da temperatura neste processo foi demonstrada por FONTELES, *et al.*, 1974, em rins isolados de coelho, que observou uma maior intensidade de escape na temperatura do banho de infusão de 25°C quando comparada a 35°C.

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 JESKE, 1976).

Em 1989, REMARK, *et al.*, propuseram uma explicação para o EV na circulação intestinal - 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 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 vasodilatadores. Estudos de OHYANAJR, *et al.*, 1991, apoiaram essa tese.

Outras linhas de pesquisa sugerem que o EV é o resultado da competição entre mecanismos locais e neuronais. Por exemplo, cogitou-se a hipótese de o receptor  $\alpha_2$  ser o sítio específico no qual a competição anteriormente citada ocorre (FABER, 1988). Deveras, o bloqueio do receptor  $\alpha_2$  aumentou a capacidade da circulação intestinal de cães de escaparem da estimulação simpática; e o percentual de escape foi significativamente aumentado pela ioimbina (CHEN, *et al.*, 1991).

Em 1972, foi iniciada a averiguação do papel das prostaglandinas no fenômeno de EV (McGIFF, *et al.*). A infusão de NOR em rins de cão promovia, inicialmente, uma redução do fluxo

sangüíneo renal; curiosamente, ocorria, a seguir, um aumento do fluxo. Paralelamente a essa elevação do fluxo, foi observado um aumento na concentração sangüínea de prostaglandinas. Observou-se ainda que, na ausência do escape, não havia alterações na concentração de prostaglandinas no sangue venoso. Trabalhos com rins isolados de coelho demonstraram que um inibidor de cicloxigenases (COX) – a indometacina - promovia uma redução na intensidade de EV. Como as prostaglandinas dependem da ação destas enzimas para serem formadas, este resultado sugere a participação destes eicosanóides 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).

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 EV. Todavia, o PAF exogenamente administrado mostrou-se completamente ineficaz (FERREIRA, *et al.*, 1989).

O controle local, principalmente através do endotélio vascular, representa um importante mecanismo de controle do fluxo e

da pressão sangüínea (COWLEY, 1992). Certos metabólitos liberados pelos tecidos em determinadas condições fisiológicas podem agir 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).

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  $\alpha_2$  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 EV (CHEN e SHEPHERD, 1991).

O NO também foi objeto de interesse no estudo do EV. Um experimento no qual foram utilizados inibidores de NOS (análogos da L-arginina) demonstrou a inibição do escape observado no leito

hepático de ratos induzido por etanol (OSHITA, *et al.*, 1993). Todavia, um estudo posterior com ratos anestesiados não confirmou esse resultado, ainda que o uso de L-nitro-arginina (L-NA) tenha promovido certas alterações na cinética do escape (FIGUEIREDO, 1995).

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

#### 1.2.6 A hipotermia

As constatações de que a hipotermia sem formação de gelo reduz a demanda metabólica das células e retarda ou previne a morte celular despertou o interesse dos pesquisadores e fomentou o emprego desse recurso na clínica e no laboratório (BELZER e SOUTHARD, 1986; RATYCH, *et al.*, 1986). Todavia, temperaturas hipotérmicas – com ou sem formação de gelo – também podem resultar em morte celular (MACLEAN e EMSLIE-SMITH, 1997). O

resfriamento local de um vaso sanguíneo resulta em uma redução do fluxo em razão de dois fatores associados: aumento da viscosidade do sangue e vasoconstrição local (KILLIAN, 1981; KULKA, 1961; LAPRELL-MOSCHNER, *et al.*, 1983). A estase intravascular pode desenvolver-se, levando a uma anóxia tecidual (LAPRELL-MOSCHNER, *et al.*, 1983) e acidose metabólica (MACLEAN e EMSLIE-SMITH, 1997). A situação pode se agravar pela formação de gelo extracelular, o qual danifica a camada íntima dos vasos sanguíneos e, em particular, leva a uma perda da integridade do endotélio (BOWERS, *et al.*, 1973; RABB, *et al.*, 1974). Além disso, o gelo extracelular pode induzir edema tecidual. A perda do controle endotelial e o edema comprometem a habilidade do corpo de 'reabrir' a microvasculatura, levando a isquemia e morte celular.

A exposição a temperaturas relativamente baixas altera as características fisiológicas e bioquímicas das células, com perda de gradientes transmembrana de íons e barreiras funcionais de membrana, bem como a ativação de fosfolipases (HOCHACHKA, 1986; KANNAGI e KOIZUMI, 1979). Alguns relatos têm sugerido que a injúria ao órgão após o resfriamento pode ser atribuída a danos ao endotélio e à parede do vaso, induzidos pela hipotermia.

Há uma série de alterações celulares associadas à fisiopatologia das injúrias induzidas pela hipotermia nas células endoteliais HOCHACHKA (1986) sugeriu que, a baixas temperaturas, há uma perda de energia celular e as bombas de íons transmembrana tornam-se inativas. O resultado é uma substancial mudança nas concentrações iônicas intracelulares. Uma elevação no cálcio citossólico poderia resultar em ruptura do citoesqueleto e ativação de fosfolipases, proteases e endonucleases (ORRENIUS, *et al.*, 1989; NICOTERA e ORRENIUS, 1992), comprometendo as funções da membrana e das organelas. Células endoteliais resfriadas até 22 °C e estimuladas com bradicinina mostram uma concentração intracelular de cálcio significativamente mais alta do que quando se encontram a 37 °C (WANG, *et al.*, 1993). Em contraste, a concentração basal não estimulada permanece inalterada. Uma mudança na concentração intracelular de cálcio, por sua vez, pode ocasionar a rápida liberação das reservas internas desse íon (RITTENHOUSE-SIMMONS, *et al.*, 1979; BALLOU, *et al.*, 1986; REHFELDT, *et al.*, 1993).

O resfriamento não somente altera as funções da membrana celular, mas também está associado a mudanças físicas na membrana. Em geral, as membranas celulares em normotermia encontram-se em um estado líquido cristalino e, sob hipotermia,



passam por uma transição para fase gel (CROWE, *et al.*, 1989; QUINN, 1985). Estudos mostraram que quanto maior a temperatura da fase de transição da membrana, maior a sensibilidade da célula ao resfriamento (HANSEN, 1993; PARKS, *et al.*, 1992). Além disso, experimentos com diversos tipos celulares demonstraram que a injúria induzida pelo resfriamento é bifásica, relacionada à temperatura de fase de transição (KRUUV, *et al.*, 1983 e 1985). Por exemplo, as células endoteliais da veia umbilical humana têm fase de transição de membrana a 15,9 ° C. A incubação de células a 23 ° C resultou em uma linear e gradual decréscimo das células sobreviventes ao longo do tempo, fenômeno não notado a 4 ° C (HANSEN, 1994).

As alterações celulares associadas à exposição de células endoteliais à hipotermia incluem: perda de energia, inibição de bomba de membrana, mudanças nas concentrações citossólicas de íons, ativação de enzimas, ruptura de citoesqueleto, formação de radicais livres, deformação e morte celular.

## 2. OBJETIVOS

O presente experimento tem por objetivos avaliar a reação do leito vascular renal de coelhos à infusão de noradrenalina (NOR), sendo os rins perfundidos em diferentes condições e tratamentos, a saber:

- I. em situação de normalidade (grupo controle);
- II. sob hipotermia (25° C);
- III. adicionando-se bloqueadores de NOS (D-arginina, L-NMA e L-nitro-arginina);
- IV. adicionando-se substrato para a via do NO (L-arginina); em diferentes condições metabólicas (diabetes aloxânico);
- V. adicionando-se GSH (a rins isolados de animais diabéticos);
- VI. adicionando-se rutina (a rins isolados de animais diabéticos).

Os parâmetros utilizados são: pressões basal e máxima em cada curva, escape vascular, incremento pressórico relativo e taquifilaxia.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Coelhos Califórnia, de ambos os sexos, provenientes da Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, pesando em média 1,5 kg , foram mantidos em jejum alimentar e 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 diabetes foi induzido por meio de aloxana IP (150mg/kg) e os animais foram usados após a terceira semana, com níveis de glicemia iguais ou acima de 200mg%. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (1200 mg/kg) e pentobarbital (40mg/kg de peso), administrada por injeção intramuscular no membro inferior. Por meio de uma incisão abdominal mediana – indo do processo xifóide até a região púbica – obtinha-se o acesso ao interior da cavidade abdominal. Uma vez expostas, as vísceras eram rebatidas para a direita, expondo o rim esquerdo, o primeiro a ser removido. Após limpeza cuidadosa da gordura perirrenal, eram expostos e identificados os vasos renais, realizando a amarra da artéria renal próximo à aorta abdominal. A seguir, artéria e veia renais eram, em conjunto, bloqueadas com pinça hemostática. Para remover o rim, seccionava-se a veia renal junto à pelve renal e o ureter, em seu terço-médio. O rim era então colocado em uma placa de Petri contendo solução

de Krebs-Henseleit (KH) (KREBS e HENSELEIT, 1932) e procedia-se à canulação arterial com tubo de polietileno PE 50. Iniciava-se, de imediato, a infusão com solução de KH, ao mesmo tempo em que o ureter era também canulado com tubo de polietileno. Na seqüência, o órgão era levado ao sistema onde recebia solução de KH com pH entre 7.35 e 7.40, aerado com mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, com temperatura média de 37°C, decorridos, em média, 5 minutos desde a canulação da artéria renal. Mantendo-se o animal anestesiado, procedia-se à retirada do rim direito após cerca de 120 minutos, seguindo-se os mesmos tempos cirúrgicos já descritos. Em nenhum grupo se removeu a cápsula renal.

### **3.1. Sistema de perfusão**

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

- a. Bomba peristáltica marca Watson-Marlow, previamente calibrada para perfusão de 4,0 ml/minuto;

- b. Membrana silástica Travenol para oxigenação, acoplada à bomba de perfusão e por onde circula o perfusato aerado, 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 0,1ml/minuto;
- e. Manômetro para registro das variações na pressão de perfusão.
- f. Sistema para captação de bolhas.

### **3.2. Medidas fisiológicas**

Foram estudadas as seguintes medidas da dinâmica de perfusão renal:

- a. Pressão de Perfusão (PP): refere-se à pressão existente em todo o leito vascular renal, e registrada a intervalos de 5 minutos ao longo de todo o experimento. É medida por manômetro e expressa em mmHg.

- b. Escape vascular (EV): Consideramos haver presença de escape renovascular quando, à pressão máxima obtida com a infusão contínua de noradrenalina (NOR), registrava-se decréscimo da pressão de perfusão, independentemente de situarem-se os valores mínimos ao final do período de infusão do  $\alpha$  agonista. O escape foi calculado segundo HENRICH e LUTZ (1971), FARA e ROSS (1972), adaptado por FONTELES, *et al.*, (1974), sendo expresso em porcentagem de acordo com o que segue:

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

$$P_{\text{máx}} - P_i$$

Onde:

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

$P_{\text{mín}}$  - pressão de perfusão mínima observada durante a infusão de NOR, após o escape;

$P_i$  é a pressão de perfusão registrada imediatamente antes da infusão do  $\alpha$  agonista.

- c. Incremento pressórico máximo: expressa a relação entre a variação máxima de pressão após a infusão de NOR e a pressão obtida imediatamente antes da infusão. A fórmula matemática é:

$$\% IP = \frac{(P_{\text{máx}} - P_i) \times 100}{P_i}$$

Os parâmetros são os mesmos do item anterior.

d. Taquifilaxia: segundo a observação gráfica, as curvas de infusão de NOR 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 NOR, intercaladas por períodos de lavagem da preparação, mostra uma tendência ao decaimento dos níveis pressóricos. Não há expressões matemáticas para a medida da taquifilaxia. Medimo-la pela comparação entre os pontos máximos das diferentes curvas.

### 3.3. Protocolo de perfusão

Logo após a colocação no sistema, o rim era perfundido com solução KH (mM/L: NaCl 120, KCl 3, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.62, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 14, NaHCO<sub>3</sub> 25, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 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 restos sangüíneos e estabilização da pressão de perfusão;
- b. Períodos de Infusão de Noradrenalina (20 minutos): compostos de três etapas de infusão de NOR  $10^{-6}$  M a uma vazão de 4 ml/min, iniciada a primeira imediatamente após o período de controle;
- c. Períodos de Lavagem (10 minutos cada): lavagem com líquido de perfusato, intercalada aos períodos de infusão de NOR.

Todas as substâncias estudadas foram adicionadas à solução de KH. Os grupos de estudo foram assim divididos:

- a. Grupo controle (n = 20)
- b. Estudo com hipotermia – 25° C (n = 7)
- c. Estudo com arginina (n = 12 )
  - c.1. Perfusato adicionado de L-arginina 1  $\mu$ M (n = 6)
  - c.2. Perfusato adicionado de D-arginina 1  $\mu$ M (n = 6)
- d. Estudo com bloqueadores de NOS (n = 15)
  - d.1. Perfusato com Nitro-L-arginina 10  $\mu$ M (n = 11)



d.2. Perfusato com L-NMA 10  $\mu$ M (n = 4)

e. Estudo com diabetes aloxânico e antioxidantes (n = 17)

e.1. Perfusato convencional (n = 7)

e.2. Perfusato com GSH 1  $\mu$ M (n = 5)

e.3. Perfusato com rutina 1  $\mu$ M (n= 5 )

### 3.4. Produtos químicos

- a. Reagentes utilizados no preparo da solução de Krebs-Henseleit: NaCl, KCl,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , Glicose (Merck).
- b. Reagentes utilizados no preparo da solução vasoconstrictora: Bitartarato de Noradrenalina, Ácido Ascórbico (Sigma).
- c. Anestésicos: uretana e pentobarbital sódico (Merck).
- d. Substrato para a via do NO: L-arginina (Sigma).
- e. Bloqueadores de NOS: Nitro-L-arginina, LMNA e D-arginina (Sigma).

### 3.5. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística em computador PC com programa *Graphpad Prism*, versão 3.0. Calcularam-se, para todos os dados, a média e o erro padrão da média. Para as análises comparativas utilizaram-se os seguintes métodos: ANOVA (teste de Tukey para comparação múltipla) e testes 't' pareados e não pareados, com um nível de confiança de 95%.

Os efeitos dos vários tratamentos sobre a fisiologia renal foram estudados através de análise de variância para comparação de valores referentes às pressões basais e máximas de perfusão, bem como escape vascular e incremento pressórico relativo, nas diversas fases do experimento correspondentes à infusão de noradrenalina (NOR).

## 4. RESULTADOS

O aspecto geral das curvas pode ser dividido em quatro fases: I – um platô de estabilização, durante os 20 min de lavagem; II – uma súbita e acentuada elevação da pressão de perfusão, a partir da infusão de NOR; III – um trecho em que o incremento pressórico diminui rapidamente, tendendo a um platô e, finalmente, IV – uma redução da pressão, mesmo mantida a infusão de NOR (escape vascular). Todavia, a variação individual pode ser acentuada – por exemplo, em algumas curvas não se observa o fenômeno de escape, o mesmo ocorrendo com a taquifilaxia, fatos esses já descritos por vários autores. Ademais, a hipotermia, o bloqueio de NOS e o diabetes aloxânico têm pronunciados efeitos sobre as pressões basais e máximas, influenciando também na ocorrência de escape e taquifilaxia. Analisemos, agora, o comportamento das curvas em cada grupo:

### 4.1. Grupo Controle

Os valores pressóricos das três curvas de pressão arteriolar renal dos vinte animais do grupo controle estão representados – ao lado do grupo dos diabéticos – na tabela 1 e gráfico 1. Esses apresentaram pressão basal média de  $62.88 \pm 2.29$  mmHg (tabela 3 e gráfico 3) e pressão máxima média de  $152.25 \pm 10.02$  mmHg (tabela 4 e gráfico 4). Além disso, o grupo,

como um todo, registrou um EV de  $11.95 \pm 2.43$  %. Dos 20 rins perfundidos, apenas 4 (20%) não apresentaram escape e, caso fossem excluídos, o valor médio subiria para  $14.93 \pm 2.53$  %. O incremento pressórico do grupo foi de  $148.42 \pm 17.43$  %. As pressões máximas atingidas em cada uma das três curvas de infusão de NOR –  $152.25 \pm 10.02$ ,  $146.85 \pm 9.19$  e  $142.10 \pm 7.56$  mmHg – mostram uma tendência à taquifilaxia. Todavia, a comparação desses valores por teste ‘t’ pareado não atingiu o nível de confiança de 95%.

#### **4.2 Diabéticos não tratados e tratados**

O diabetes aloxânico produziu importantes alterações na resposta do leito arteriolar renal durante as três sessões de infusão de NOR: curvas mais íngremes e valores mais elevados em comparação com o grupo de animais normoglicêmicos (tabela 1 e gráfico 1). Por outro lado, os tratamentos com GSH ( $1\mu\text{M}$ ) e rutina ( $1\mu\text{M}$ ) influem no aspecto das curvas: no primeiro, embora haja um aumento na velocidade de elevação da pressão - tanto em relação ao grupo controle como ao próprio diabético -, observa-se uma redução nos valores máximos atingidos, acompanhada de uma recuperação do escape; no segundo, vê-se um aumento na resposta vascular à NOR, com incremento na inclinação da curva de pressão, a qual

atinge valores mais altos que os dos grupos controle e diabéticos não tratados, embora também haja uma recuperação do escape (tabela 2 e gráfico 2). As pressões de perfusão, tanto basais (tabela 3 e gráfico 3) como máximas (tabela 4 e gráfico 4), mostraram-se muito elevadas no grupo de diabéticos, bem superiores às do grupo controle (chegando à ordem de 50% para a máxima, com  $p < 0.01$ , e 46% para a mínima, com  $p < 0.001$ ). Ademais, o grupo dos diabéticos mostrou uma grande redução no escape vascular – da ordem de 90% - em relação ao grupo controle (tabela 5 e gráfico 5). De 7 rins perfundidos, 4 (57%) não apresentaram escape e, caso fossem excluídos, o valor médio subiria de  $1.33 \pm 0.88 \%$  para  $3.11 \pm 1.64 \%$ , ainda bem inferior ao do grupo normoglicêmico.

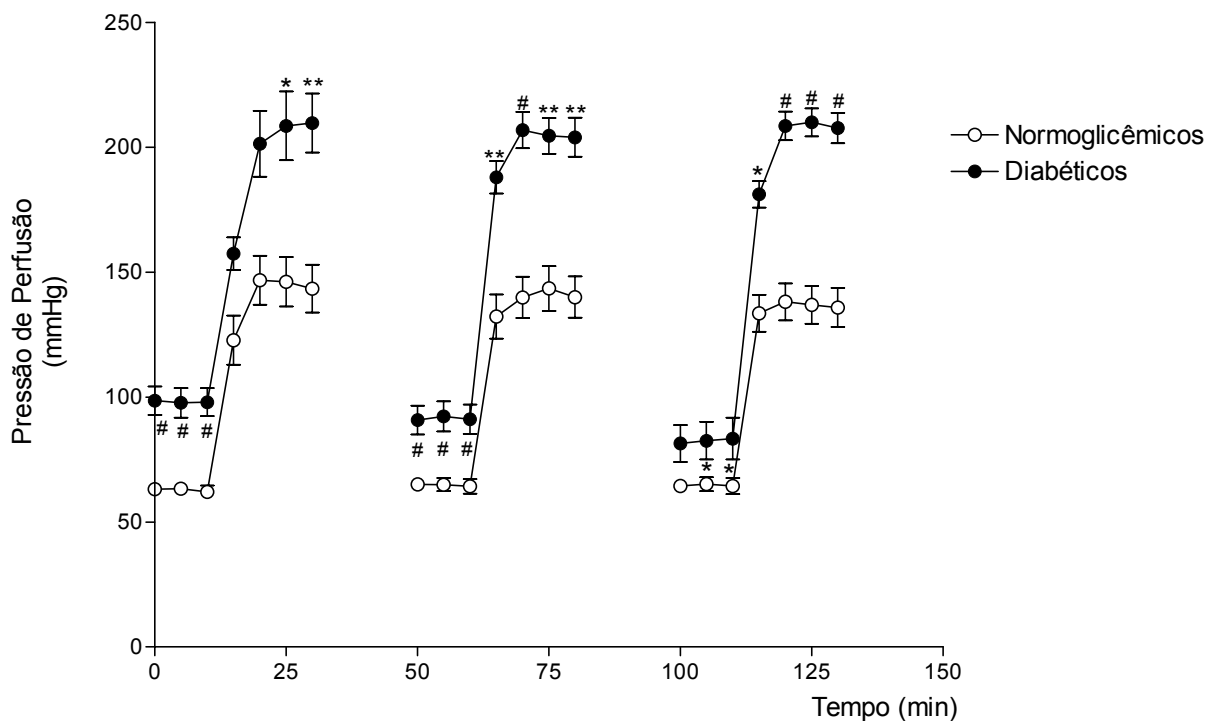
Os tratamentos com GSH e rutina elevam o escape para níveis intermediários entre os animais diabéticos não tratados e os normoglicêmicos, sendo estatisticamente indistinguíveis desses últimos (tabela 5 e gráfico 5). Por outro lado, os incrementos pressóricos relativos nos grupos dos diabéticos – não tratados e tratados - são estatisticamente indistinguíveis daquele do grupo normoglicêmico (tabela 6 e gráfico 6).

**Tabela 1.** Pressões de perfusão de rins isolados de coelhos normais e diabéticos submetidos a três infusões de noradrenalina (valores medidos a cada 5 min).

Pressões de Perfusão (mmHg)					
Normoglicêmicos (n = 20)			Diabéticos (n = 7)		
C1	C2	C3	C1	C2	C3
63,15 ± 2,24	65,10 ± 2,35	64,45 ± 2,18	98,57 ± 5,70 #	90,85 ± 5,75 #	81,42 ± 7,40
63,35 ± 2,25	65,00 ± 2,58	65,15 ± 2,75	97,71 ± 5,92#	92,28 ± 5,99 #	82,57 ± 7,50*
62,15 ± 2,50	64,30 ± 2,90	64,40 ± 3,20	98,00 ± 5,58 #	91,14 ± 5,88 #	83,42 ± 8,34*
122,80 ± 9,83	132,25 ± 8,81	133,55 ± 7,39	157,42 ± 6,52	188,00 ± 6,45 **	181,14 ± 5,27*
146,85 ± 9,79	139,95 ± 8,22	138,15 ± 7,40	201,42 ± 3,22	206,85 ± 7,28 #	208,57 ± 5,75 #
146,15 ± 9,88	143,50 ± 8,98	136,90 ± 7,52	208,57 ± 13,77*	204,57 ± 7,19**	210,00 ± 5,58 #
143,40 ± 9,57	140,05 ± 8,26	135,90 ± 7,78	209,71 ± 11,79**	204,00 ± 7,80**	207,71 ± 6,08 #

\*p<0.05; \*\*p<0.01; #p<0.001, (ANOVA, teste de Tukey)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias



**Gráfico 1.** Pressões de perfusão em rim isolado de coelho a partir dos grupos controle (euglicêmicos) e diabéticos. Efeitos da NOR infundida três vezes por 20 min, com intervalos de 20 min para lavagem. Nos animais diabéticos, as pressões basais e máximas estão bastante elevadas e as curvas apresentam maior inclinação. Além disso, nos animais normais - ao contrário dos diabéticos - é perceptível o fenômeno de taquifilaxia. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; # $p < 0.001$  (ANOVA, teste de Tukey)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

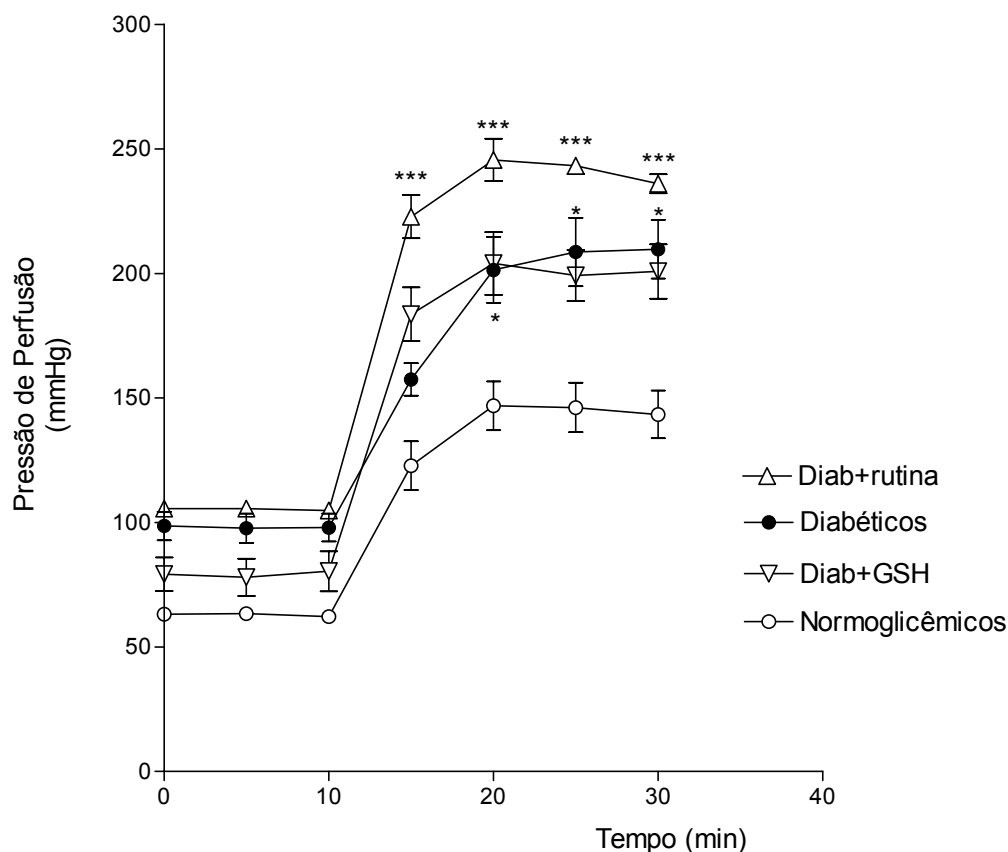


**Tabela 2.** Pressões de perfusão pela infusão contínua de GSH em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico não tratados e tratados com GSH 1 $\mu$ M e rutina 1 $\mu$ M (valores medidos a cada 5 min).

Pressões de Perfusão (mmHg)			
Normoglicêmicos (n = 20)	Diabéticos (n = 7)	Diabéticos+GSH (n = 5)	Diabéticos+Rutina (n = 5)
63,15 $\pm$ 2,24	98,57 $\pm$ 5,70	79,20 $\pm$ 6,77	105,60 $\pm$ 2,92
63,35 $\pm$ 2,25	97,71 $\pm$ 5,92	78,00 $\pm$ 7,48	105,60 $\pm$ 2,92
62,15 $\pm$ 2,50	98,00 $\pm$ 5,58	80,40 $\pm$ 7,98	104,80 $\pm$ 2,80
122,80 $\pm$ 9,83	157,42 $\pm$ 6,52	183,60 $\pm$ 10,77	222,80 $\pm$ 8,73 ***
146,85 $\pm$ 9,79	201,42 $\pm$ 13,22 *	204,00 $\pm$ 12,55 *	245,60 $\pm$ 8,49 ***
146,15 $\pm$ 9,88	208,57 $\pm$ 13,77 *	199,20 $\pm$ 10,30 *	243,20 $\pm$ 3,26 ***
143,40 $\pm$ 9,57	209,71 $\pm$ 11,79 *	200,80 $\pm$ 10,89 *	236,00 $\pm$ 3,84 ***

\*p<0.05; \*\*\*p<0.0001 (Testes 't' não pareados)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.



**Gráfico 2.** Comparação entre as pressões de perfusão em leito arteriolar de rins isolados de coelhos e submetidos a infusão de NOR. Foram usados animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M). Os diabéticos não tratados apresentam pressões basal e máxima superiores às dos normoglicêmicos, além de um prejuízo no escape. O tratamento com GSH parece reduzir as pressões basal e máxima dos diabéticos, além de exibir recuperação no escape. Todavia, o tratamento com rutina não altera significativamente as pressões basais do grupo diabético, mas aumenta a reatividade vascular noradrenérgica e o escape. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.0001$  (Testes 'T' não pareados em relação ao grupo normoglicêmico)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

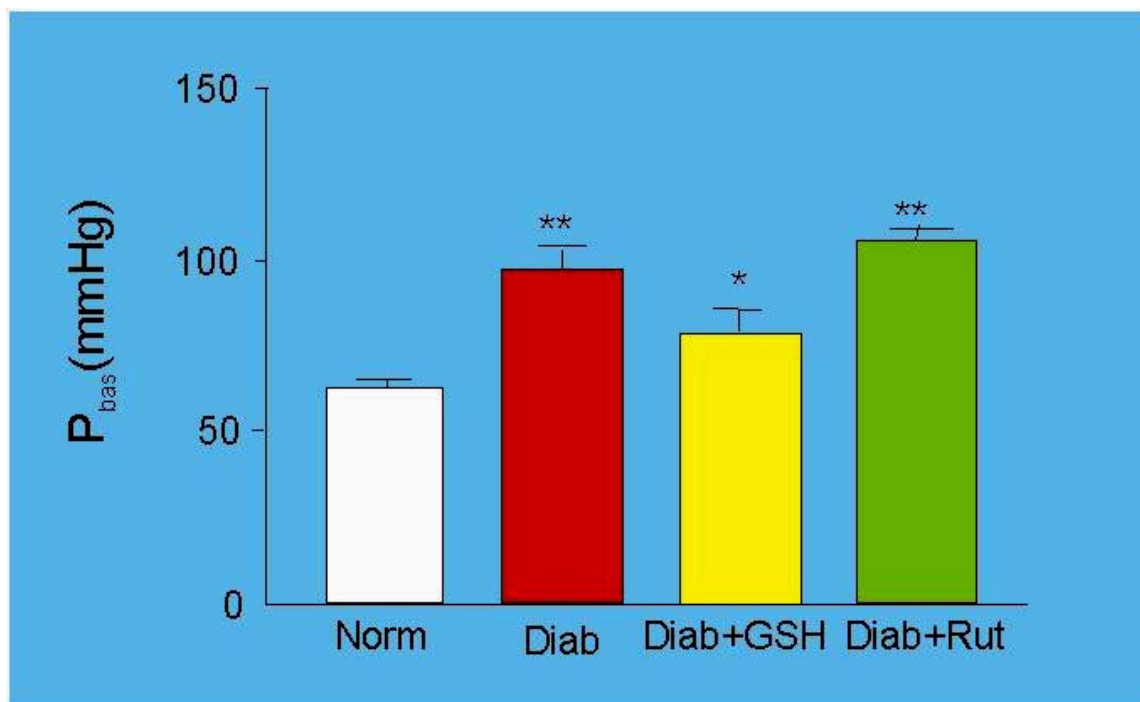
**Tabela 3.** Pressões basais de perfusão pela infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M).

Pressões Basais (mmHg)			
Normoglicêmicos (n = 20)	Diabéticos** (n = 7)	Diabéticos + GSH* (n = 5)	Diabéticos + Rutina** (n = 5)
62,88 $\pm$ 2,29	98,09 $\pm$ 5,69**	79,20 $\pm$ 7,38*	105,20 $\pm$ 2,76**

\* P < 0,05 em relação ao grupo normoglicêmico (ANOVA, teste deTukey)

\*\* P < 0,001 em relação ao grupo normoglicêmico (ANOVA, teste de Tukey)

**Nota:** estão representados as médias (dos valores medidos em t<sub>0</sub>, t<sub>5</sub> e t<sub>10</sub>) e os erros padrões das médias.



**Gráfico 3.** Comparação entre as pressões basais do leito arteriolar de rins isolados de coelhos quando submetidos a infusão de NOR. Utilizou-se um sistema de perfusão aberto com solução de Krebs-Henseleit. Constatou-se que os níveis pressóricos basais acham-se elevados nos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos, sendo que o tratamento com glutathione reduzida (GSH) reduz parcialmente esse efeito, ao passo que a rutina provoca um ligeiro aumento. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo normoglicêmico \*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo normoglicêmico (ANOVA, teste de Tukey)

**Nota:** estão representados as médias (dos valores medidos em  $t_0$ ,  $t_5$  e  $t_{10}$ ) e os erros padrões das médias.

**Tabela 4.** Pressões máximas de perfusão pela infusão contínua de GSH em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M).

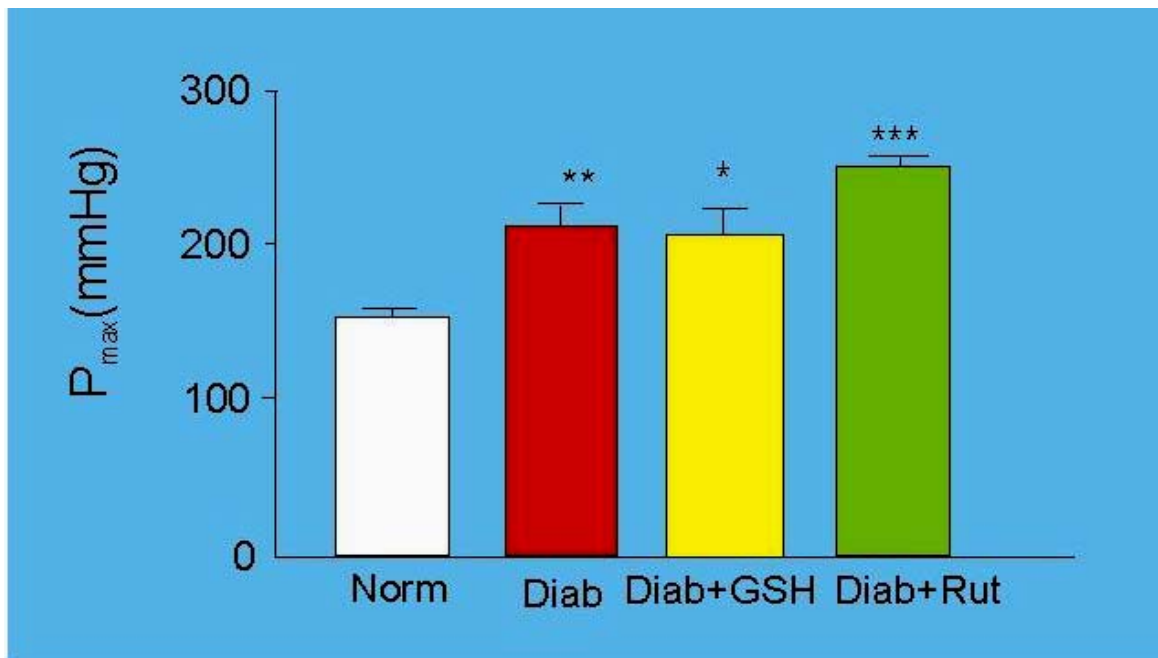
Pressões Máximas (mmHg)			
Normoglicêmicos (n=20)	Diabéticos** (n=7)	Diabéticos + GSH* (n=5)	Diabéticos + Rutina*** (n=5)
152.25 $\pm$ 10.02	211,71 $\pm$ 12,92	207,20 $\pm$ 11,46	249,60 $\pm$ 4,57

\* P < 0,05 em relação ao grupo normoglicêmicos (ANOVA, Tukey's test)

\*\* P < 0,01 em relação ao grupo normoglicêmicos (ANOVA, Tukey's test)

\*\*\* P < 0,001 em relação ao grupo normoglicêmicos (ANOVA, Tukey's test)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.



**Gráfico 4.** Comparação entre as pressões máximas de perfusão no leito arteriolar de rins isolados de coelhos, quando submetidos a infusão de NOR. A perfusão foi realizada em sistema aberto, com solução de Krebs-Henseleit. Em todos os grupos de animais diabéticos - inclusive naqueles tratados com glutathione reduzida (GSH) e rutina -, a pressão máxima atingida é superior à do grupo de euglicêmicos. Todavia, o tratamento com GSH provoca pequena redução em relação aos diabéticos não tratados. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo normoglicêmico \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo normoglicêmico. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo normoglicêmico

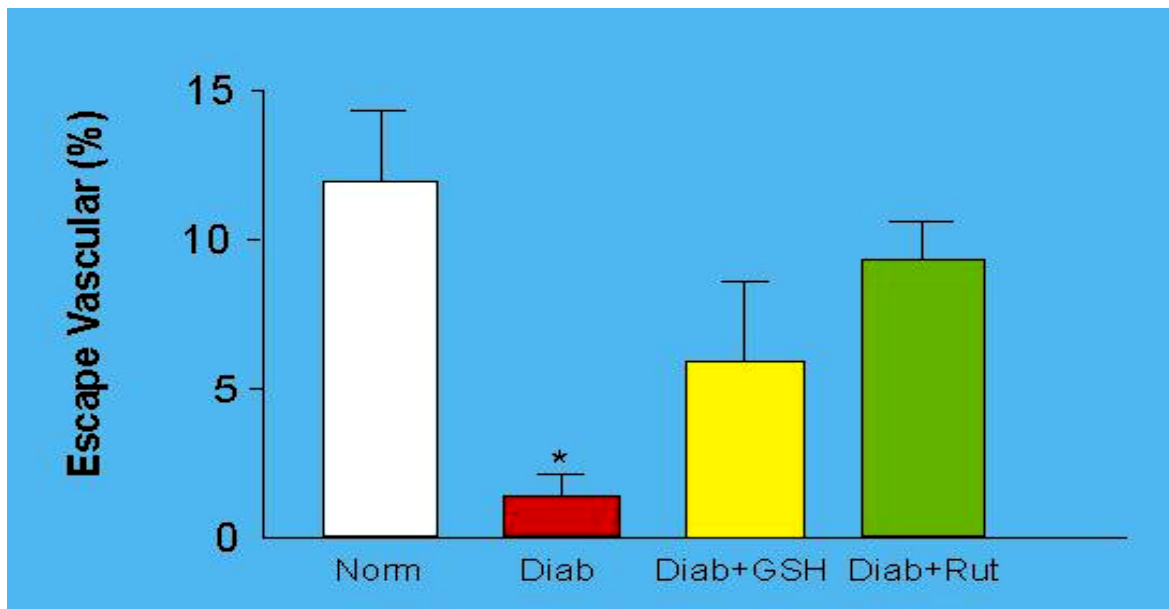
**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

**Tabela 5.** Escape vascular após infusão contínua de GSH em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânicos, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M).

Escape Vascular (%)			
Normoglicêmicos (n=20)	Diabéticos* (n=7)	Diabéticos + GSH (n=5)	Diabéticos + Rutina (n=5)
11,95 $\pm$ 2,43	1,33 $\pm$ 0,88	5,95 $\pm$ 2,67	9,33 $\pm$ 1,33

\* P < 0,05 em relação ao grupo normoglicêmico (Teste 't' não pareado)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.



**Gráfico 5.** Comparação entre os escapes vasculares do leito arteriolar renal de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, após infusão de NOR nos rins isolados e perfundidos em sistema aberto, com solução de Krebs-Henseleit. Durante a perfusão, percebeu-se uma drástica redução do escape nos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos. Por outro lado, os tratamentos com glutathione reduzida (GSH) e rutina, ambas a  $1\mu\text{M}$ , elevaram os escapes para níveis estatisticamente indistinguíveis daqueles do grupo normoglicêmico (embora o tratamento com rutina pareça intensificar o escape mais do que o tratamento com GSH). No grupo normoglicêmico, 80% dos rins perfundidos apresentaram escape, ao passo que, no grupo diabético, apenas 43%. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo normoglicêmico (teste 't' não pareado)

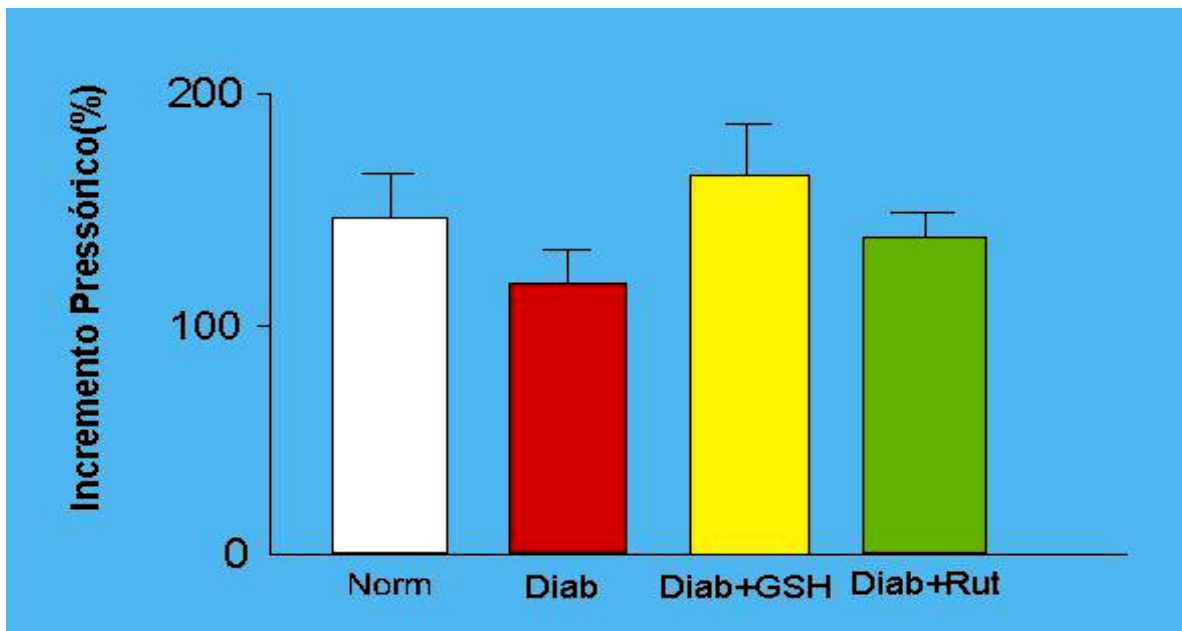
**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.



**Tabela 6.** Incremento pressórico após infusão contínua de GSH em leito arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e com diabetes aloxânico, não tratados e tratados com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M).

<b>Incremento Pressórico (%)</b>			
<b>Normoglicêmicos</b> (n=20)	<b>Diabéticos</b> (n=7)	<b>Diabéticos + GSH</b> (n=5)	<b>Diabéticos + Rutina</b> (n=5)
<b>148,42 <math>\pm</math> 17,43</b>	<b>119,13 <math>\pm</math> 15,08</b>	<b>165,52 <math>\pm</math> 22,90</b>	<b>139,20 <math>\pm</math> 9,92</b>

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias; nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.



**Gráfico 6.** Comparação entre os incrementos pressóricos do leito arteriolar renal de coelhos normoglicêmicos e diabéticos, após infusão de NOR nos rins isolados. Utilizou-se solução de Krebs-Henseleit em sistema de aberto de perfusão. Nos animais diabéticos, estando os níveis basais aumentados, observa-se uma redução no incremento pressórico relativo. Os tratamentos com GSH (1 $\mu$ M) e rutina (1 $\mu$ M) parecem restaurá-lo. No entanto, os dados não atingiram o nível de confiança de 95% (ANOVA).  $\text{Incremento Pressórico} = (P_{\text{max}} - P_{\text{bas}}) \cdot 100 / P_{\text{bas}}$

Os resultados estão representados em médias e os erros padrões das médias.

### 4.3. Bloqueio de NOS e Hipotermia

Os tratamentos com L-arginina ou seus análogos resultaram em alterações significativas nas pressões de perfusão em relação ao grupo controle. O grupo da L-arginina ( $1\mu\text{M}$ ) mostrou uma curva pressórica mais lenta, com uma discreta tendência à redução dos valores basais (11%) e uma acentuada redução dos valores máximos (47%), em relação aos do grupo controle (tabelas 7,8 e 9; gráficos 7,8 e 9), tendo essa última marca atingido nível de significância de 99% em relação ao controle ( $p<0,01$ ). Todavia, o tratamento com D-arginina ( $1\mu\text{M}$ ) exibiu resultados opostos – uma curva íngreme, com pressões basais superiores (30%) e pressões máximas mais elevadas (25%) do que as do grupo controle (tabelas 7,8 e 9; gráficos 7,8 e 9). O grupo tratado com L-NMA ( $10\mu\text{M}$ ) mostrou significância estatística ( $p<0,01$ ) em relação ao controle, registrando um aumento de cerca de 44% na pressão máxima média (tabela 9 e gráfico 9). No entanto, tal tratamento não afetou significativamente as pressões basais (tabela 8 e gráfico 8). Por sua vez, o grupo tratado com L-nitro-arginina ( $10\mu\text{M}$ ) registrou uma elevação de cerca de 40% na pressão basal em relação ao controle ( $p<0,001$ ; tabela 8 e gráfico 8). Todos os tratamentos com análogos da L-arginina mostraram uma tendência de redução do escape vascular, ao passo que o grupo da própria L-arginina mostrou tendência à elevação desse parâmetro (tabela 10 e gráfico 10). Todavia, nenhum desses grupos

atingiu a significância estatística de 95%. Quanto ao incremento pressórico relativo, apenas o grupo tratado com L-arginina atingiu o nível de confiança desejado ( $p < 0,01$ ), mostrando uma redução de cerca de 70% (tabela 11 e gráfico 11). Os análogos da L-arginina mostraram ora elevação ora redução do incremento, mas sem significância estatística.

No corrente estudo, a perfusão de rins isolados de coelhos sob hipotermia constante ( $25^{\circ}\text{C}$ ) produziu, em relação ao grupo controle, elevação das pressões basais - da ordem de 12% - e máximas - da ordem de 18% - (tabelas 8 e 9; gráficos 8 e 9), bem como redução de cerca de 45% no escape (tabela 10 e gráfico 10). Todavia, esses resultados precisam ser encarados com reserva, já que não alcançaram significância estatística de 95%.

O parâmetro mais errático desse trabalho foi seguramente a taquifilaxia - nenhum dos grupos mostrou resultados estatisticamente satisfatórios ( $P < 0,05$ ; testes 't' pareados). O grupo controle foi o único a registrar certa regularidade no comportamento da curva média: pequenos decréscimos nos valores pressóricos máximos a cada ciclo de infusão de NOR, na segunda e na terceira curva - cerca de 4% de C1 a C2 e 3% de C2 a C3 (tabela 12 e gráfico 12). O grupo tratado com L-arginina não mostrou taquifilaxia - ao contrário, os valores máximos aumentaram com a

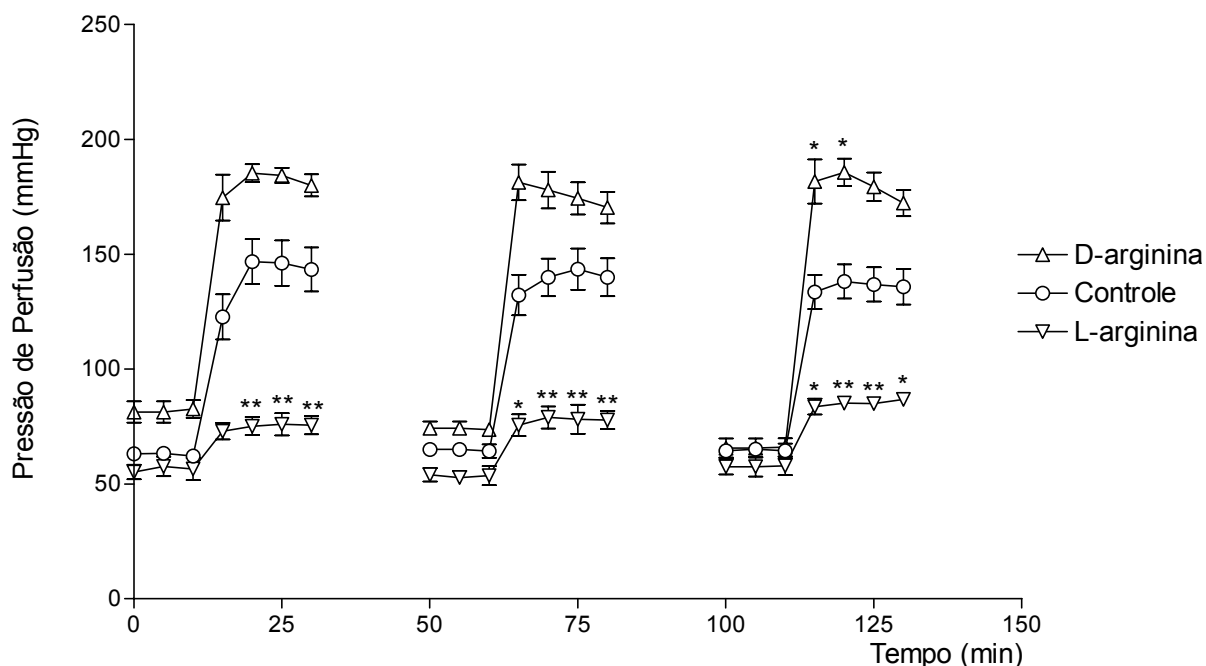
repetição das infusões. O grupo sob hipotermia mostrou um decréscimo de cerca de 11% de C1 a C2 – caracterizando taquifilaxia –, mas nenhum decréscimo de C2 a C3. No entanto, tais resultados também devem ser vistos com reserva, pois, ficaram aquém do nível de confiança de 95%.

**Tabela 7.** Pressões de perfusão durante uma sequência de três infusões de nor (com intervalos de 20 min) em leite arteriolar de rins isolados de coelhos normoglicêmicos e tratados com L-arginina e D-arginina (ambas a 1µm).

Pressões de Perfusão (mmHg)								
Controle (n = 20)			L-arginina (n = 6)			D-arginina (n = 6)		
C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
63,15±2,24	65,10±2,35	64,45±2,18	55,16±3,16	54,00±2,92	57,50±3,36	81,33±4,66	74,33±2,89	65,66±4,07
63,36±2,25	65,00±2,58	65,15±2,75	57,66±4,26	52,83±2,90	57,50±4,28	81,33±4,66	74,33±2,89	65,66±4,07
62,15±2,50	64,30±2,90	64,40±3,20	56,50±4,75	53,66±4,10	57,83±4,00	82,66±3,88	73,66±2,38	66,00±3,96
122,80±9,83	132,25±8,81	133,55±7,39	73,00±3,60	75,66±4,73 *	83,66±3,48 *	174,66±9,98	181,33±7,79	181,66±9,62 *
146,85±9,79	139,95±8,22	138,15±7,40	75,16±3,91 **	79,00±4,81 **	85,16±2,66 **	185,33±3,92	178,00±7,94	185,66±5,94 *
146,15±9,88	143,50±8,98	136,90±7,52	76,00±4,89 **	78,16±6,29 **	85,00±2,04 **	184,33±3,32	174,33±7,01	179,33±6,16
143,40±9,57	140,05±8,26	135,90±7,78	75,66±4,01 **	77,83±3,93 **	86,83±2,37 *	180,00±4,81	170,33±6,88	172,33±5,66

\*P<0,05; P<0,01 (ANOVA, teste de Tukey)

Nota: estão representados as médias e os erros padrões das médias.



**Gráfico 7.** Pressões de perfusão em rim isolado de coelho a partir do grupo controle e dos grupos tratados com L-arginina (1  $\mu$ M) e D-arginina (1  $\mu$ M). Efeitos da NOR infundida por 20 min três vezes consecutivas, com intervalos de 20 min para lavagem. Percebe-se que, no grupo tratado com a forma 'L' do aminoácido (conhecido substrato para a síntese de NO), ocorre uma lentificação da curva pressórica, bem como uma redução drástica na pressão máxima atingida e no escape vascular nas três curvas - resultados opostos àqueles obtidos com a forma 'D' do aminoácido, a qual pode servir como falso substrato para a via do NO. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (ANOVA teste de Tukey)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

**Tabela 8.** Pressões basais de perfusão pela infusão contínua de GSH em leito arteriolar de rins isolados de coelhos sob hipotermia (25°C) e tratados com LNMA (10µM), L- nitro-arginina (10µM), D- arginina (1µM) e L- arginina (1µM).

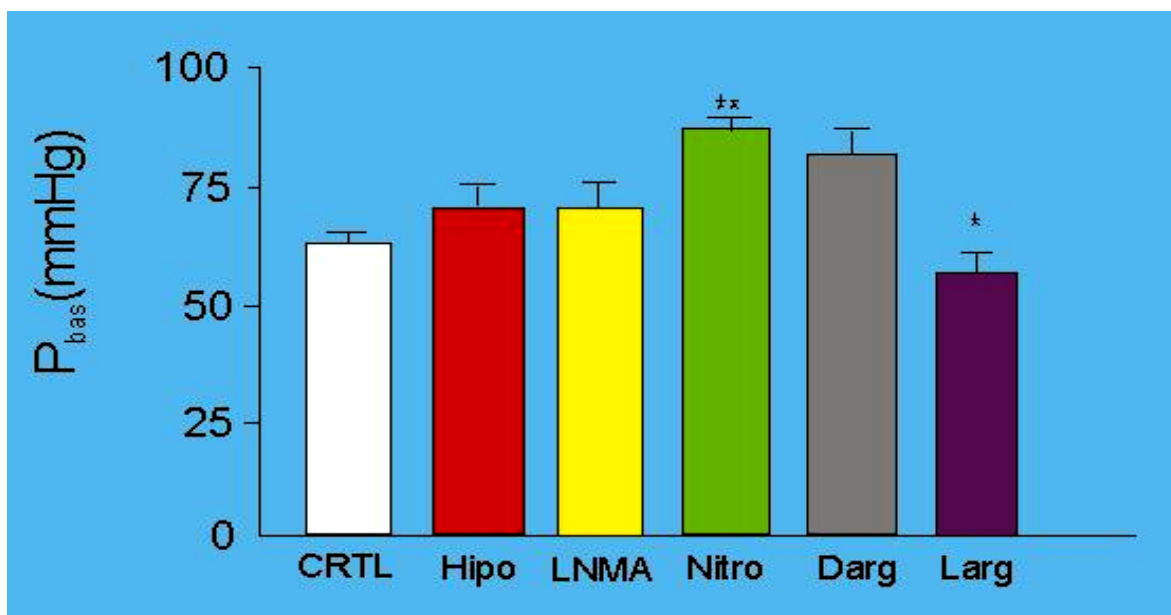
Pressões Basais (mmHg)					
Controle (n = 20)	Hipotermia (n = 7)	LNMA (n = 4)	L-Nitro- arginina** (n = 11)	D-arginina (n = 6)	L-Arginina* (n = 6)
62.88 ± 2.29	70.85 ± 2.98	70.58 ± 4.00	87.42 ± 7.12	82.00 ± 4.23	56.44 ± 3.97

\* P < 0,05 em relação ao grupo L-nitro-arginina (ANOVA, Tukey's test)

\*\* P < 0,001 em relação ao grupo controle (ANOVA, Tukey's test)

**Nota:** estão representados as médias (dos valores medidos em t<sub>0</sub>, t<sub>5</sub> e t<sub>10</sub>) e os erros padrões das médias.





**Gráfico 8.** Comparação entre as pressões basais do leito arteriolar de rins isolados de coelhos quando submetidos a infusão de NOR. Utilizou-se um sistema de perfusão aberto com solução de Krebs-Henseleit. Tanto o grupo sob hipotermia (25°C) como os tratados com análogos da L-arginina parecem apresentar pressões basais superiores às do grupo controle, sendo que apenas o tratamento com L-nitro-arginina (10  $\mu$ M) mostrou resultados estatisticamente significativos em relação ao controle. O tratamento com L-arginina (1  $\mu$ M) parece reduzir as pressões basais. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo D-arginina \*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo controle

**Nota:** estão representados as médias (dos valores medidos em  $t_0$ ,  $t_5$  e  $t_{10}$ ) e os erros padrões das médias.

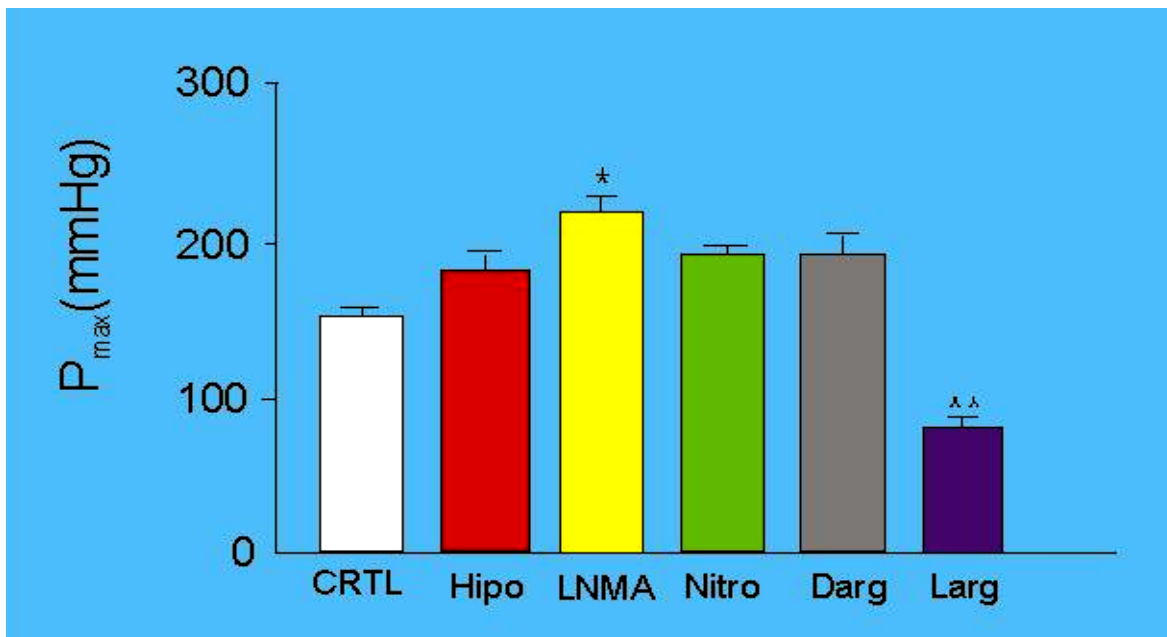
**Tabela 9.** Pressões máximas de perfusão pela infusão contínua de NOR em leito arteriolar de rins isolados de coelhos sob hipotermia (25°C) e tratados com LNMA (10µM), L- nitro-arginina (10µM), D- arginina (1µM) e L- arginina (1µM).

Pressões Máximas (mmHg)					
Controle (n = 20)	Hipotermia (n = 7)	LNMA (n = 4)	L-Nitro- arginina (n = 11)	D-arginina (n = 6)	L-Arginina* (n = 6)
152.25±10.02	180.42±12.28	219.00±10.34	191.09±14.75	191.33±3.21	80.66±3.67

\* P < 0,05 em relação ao grupo L-nitro-arginina (ANOVA, Tukey's test)

\*\* P < 0,001 em relação ao grupo controle (ANOVA, Tukey's test)

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.



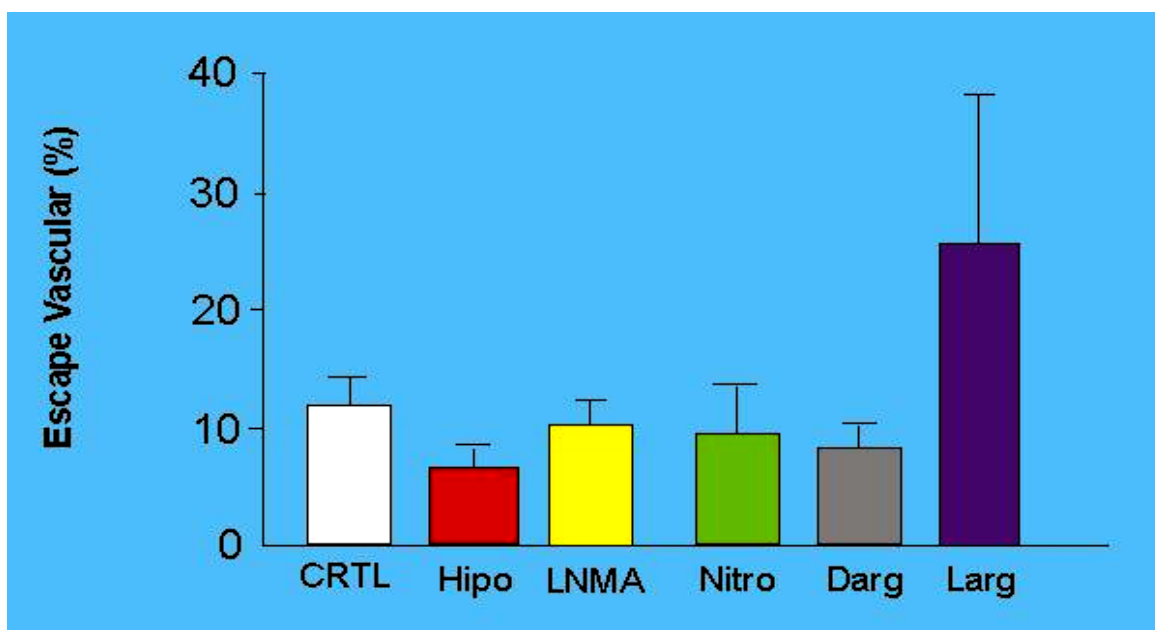
**Gráfico 9** - Comparação entre as pressões máximas do leito arteriolar de rins isolados de coelhos quando submetidos a infusão de NOR. Utilizou-se um sistema de perfusão aberto com solução de Krebs-Henseleit. Tanto o grupo sob hipotermia (25°C) como os tratados com LNMA (10  $\mu$ M), L-nitro-arginina (10  $\mu$ M) e D-arginina (1  $\mu$ M) apresentam pressões máximas mais elevadas do que a do grupo controle. No entanto, o tratamento com L-arginina (1  $\mu$ M) reduz a pressão máxima consideravelmente. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo controle e  $p < 0.001$  em relação ao grupo D-arginina

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

**Tabela 10.** Escape vascular de leito arteriolar de rins isolados de coelhos após infusão contínua de GSH, submetidos a hipotermia (25°C) e a tratamento com LNMA (10 $\mu$ M), L-nitro-arginina (10 $\mu$ M), D-arginina (1 $\mu$ M) e L-arginina (1 $\mu$ M).

Escape Vascular (%)					
Controle (n = 20)	Hipotermia (n = 7)	LNMA (n = 4)	L-Nitro- arginina (n = 11)	D-arginina (n = 6)	L-Arginina (n = 6)
11,95 $\pm$ 2,43	6,49 $\pm$ 2,17	10,01 $\pm$ 2,37	9,55 $\pm$ 4,51	8,18 $\pm$ 2,29	25,49 $\pm$ 12,74

**Notas:** estão representados as médias e os erros padrões das médias; nenhum grupo atingiu significância estatística (ANOVA e teste 't' não pareado).



**Gráfico 10** - Comparação entre os escapes vasculares do leito arteriolar renal de coelhos euglicêmicos, após infusão de NOR. Os rins foram isolados e perfundidos em sistema aberto com solução de Krebs-Henseleit. Os dados foram obtidos dos grupos controle, sob hipotermia (25°C) e tratados com LNMA (10  $\mu$ M), L-nitro-arginina (10  $\mu$ M), D-arginina (1  $\mu$ M) e L-arginina (1  $\mu$ M). O grupo submetido a hipotermia apresentou os escapes mais baixos de todos, ao passo que o grupo da L-arginina apresentou os valores mais elevados. Todavia, não se atingiu o nível estatístico de 95% de confiança em qualquer dos grupos se comparados ao controle (ANOVA e teste 't' não pareado).

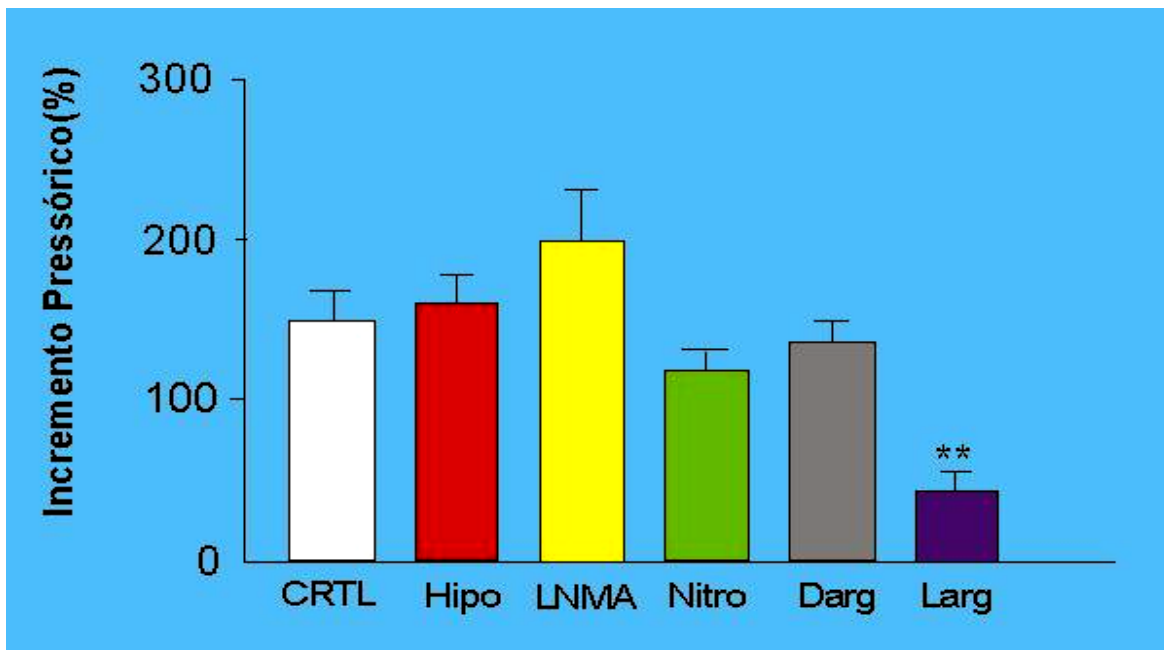
**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

**Tabela 11.** Incremento pressórico após infusão contínua de GSH em leito arteriolar de rins isolados de coelhos e submetidos a hipotermia (25°C) e a tratamento com LNMA (10μM), L- nitro-arginina (10μM), D-arginina (1μM) e L-arginina (1μM).

Incremento Pressórico (%)					
Controle (n = 20)	Hipotermia (n = 7)	LNMA (n = 4)	L-Nitro- arginina (n = 11)	D-arginina (n = 6)	L- Arginina*** (n = 6)
148.42±17.43	159.28±18.78	198.00±33.66	118.18±13.40	134.94±15.17	43.06±11.24

\*\* P < 0,01 em relação ao grupo controle (ANOVA, Tukey's test)

**Notas:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.



**Gráfico 11** - Comparação entre os incrementos pressóricos de rins isolados de coelhos, perfundidos, em sistema aberto, com solução de Krebs-Henseleit e após infusão de NOR. A hipotermia (25°C) e a adição de LNMA (10μM) tendem a elevar o incremento, ao passo que os tratamentos com L-nitro-arginina (10μM) e D-arginina (1μM) parecem reduzi-lo. Todavia, o único resultado estatisticamente significativo em relação ao controle foi a redução do incremento pressórico pelo tratamento com L-arginina (1μM).  
 Incremento Pressórico=  $(P_{max} - P_{bas}) \cdot 100 / P_{bas}$  \*\*p<0.01 em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Tukey)

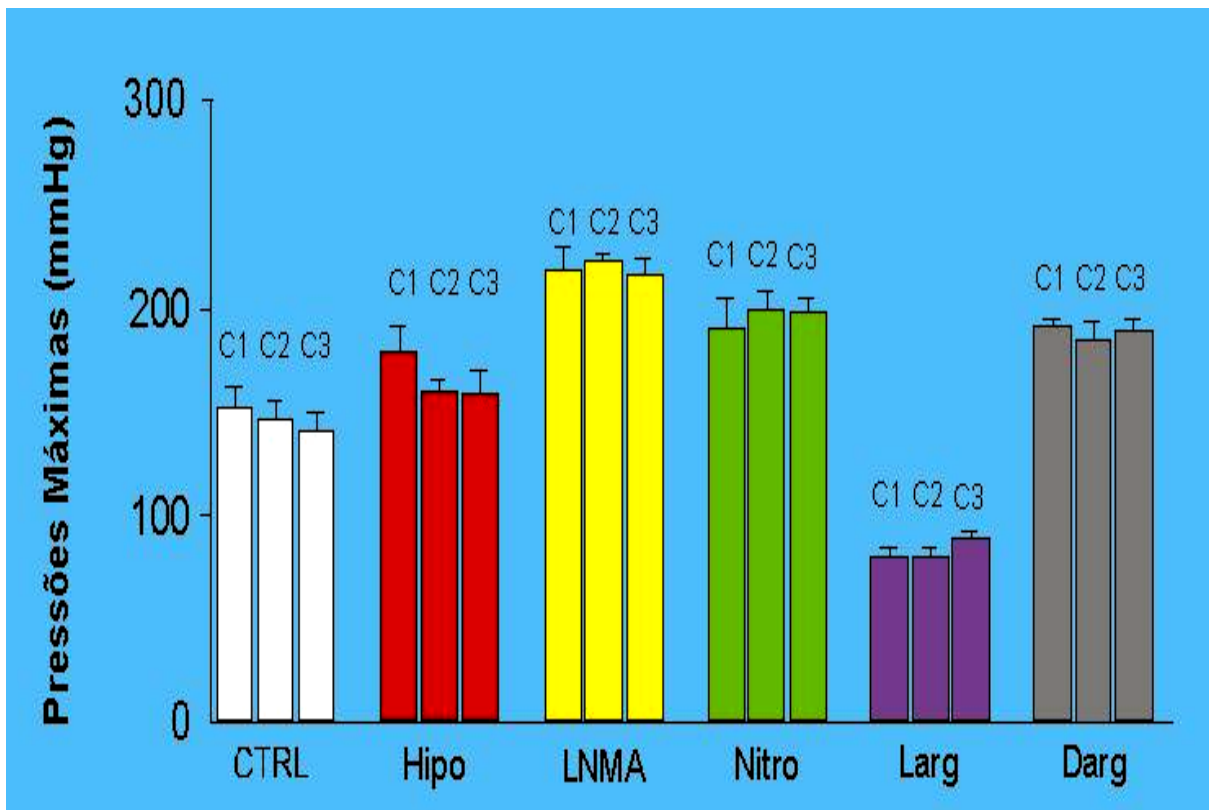
**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

**Tabela 12.** Pressões máximas após três infusões de GSH (curvas 1, 2 e 3, com intervalos de 20 min entre cada uma) em leito arteriolar de rins isolados de coelhos e submetidos a hipotermia (25°C) e a tratamento com LNMA (10µM), L-nitro-arginina (10µM), D-arginina (1µM) e L-arginina (1µM).

<b>Pressões Máximas (mmHg) durante 3 infusões de NOR</b>					
<b>Controle (n = 20)</b>	<b>Hipotermia (n = 7)</b>	<b>LNMA (n = 4)</b>	<b>L-Nitro- arginina (n = 11)</b>	<b>D-arginina (n = 6)</b>	<b>L-Arginina (n = 6)</b>
152.25±10.02	180.42±12.28	219.00±10.34	191.09±14.75	191.33±3.21	80.66±3.67
146.85±9.19	159.28±7.00	224.00±2.94	199.18±10.06	184.33±8.50	82.83±5.38
142.10±7.56	159.00±11.93	216.75±6.75	198.72±7.98	189.33±5.97	88.66±3.25

**Notas:** estão representados as médias e os erros padrões das médias; nenhum grupo alcançou significância estatística (teste 't' pareado).





**Gráfico 12.** Comparação entre as pressões máximas atingidas durante uma sequência de três infusões de NOR (curvas 1, 2 e 3) em rins isolados de coelhos, com o intuito de avaliar o fenômeno de taquifilaxia. Valores obtidos dos grupos controle, sob hipotermia (25°C) e tratados com LNMA (10  $\mu$ M), L-nitro-arginina (10  $\mu$ M), D-arginina (1  $\mu$ M) e L-arginina (1  $\mu$ M). Nenhum deles alcançou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ; testes 't' pareados). No entanto, o grupo controle é o de resultados mais uniformes, registrando pequenos decréscimos na segunda e na terceira curva

**Nota:** estão representados as médias e os erros padrões das médias.

## 5. DISCUSSÃO

Na discussão dos resultados anteriormente descritos, analisaremos, basicamente, os efeitos (I) do diabetes, (II) da hipotermia e (III) do bloqueio de NOS na reatividade vascular – relacionando os achados do conjunto de experimentos realizados ao longo dos últimos anos com aqueles que obtivemos em nosso trabalho.

### 5.1. Normoglicêmicos *versus* Diabéticos

Os resultados de nosso trabalho estão em consonância com os de diversos autores (BRODY e DIXON, 1964; CSEUZ *et al.*, 1973; SZENTIVANYI e PÉK, 1973, e CHRISTLIEB, 1976). O diabetes aloxânico intensificou a resposta adrenérgica do leito arteriolar renal dos coelhos. Em 1964, BRODY & DIXON mediram a pressão arterial no quadril de ratos e também verificaram que os valores estavam elevados durante o diabetes aloxânico. Da mesma forma, CSEUZ, *et al.*, 1973, trabalhando com aortas de ratos diabéticos, constataram uma exacerbação da resposta à NOR. Estudos com seres humanos demonstraram igualmente um aumento na resposta alfa-agonista do leito vascular conjuntival de pacientes diabéticos (SZENTIVANYI & PÉK, 1973). Em 1979, COSTA e FORTI e FONTELES realizaram um trabalho sobre a sensibilidade noradrenérgica em rins

isolados de coelhos com diabetes aloxânico. Todavia, ao contrário de diversos outros autores, tais experimentos revelaram um decréscimo na resposta noradrenérgica. Aventou-se a possibilidade de uma alteração na conformação do  $\alpha$ -receptor, hipótese que parece ser reforçada pelo trabalho de CSEUZ, *et al.*, 1973, no qual um  $\beta$ -bloqueador – o propranolol – conseguiu bloquear o  $\alpha$ -receptor. Outra possibilidade poderia ser a redução na população de receptores ou alterações nos sítios do  $\text{Ca}^{++}$ , especialmente em pequenos vasos de resistência pré- e pós-capilares (FOLKOW, 1976). Por outro lado, não se pode desconsiderar a hipótese de que a atenuação na resposta adrenérgica, verificada por FONTELES & COSTA e FORTI no trabalho supracitado, talvez represente um estágio precoce nas alterações patogênicas do diabetes. Em 1998, COSTA e FORTI e FONTELES voltaram a investigar o relaxamento dependente de endotélio em rins de coelhos diabéticos. Houve um decréscimo na resposta vasodilatadora à Ach ( $10^{-7}$  M a  $10^{-5}$  M) e à bradicinina ( $10^{-8}$  M a  $10^{-7}$  M), efeito esse revertido pela administração de um doador de NO – o nitroprussiato de sódio ( $10^{-8}$  M a  $10^{-7}$  M). Tais resultados reforçam a tese de que, no diabetes, o prejuízo na vasodilatação está ligado à resposta celular endotelial, o que acarretaria alterações no escape.

O corrente estudo revelou um prejuízo na capacidade de relaxamento do leito arteriolar renal dos animais com diabetes aloxânico - expresso por pressões basais e máximas aumentadas e escape reduzido,

em relação aos animais normoglicêmicos. Com efeito, uma exagerada responsividade à NOR em leito arteriolar renal de coelhos diabéticos foi constatada por BERETTA-PICCOLI & WEIDMANN, em 1981. BRODSKY, *et al.* (2000), demonstraram que a exposição aguda de células endoteliais humanas a glicose, a níveis detectados no plasma de pacientes diabéticos, resulta em significativa deficiência na resposta a agonistas das eNOS (bradicinina e A-23187). Ainda segundo o mesmo trabalho, a própria glicose exerce efeito tipo “scavenging” sobre o NO, reduzindo sua concentração em soluções puras de NO, às quais se acrescentou o carboidrato. Em conjunto, tais achados indicam que a hiperglicemia promove a inativação química do NO, conseqüentemente, contribuindo para a elevação dos níveis pressóricos basais e máximos, sob ação da NOR, bem como uma reduzida capacidade de escape.

Em nossa pesquisa, fizemos uma ampla revisão bibliográfica sobre a glutathione (GSH) – um importante tripeptídeo endógeno que desempenha uma variedade de importantes funções fisiológicas e metabólicas nas células de todos os mamíferos, incluindo neutralização de radicais livres (AKERBOOM, *et al.*, 1984). No presente trabalho, a glutathione foi utilizada para aferir a participação do estresse oxidativo na redução do escape vascular do leito renal de coelhos diabéticos. A conjugação da GSH serve para limitar e regular a reatividade de compostos eletrofílicos e

metais, além de facilitar seu transporte através da membrana celular, de modo a eliminá-los do organismo. Ademais, em muitos casos, tais conjugações resultam na formação de intermediários biológicos essenciais. Por exemplo, a S-nitrosoglutationa, um intermediário relativamente estável, resultante de uma reação não enzimática do NO com a GSH intracelular, parece apresentar as mesmas funções biológicas do próprio NO (IGNARRO, 1990). A glutathione é biossintetizada principalmente no fígado, a partir de três aminoácidos precursores: L-glutamato, L-cisteína e glicina. Todos os organismos aeróbios estão sujeitos ao estresse oxidativo, isto é, os efeitos deletérios dos assim chamados compostos reativos de oxigênio, como peróxido e peróxido de hidrogênio. No diabetes, esse estresse é intensificado (OBROSOVA, *et al.*, 2002). Trabalhando com ratos espontaneamente hipertensivos (SHR), ABEYWARDENA e HEAD (2001) fizeram interessantes achados: anéis de vasos sanguíneos tratados com L-nitro-arginina exibiam resposta vasoconstritora à Ach, resposta essa que foi parcialmente abolida pela adição de rutina. Todavia, a contração induzida apenas pela L-nitro-arginina não foi abolida por esse antioxidante, sugerindo diferentes mecanismos envolvidos na contração espontânea e naquela induzida por Ach. Desse modo, o efeito do tratamento com rutina em leito arteriolar renal de coelhos normoglicêmicos merece ser investigado no futuro, sobretudo para justificar o incremento pressórico.

## 5.2. Efeitos da Hipotermia e do Bloqueio de NOS

Em alguns leitos vasculares, como as artérias sistêmicas e as coronárias, a hipotermia progressiva – de 37 a 20°C - pode induzir vasodilatação, possivelmente mediada por receptores muscarínicos (PEARSON, *et al.*, 1998). SPEZIALI, *et al.*, 1993, trabalhando com artérias cerebrais médias de cordeiros recém-nascidos, isoladas e perfundidas com solução de Krebs e submetidas a hipotermia progressiva – de 37 a 21°C -, observaram uma elevação na contratilidade dos vasos. Por outro lado, os pré-tratamentos com um inibidor  $\alpha$ -adrenérgico inespecífico – a fentolamina ( $10^{-5}$  M) –, um inibidor de NOS – L-NAME ( $10^{-4}$  M) – e um inibidor de COX – a indometacina ( $10^{-5}$  M) – não afetaram a resposta contrátil à baixa temperatura. Tais achados sugerem que as vias adrenérgica, do óxido nítrico e das COX não desempenham papel importante na resposta pressora induzida por hipotermia. Por outro lado, a maior contratilidade do leito arteriolar renal, quando submetido a hipotermia (25° C), pode, pelo menos em parte, dever-se à inibição de bombas transmembrana – hipótese proposta por HOCHACHKA (1986) –, resultando em aumento dos níveis intracelulares de cálcio e ativação de fosfolipases, as quais, por sua vez, podem causar a rápida liberação das reservas internas desse íon. COSTA e

FORTI e FONTELES (1989) demonstraram uma correlação entre os níveis intracelulares de cálcio e a taquifilaxia – um aumento na concentração desse íon no perfusato foi suficiente para reverter a taquifilaxia, pelo menos ao nível da segunda curva. No grupo sob hipotermia, só foi observada taquifilaxia ao nível da terceira curva (tabela 12 e gráfico 12).

A via do NO está, sem sombra de dúvida, implicada na reatividade vascular. Todavia, os mecanismos pelos quais a L-arginina aprimora a função endotelial ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que esse aminoácido é um precursor do NO, facilitando a vasodilatação endotélio-dependente em humanos e animais hipercolesterolêmicos, além de reduzir ateromas em animais experimentais. LEKAKIS, *et al.* (2002), administrando L-arginina a pacientes hipertensos, verificaram uma melhora da vasodilatação mediada por fluxo na artéria braquial. Por outro lado, altas doses, tanto de D-arginina quanto de L-arginina, causam hipotensão em indivíduos normotensos, indicando que esse efeito pode não envolver a via do NO (CALVER, *et al.*, 1991). Em nosso estudo, os efeitos opostos da D-arginina em relação à L-arginina, sugerem que os aminoácidos competem em diversos pontos da via metabólica do NO – desde o sistema transportador y<sup>+</sup> até o sítio de ligação da eNOS –, contribuindo para a uma síntese diminuída de NO, e, conseqüentemente, um prejuízo na capacidade vasodilatadora do leito arteriolar renal. No entanto, segundo

LEKAKIS, *et al.* (2002), há sérias razões para questionar a tese de que a L-arginina sirva apenas como mero substrato para síntese de NO. Deveras, em células cultivadas, a disparidade entre os altos níveis intracelulares de L-arginina comparados ao KM para a eNOS (FOSTERMANN, *et al.*, 1994) sugere outros papéis para o aminoácido. ARNAL, *et al.*, (1995) sugerem que a L-arginina talvez favoreça a liberação de NO via reversão do efeito inibitório da L-glutamina. Outro mecanismo seria a redução do estresse oxidativo vascular (BOGER, *et al.*, 1997 e 1998). Por sua vez, GIUGLIANO, *et al.* (1997), demonstraram, em um estudo in vivo, que a infusão endovenosa de L-arginina em seres humanos acentua a captação de glicose mediada por insulina através do aumento do fluxo sanguíneo periférica. Curiosamente, QUYYUMI (1998) verificou que a infusão endovenosa de ambos os enantiômeros da arginina em pacientes com doença aterosclerótica coronariana favoreceu a dilatação endotélio-dependente em resposta à Ach. PEREZ, *et al.* (1998), também constataram que L-arginina e D-arginina podem, a altas concentrações (100  $\mu$ M), exercer efeito semelhante - bloqueiam receptores histamínicos (H1) que medeiam a contração da traquéia de cobaias. Todavia, é sabido que a L-arginina, mas não a D-arginina, é capaz de reverter o efeito de inibidores de NOS sobre o relaxamento da musculatura lisa vascular (MONCADA, *et al.*, 1991). Em nosso experimento, o tratamento com L-arginina produziu resultados



teoricamente esperados – redução das pressões basais e máximas, bem como incremento do escape. O tratamento com D-arginina teve efeitos opostos, confirmando o papel relevante do NO na capacidade de relaxamento do leito arteriolar renal. Deveras, o uso do isômero não natural da L-arginina resultou, no corrente trabalho, na exacerbação da resposta pressora à NOR e prejuízo do escape vascular – o que pode ser interpretado como resultado de uma inibição da via enzimática do NO, já que essa tem especificidade pela L-arginina, não convertendo seu isômero ‘D’ em NO (MAHER, 2000). Nesse respeito, CRAEGER, *et al*, 1992, constataram, que a L-arginina – mas não a D-arginina – é capaz de melhorar a resposta vasodilatadora endotélio-dependente em humanos hipercolesterolêmicos. Por outro lado, NAGASE, *et al.*, 1997, propuseram, uma rota não enzimática para a produção do NO, a partir de uma reação do peróxido de hidrogênio tanto com L-arginina como D-arginina. Esse é um campo que merece mais investigação no futuro.

## 6. CONCLUSÕES

O diabetes eleva os valores pressóricos tanto basais como máximos no leito arterial de rins isolados de coelhos, infundidos com NOR, além de reduzir o escape vascular. O tratamento dos rins isolados com GSH reverte parcialmente esses efeitos. Por sua vez, o tratamento com rutina eleva os valores pressóricos e também reverte parcialmente a queda no escape.

O tratamento de rins isolados de coelhos normoglicêmicos com L-arginina aumenta a capacidade de relaxamento do leito arteriolar, ante a NOR, reduzindo a pressão máxima atingida e o incremento pressórico relativo, além de mostrar uma tendência à elevação do escape vascular. Por outro lado, o uso de análogos do aminoácido pode elevar tanto a pressão basal como a máxima, embora não altere significativamente o escape vascular.

A hipotermia (25° C) pode elevar a contratilidade vascular do leito arteriolar renal, além de reduzir o escape vascular.

A taquifilaxia é um fenômeno perceptível ao se infundir NOR repetidamente em rins isolados de coelhos, podendo ser afetado tanto pela

hipotermia quanto pelo estímulo ou bloqueio da via do NO. No entanto, tais efeitos precisam ser melhor investigados no futuro.

## 7. PERSPECTIVAS

Em experimentos futuros, devemos incrementar alguns elementos do protocolo de pesquisa em relação à Metodologia, tais como:

- Agrupar os animais por níveis glicêmicos;
- Tratar previamente os animais com L-arginina e seus análogos, bem como com antioxidantes.
- Comparar rins íntegros e sem endotélio.
- Utilizar outros bloqueadores: ODQ, L-NAME, indometacina, aminoguanidina etc.
- Induzir diabetes com STZ e acompanhar perfil glicêmico.
- Analisar o perfil lipídico.
- Tratar animais euglicêmicos com antioxidantes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYWARDENA, M.Y.; HEAD, R. **Dietary polyunsaturated fatty acid and antioxidant modulation of vascular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. J.Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.65,n.2 ,p.91 - 97, 2001.

AKERBOOM TP, BILZER M, SIES H. **Relation between glutathione redox changes and biliary excretion of taurocholate in perfused rat liver. J Biol Chem.** 259:5838-43, 1984.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON J. **Membrane Transport of Small Molecules and the Ionic Basis of Membrane Excitability. In: Molecular Biology of the Cell, 3rd ed, Garland New York & London: Publishing, Inc.; 1994, p.508-49. [chapter 11]**

ALMEIDA PJ, CABRAL ADE M, VASQUEZ EC. **[The endothelium as a modulator of vasomotor responses] Arq Bras Cardiol.** 60(5):347-56, 1993.

ANTON, R ; BERETZ, A. **Flavonoids: antithrombotic agents or nutrientes? Bull. Acad. Natle. Méd. , 174:6 - 709-14, 1990.**

ARNAL JF, MUNZEL T, VENEMA RC, JAMES NL, BAI CL, MITCH WE, HARRISON DG. **Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. J Clin Invest.** Jun;95(6):2565-72, 1995.

AVILA-CHAVEZ E, TORRES-Y-TORRES N, TOVAR-PALACIO AR. **New concept in anionic and cationic aminoacid transport. Rev Invest Clin** 1997; 49(5):411-24.

BALLOU, L. R., DEWITT, L. M., and CHEUNG, W. Y. **Substrate-specific forms of human platelet phospholipase A2. J. Biol. Chem.** 261, 3107-3111 (1986).

BARBUL A. **Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications.** JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1986 Mar-Apr;10(2):227-38. Review.

BARRON WM. **Hipertensão.** In: Barron WM, Lindheimer MD. **Complicações médicas na gravidez.** Porto Alegre: **Artes Médicas**; 1993. [capítulo 1]

BARROS CFS. **Efeito farmacológico de compostos fenólicos antioxidantes em alimentos;** Universidade de Aveiro, Portugal, 2003.

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

BELZER, F. O., and SOUTHARD, J. H. **Organ preservation and transplation.** In “**Transplation: Approaches to Graph Rejection**” (H. T. MERRYMAN, ED.), PP. 291-303. A. R. LISS, NEW YORK, 1986.

BENVENISTE J. **Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils.** Nature. 1974 Jun 7;249(457):581-2.

BERETTA – PICCOLI, C., P. WEIMANN: **Exaggerated pressor responsiveness to norepinephrine in non-azotmic diabetes mellitus.** Am. J. Med. 71: 829-835 (1981).

BERNHEIM J. **Pregnancy-induced hypertension in rats with adriamycin nephropathy is associated with an inadequate production of nitric oxide.** Hypertension. 29(4):986-91, 1997.

BOGER RH, BODE-BOGER SM, BRANDES RP, PHIVTHONG-NGAM L, BOHME M, NAFE R, MUGGE A, FROLICH JC. **Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin.** Circulation. 19;96(4):1282-90, 1997.

BOGER RH, BODE-BOGER SM, THIELE W, CREUTZIG A, ALEXANDER K, FROLICH JC. **Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease.** J Am Coll Cardiol.;32(5):1336-44, 1998

BOGLE RG, COADE SB, MONCADA S, PEARSON JD, MANN GE. **Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 31;180(2):926-32, 1991.

BOWERS, W. D., JR., HUBBARD, R. W., DUAM, R. C., ASHBAUGH, P., and NELSON, E. **Ultrastructure studies of muscle cells and vascular endothelium immediately after freeze-thaw injury.** *Cryobiology* 10, 9-21 (1973).

BRITTENDEN J, HEYS SD, EREMIN O. **L-arginine and malignant disease: a potential therapeutic role?** *Eur J Surg Oncol.* 20(2):189-92. Review, 1994..

BRODSKY SV, MORRISHOW AM, DHARIA N, GROSS SS, GOLIGORSKY MS. **Glucose scavenging of nitric oxide.** *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Mar;280(3):F480-6.

BRODSKY SV, MORRISHOW AM, DHARIA N, GROSS SS, GOLIGORSKY MS. **Glucose scavenging of nitric oxide.** *Am J Physiol Renal Physiol.* Mar;280(3):F480-6, 2001.

BROWNLEE, M. **Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications.** *Nature*, vol. 414, 13 Dec 2001, 813-820.

BUETTNER, GR. **Free Radical Basics: Concepts and Considerations.** *Oxygen* 2001, 1-27, Sunrise Free Radical School

BURKE JP, WILLIAMS K, GASKILL SP, HAZUDA HP, HAFFNER SM, STERN MP. **Rapid rise in the incidence of type 2 diabetes from 1987 to 1996: results from the San Antonio Heart Study.** *Arch Intern Med.* 159:1450-6, 1999.

CALVER A, COLLIER J, VALLANCE P. **Dilator actions of arginine in human peripheral vasculature.** *Clin Sci (LOND);* 81(5):695-700. 1991

CHEN LQ, RIEDEL GL, SHEPHERD AP. **Norepinephrine release during autoregulatory escape: effects of alpha 2-receptor blockade.** *Am J Physiol.* 1991 Feb;260(2 Pt 2):H400-8.

CHOI KC, LEE SC, KIM SW, KIM NH, LEE JU, KANG YJ. **Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Korean J Intern Med.* 14(1):32-41, 1999.

CHRISTENSEN HN, STREICHNER JA, ELBINGER, RL. **Effects of feeding individual aminoacids upon the distribution of other aminoacids between cells and extracelular fluid.** *J Biol Chem*, 172: 515-524, 1948.

CHRISTLIEB, A. R., H. V. JANKA, B. KRAUS, R. E. GLEASON, E. A. ICASAS CABRAL , L. M. AIELLO, B. V. CABRAL, A. SOLANO: **Vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in diabetes** 25: 268-274 (1976).

CONRAD KP, VERNIER KA. **Plasma level, urinary excretion, and metabolic production of cGMP during gestation in rats.** *Am J Physiol*. 1989 Oct;257(4 Pt 2):R847-53.

COOKE JP, DZAU VJ. **Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease.** *Annu Rev Med*. 1997;48:489-509. Review.

COSTA E FORTI A, FONTELES MC. **An alpha-adrenotropic study of the normal and diabetic rabbit kidney.** *Arch Int Physiol Biochim.* , 87(5):887-97, 1979.

COWLEY, AW JR. **Long-term control of blood pressure.** *Physiol. Ref.*, v. 72, p. 231-233, 1992.

CRAEGER MA, GALLAGHER SJ, GIRERD XJ, COLEMAN SM, DZAU, VJ, COOKE JP. **L-Arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans.** *J Clin Invest* 1992; 90:1248-1253.

CROWE, JH; HOEKSTRA, FA; CROWE, LM, ANCHORDOGUY, TJ, DROBNIS, E. **Lipid fase transition measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy.** *Cryobiology* 26, 76-84, 1989.

CSEUZ, R., T. L. WEGER, G. KUNOS, M, M. SZENTIVANYI: **Changes of adrenergic reaction pattern in experimental diabetes melitu.** *Endocrinology* 93:752-755 (1973).

DENG A, BAYLIS C. **Locally produced EDRF controls preglomerular resistance and ultrafiltration coefficient.** *Am J Physiol*. 1993 Feb;264(2 Pt 2):F212-5.



DENG A, ENGELS K, BAYLIS C. **Impact of nitric oxide deficiency on blood pressure and glomerular hemodynamic adaptations to pregnancy in the rat.** *Kidney Int* 50(4):1132-8, 1996.

DEVES R, BOYD CA. **Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function.** *Physiol Rev*; 78(2):487-545, 1998.

DEVES R, CHAVEZ P, BOYD CA. **Identification of a new transport system (y<sup>+</sup> L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity.** *J Physiol* 1992; 454:491-501

DOMINGUES, XA. **Métodos de investigación fitoquímica.** México: Limusa, 1973. p. 281.

DRESEL P., WALLENTIN I. **Effects of sympathetic vasoconstrictor fibres, noradrenaline and vasopressin on the intestinal vascular resistance during constant blood flow or blood pressure.** *Acta Physiol Scand*. 1966 Apr;66(4):427-36.

EIZIRIK DL, FLODSTROM M, KARLSEN AE, WELSH N. **The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells.** *Diabetologia*. 39(8):875-90. Review, 1996.

ELLORY JC, YOUNG J. **Red cell membranes: a methodological approach.** London: Engl. Academic Press ; 1982.

ELLORY JC. **Amino acid transport systems in mammalian red cells.** In: Yudilevich DL, Boyd CAR. **Amino acid transport in animal cells.** Oxford: Manchester University Press; 1987. p.87-105

FABER JE, GETTES DR, GIANTURCO DP. **Microvascular effects of atrial natriuretic factor: interaction with alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors.** *Circ Res*. 1988 Aug;63(2):415-28.

FARA JW, ROSS G. **Escape from drug-induced constriction of isolated arterial segments from various vascular beds.** *Angiologica*, 9:27-33, 1972.

FARR, D.R.; MAGNOLATTO, D.; LOLINGER, J. **Protection of food-stuffs from oxidation.** U.S. Pat. 4741915, 1988.

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.

FERVENZA FC, HENDRY BM, ELLORY JC. **Effects of dialysis and transplantation on red cell Na pump function in renal failure.** *Nephron* 1989; 53:121-8.

FERVENZA FC. Method. In: Fervenza FC. **Membran transport abnormalities in patients with renal failure.** Oxford University, D.Phil. thesis 1990; p 37-60.[chapter 2]

FIGUEIREDO, I.M.B. **Contribuição ao estudo do escape vascular “in vitro” em animais hipertensos (SHR) e normotensos (Wistar).** Fortaleza, 1995. Tese de Doutorado em Farmacologia – Universidade Federal do Ceará (UFC).

FINK GD, BRODY MJ. **Continuous measurement of renal blood flow changes to renal nerve stimulation and intra-arterial drug administration in the rat.** *Am J Physiol.* 1978 Feb;234(2):H219-22.

FLEMING I, BUSSE R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):532-41.

FOLKOW, B., LEWIS, D., LUNDGREN, O., MELLANDER, S., WALLENTIN, I.: **The effect of graded vasoconstriction fiber stimulation on the intestinal resistance capacitance vesseld.** *Acta. Physiol. Scand.* 61: 445-457, 1964

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

COSTA E FORTI A, FONTELES MC. **Insulin blockade of norepinephrine tachyphylaxis in the perfused kidney.** *Horm Metab Res.* 21:232-5, 1989.

FONTELES MC, DE LIMA e FORTI CA. **The effect of indomethacin and reserpine on renal vascular escape.** *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.*, 1 81:103-12, 1993.

FONTELES M.C., JESKE A.H. **Vasoactivity and vascular escape in isolated perfused kidneys from normotensive versus spontaneously hypertensive rats.** *Gen Pharmacol.* 1980;11(3):293-6.

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., A. A. MOREIRA LIMA: **A study of tachyphylaxis and vascular escape in the isolated rabbit kidney: effects of PGE 1.** *Rev. Med. Univ. Fed. Ce* 24:01-04 (1984).

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

FORSTERMANN U. **Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases.** *Arzneimittelforschung.* 1994 Mar;44(3A):402-7. Review.

FORSTERMANN U, GATH I, SCHWARZ P, CLOSS EI, KLEINERT H. **Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control.** *Biochem Pharmacol.* , 50:1321-32, 1995.

FORSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, GATH I, KLEINERT H. **Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.** *Hypertension.* , 23:1121-31, 1994.

FORTE P, COPLAND M, SMITH LM, MILNE E, SUTHERLAND J, BENJAMIN N. **Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension.** *Lancet.* 1997 Mar 22;349(9055):837-42.

FURCHGOTT, R.F. & ZAWADSKI, J.V.: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature* 288: 373-376, 1980.

GABBAI F, GARCIA GE, BLANTZ RC, DE NICOLA L. **Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology.** In : **Advances in nephrology.** San Diego: Mosby-Year Book Inc. 24:3-18,1995.

GARCIA SORIANO F, VIRAG L, JAGTAP P, SZABO E, MABLEY JG, LIAUDET L, MARTON A, HOYT DG, MURTHY KG, SALZMAN AL,

SOUTHAN GJ, SZABO C. **Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation.** *Nat Med.* , 7:108-13, 2001.

GIUGLIANO D, MARFELLA R, VERRAZZO G, ACAMPORA R, NAPPO F, ZICCARDI P, COPPOLA L, D'ONOFRIO F. **L-arginine for testing endothelium-dependent vascular functions in health and disease.** *Am J Physiol.*, 273:E606-12, 1997.

GOW AJ, LUCHSINGER BP, PAWLOSKI JR, SINGEL DJ, STAMLER JS. **The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9027–32.

GRAIER WF, SCHMIDT K, KUKOVETZ WR. **Is the bradykinin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx and the formation of endothelium-derived relaxing factor mediated by a G protein?** *Eur J Pharmacol.* 1992 Jan 14;225(1):43-9.

GREEN LC, TANNENBAUM SR, GOLDMAN P. **Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat.** *Science.* 1981 Apr 3;212(4490):56-8.

GREENWAY CV, LAWSON AE, MELLANDER S. **The effects of stimulation of the hepatic nerves, infusions of noradrenaline and occlusion of the carotid arteries on liver blood flow in the anaesthetized cat.** *J Physiol.* 1967 Sep;192(1):21-41.

GREENWAY CV, SCOTT GD, ZINK J. **Sites of autoregulatory escape of blood flow in the mesenteric vascular bed.** *J Physiol.* 1976 Jul;259(1):1-12.

GREENWAY, C.V.: **Neural Control and Autoregulatory Escape in Physiology of the Intestinal Circulation.** Ed. A. P. Shepert & D.N. Grayer, Raven Press, N. York, 1984.

GUTH PH, ROSS G, SMITH E. **Changes in intestinal vascular diameter during norepinephrine vasoconstrictor escape.** *Am J Physiol.* 1976 Jun;230(6):1466-8.

GUYTON AC, HALL JE. **Transporte de Íons e de Moléculas Através da Membrana Celular.** In: *Tratado de Fisiologia Médica.* 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A . 1996. Cap. 4: 41-52.

HANSEN JB, SVENSSON B, ZHANG CL, LYNNGMO V, NORDOY A. **Basal plasma concentration of tissue plasminogen activator (t-PA) and the**

**adaption to strenuous exercise in familial hypercholesterolaemia (FH). Blood Coagul Fibrinolysis., 5:781-7, 1994.**

**HANSEN, TN. Correlation between chilling-induced injury in human cells and phospholipid membrane phase transition. Transplant. Proc. 25, 3179-3181, 1993.**

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

**HAREL, S.; KANNER, J. Lipid antioxidizing factors in orange peel. International Fruit Juice Union Proceedings, v.18, p.185, 1984.**

**HARVEY CM, ELLORY JC. Identification of aminoacid transports in red blood cells. Methods Enzymol 1989; 173:122-59.**

**HENDRY BM. Membrane transport in uraemia. In :Raine AEG. Advanced Renal Medicine. Oxford: Oxford University Press; 1992. p.16-23.**

**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.**

**HENRICH H, SINGBARTL G, BIESTER J. Adrenergic-induced vascular adjustments--initial and escape reactions. I. Influence of beta-adrenergic blocking agents on the intestinal circulation of the rat (in vivo). Pflugers Arch. 1974 Jan 16;346(1):1-12.**

**HENSLEY K, CARNEY J, HALL N, SHAW W, BUTTERFIELD DA. Electron paramagnetic resonance investigations of free radical-induced alterations in neocortical synaptosomal membrane protein infrastructure. Free Radic Biol Med. 1994 Oct;17(4):321-31.**

**HEYS SD, OGSTON K, MILLER I, HUTCHEON AW, WALKER LG, SARKER TK, DEWAR J, AH-SEE AK, EREMIN O. Potentiation of the response to chemotherapy in patients with breast cancer by dietary supplementation with L-arginine: results of a randomised controlled trial. Int J Oncol. , 12:221-5, 1998.**

**HIBBS JB JR, TAINTOR RR, VAVRIN Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 235:473-6, 1987.**

HLADOVEC, J (1986b). **The effect of antithrombotics in a new model of arterial thrombosis.** *Thromb. Res.*, 41:665-670.

HOCHACHKA, P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231, 234-241 (1986).

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. **Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9265-9.

INOUE M, SATO EF, PARK AM, NISHIKAWA M, KASAHARA E, MIYOSHI M, OCHI A, UTSUMI K. **Cross-talk between NO and oxyradicals, a supersystem that regulates energy metabolism and survival of animals.** *Free Radic Res.* 2000 Dec;33(6):757-70. Review.

JOHANSON, B., SPARKS, H. & BIBER, B.: **The escape of the renal blood flow response during sympathetic nerve stimulation.** *Angiologica*, 7: 333-343, 1970.

KANNAGI, R., and KOIZUMI, K. **Effects of diferential physical states physical states of phospholipid substrates on partially purified platele phospholipase A2 ACTIVITY.** *Biochim. Biophys. Acta* 556, 423-433 (1979).

KAWAGUCHI M, KOSHIMURA K, MURAKAMI Y, TSUMORI M, GONDA T, KATO Y. **Antihypertensive effect of insulin via nitric oxide production in the Zucker diabetic fatty rat, an animal model for non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Eur J Endocrinol.* 1999 Apr;140(4):341-9.

KILLIAN, H. **Cold and frost injuries – Rewarming damages: Biological and clinical aspcts.**In “Disaster Micine” (R. FREY and P. SAFAR, Eds.), Vol. 3. SPRINGER-VERLAG, Berlin, 1981.

KIRK, E.A.; SUTHERLAND, P.; WANG, S.A.; SHAIT, A. & LEBOEUF, R.C. (1998). **Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor-deficient Mice.** *J. Nutr.* 128:954-954

KLAHR S. **Can L-arginine manipulation reduce renal disease?** *Sem Nephrol* 1999; 19:304-309.

KOES, R. E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J. N. M. (1994). **The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution.** *Bioessays*, vol.16 (12):123-132.

KREBS, H. A., AND K. HENSELEIT. **Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper in Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie**, 210:33–66, 1932.

KRUUV, J; GLOFCHESKI, DJ; CHENG, KH; CAMPBELL, SD; AL-QYSI, HMA; NOLAN, WT; LEPOCK, JR. **Factors influencing surviving and growth of mammalian cells exposed to hypothermia. I. Effects of temperature and membrane lipid perturbors. J. Cell. Physiol. 115, 170-185, 1983; II. Effects of various hypotonic media. Cryobiology 22, 484-489, 1985.**

KULKA, J. P. **Vasomotor microcirculatory insufficiency: Observation of nonfreezing cold injury of the mouse ear.** *Angiology* 12, 491-506 (1961).

LAPRELL- MOSCHNER, C., ENDRICH, ., BRENDDEL, W., and MEBMER K. **A model for studies of the microcirculation during chronic exposure to cold.** *Microvasc. Res.* 26, 271 (1983).

LARSON, R.A. **The antioxidants of higher plants.** *Phytochemistry*, 27:969-978, 1988.

LAUTT, W.W. & GRAHAM, S.: **Effect of nerve stimulation on precapillary sphincters, oxygen extraction and hemodynamics in the intestine of cats.** *Circ. Res.* 41: 32-36, 1977.

LAUTT, W.W.: **Autoregulation of superior mesenteric artery is blocked by adenosine antagonism.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64: 1291- 1295, 1986.

LAUTT, W.W.: **Effect of stimulation of hepatic nerves on hepatic O<sub>2</sub> uptake and blood flow.** *Am. J. Physiol.* 232, H652 – H656, 1977.

LEE EY, CHUNG CH, CHOI SO. **Immunoglobulin A nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus.** *J Korean Med Sci.* 1999 Oct;14(5):582-5.

LEKAKIS JP, PAPATHANASSIOU S, PAPAIOANNOU TG, PAPAMICHAEL CM, ZAKOPOULOS N, KOTSIS V, DAGRE AG, STAMATELOPOULOS K, PROTOGEROU A, STAMATELOPOULOS SF. **Oral L-arginine improves**

**endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. Int J Cardiol.** , 86:317-23, 2002.

LERMAN A, BURNETT JC JR, HIGANO ST, MCKINLEY LJ, HOLMES DR JR. **Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. Circulation,** 97:2123-8, 1998.

LI G, REGUNATHAN S, BARROW CJ, ESHRAGHI J, COOPER R, REIS DJ. **Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. Science.** 1994 Feb 18;263(5149):966-9.

LIBBY P. **Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. Am J Cardiol.,** 88:3N-8N, 2001.

LIN, B.B.; CHEN, H.L & HUANG, P.C. (1986). **Effects on instant Pauchong Tea, Cathecin, and Caffeine os serum cholesterol and serum low-density-lipoprotein in mice. Nutr. Rep. Int.** 34:821-829.

LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M.T.; PAI, Y.S. (1997). **In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from rhus sucedanea and garciana multiflora. Journal Natural Products,** vol. 60 884-8.

LOHR JB, CADET JL, LOHR MA, LARSON L, WASLI E, WADE L, HYLTON R, VIDONI C, JESTE DV, WYATT RJ. **Vitamin E in the treatment of tardive dyskinesia: the possible involvement of free radical mechanisms. Schizophr Bull.** 1988;14(2):291-6.

LOLIGER, J. **The use of antioxidants of foods.** In: AUROMA, O.I.; HALLIWELL, B. (Eds.). **Free radicals and food additives.** London: Taylor & Francis, 1991. 121p.

LOSEKANN A. **Hipertensão arterial induzida por eritropoietina recombinante em ratos: o efeito do ácido-acetil salicílico [Dissertação].** Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 1997.

LUCIO FJ, HENDRY BM, ELLORY JC. **The effects of cholesterol depletion on the sodium pump in human red cells. Exp Phys** 1991; 76:437-43.

LUTZ, J. & HEINRICH, H.: **Vergleich des vascularen escape – Phanomens an der intestinalen und renallen strombahn bei nervalen sowie humoralen auslosung. Pflugers Arch.** 339: 37-48, 1973.



MACALLISTER R, VALLANCE P. **Nitric oxide in essential and renal hypertension.** *J Am Soc Nephrol.* 1994 Oct;5(4):1057-65.

MACLEAN, D., and EMSLIE-SMITH, D. **"Accidental Hypothermia,"** Blackwell Scientific, Oxford, 1977.

MAHER T. **Safety concerns regarding supplemental amino acids.** In **Food Components to Enhance performance** (B.M. Marriott, Ed). National Academy Press, Washington, DC, pp. 455-460, 1994.

MAHER AD, KUCHEL PW, ORTEGA F, DE ATAURI P, CENTELLES J, CASCANTE M. **Mathematical modelling of the urea cycle. A numerical investigation into substrate channelling.** *Eur J Biochem.*, 270:3953-61, 2003.

MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD, WISHNOK JS. **Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.** *Biochemistry* , 27:8706-11, 1988.

MCGIFF JC, CROWSHAW K, TERRAGNO NA, MALIK KU, LONIGRO AJ. **Differential effect of noradrenaline and renal nerve stimulation on vascular resistance in the dog kidney and the release of a prostaglandin E-like substance.** *Clin Sci.* 1972 Feb;42(2):223-33.

MENDES RIBEIRO AC, HANSSEN H, KIESSLING K, ROBERTS NB, MANN GE, ELLORY JC. **Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure.** *Clin Sci* 1997; 93(1):57-64.

MIYAZAKI H, MATSUOKA H, COOKE JP, USUI M, UEDA S, OKUDA S, IMAIZUMI T. **Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis.** *Circulation.* 1999 Mar 9;99(9):1141-6.

MONCADA S, HIGGS A. **The L-arginine-nitric oxide pathway.** *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):2002-12. Review.

MONCADA S, RANDEMSKI MW, PALMER RMJ – **Endothelium derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function.** *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, pp. 2495-2501, 1988

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA.. **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol Rev.*, 43:109-42, 1991.

MUELLER C. **The regulatory status of medical foods and dietary supplements in the United States.** *Nutrition* 1999; 15:249-251.

NAGASE S, TAKEMURA K, UEDA A. **A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:150-153.

NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.; SILVA, M. C.; MIRANDA, L.C.G. (1995). **Efeito de derivados flavonoídicos sobre lipídeos em ratos.** *Arq. Biol. Technol.* 38(3):859-868.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in foods. Critical Review in Food Science and Nutrition, v.29, p.273-291, 1990.

NASCIMENTO, N.R.F. : **Disfunção Endotelial e Nitrérgica:Reversão ou Prevenção por Antioxidantes ou Componentes do Mediador Putativo da Insulina.** Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2004.

NICOTERA, P., and ORRENIUS, S. **Ca<sup>2+</sup> and cell death.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 645, 17-27 , 1992.

NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, DU XL, YAMAGISHI S, MATSUMURA T, KANEDA Y, YOREK MA, BEEBE D, OATES PJ, HAMMES HP, GIARDINO I, BROWNLEE M. **Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.** *Nature*, 404(6779):787-90, 2000.

NOBUNAGA T, TOKUGAWA Y, HASHIMOTO K, KUBOTA Y, SAWAI K, KIMURA T, SHIMOYA K, TAKEMURA M, MATSUZAKI N, AZUMA C, SAJI F. **Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility.** *Am J Reprod Immunol.* 36(4):193-7, 1996.

O'MALLEY BP, NORTHOVER BJ, WOODS KL. **Heart failure in sinus rhythm as the sole manifestation of Graves' disease.** *Postgrad Med J.* 62(733):1051-3, 1986.

OBROSOVA IG. **How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve?** *Int Rev Neurobiol.* 2002;50:3-35. Review.

OHATA T, SAWA Y, KADOBABA K, KAGISAKI K, SUZUKI K, MATSUDA H. **Role of nitric oxide in a temperature dependent regulation of systemic vascular resistance in cardiopulmonary bypass.** Eur J Cardiothorac Surg. 2000 Sep;18(3):342-7.

OHYANAJR, M., FABER, J.E., NISHGAKI, K. **Differential activation of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenoceptors on microvascular smooth muscle during sympathetic nerve stimulation.** Circulation Research, V. 68, n. 1, p. 232, 1991

OLLOFSSON P. **Characteristics of a reversed circadian blood pressure rhythm in pregnant woman with hypertension.** J. Hum. Hypertens 1995; 9: 565-570

O'MALLEY MK, HAGEN PO, MIKAT EM, COLE CW, RADIC ZS, MCCANN RL. **Increased vascular contraction and sensitivity to norepinephrine after endothelial denudation is inhibited by prazosin.** Surgery, 1986 Jan;99(1):36-44.

ORRENIUS, S., MCCONKEY, D. J., BELLOMO, G., and NICOTERA, P. **Role of  $Ca^{2+}$  in toxic cell Killing.** Trends Pharmacol. Sci. 10, 281-285 (1989).

OSHITA M, TAKEI Y, KAWANO S, YOSHIHARA H, HIJIOKA T, FUKUI H, GOTO M, MASUDA E, NISHIMURA Y, FUSAMOTO H, ET AL. **Roles of endothelin-1 and nitric oxide in the mechanism for ethanol-induced vasoconstriction in rat liver.** J Clin Invest. 1993 Apr;91(4):1337-42.

PALMER RM, REES DD, ASHTON DS, MONCADA S. **L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation.** Biochem Biophys Res Commun. 1988 Jun 30;153(3):1251-6.

PARK GM, HEYS SD, BLESSING K, KELLY P, MCNURLAN MA, EREMIN O, GARLIK PJ. **Stimulation of human breast cancers by dietary L-arginine.** Clin Sic 1992; 82:413-417.

PARKS, JE; LYNCH, DV. **Lipid composition and thermotropic phase behavior on boar, bull, stallion and rooster sperm membranes.** Cryobiology 29, 255-266, 1992.

PEREZ AC, PAUL W, HARRISON S, PAGE CP, SPINA D. **The effect of L-arginine on guinea-pig and rabbit airway smooth muscle function in vitro.** *Braz J Med Biol Res.* 31(6):811-8, 1998.

PETERS H, NOBLE NA. **Dietary L-arginine in renal disease.** *Semin Nephrol.* 1996 Nov;16(6):567-75. Review.

PETERSON J, DWYER J. **Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire.** *J Am Diet Assoc.* 1998 Jun;98(6):677-82, 685; quiz 683-4.

PIEPER AA, VERMA A, ZHANG J, SNYDER SH. **Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death.** *Trends Pharmacol Sci.* 1999 Apr;20(4):171-81. Review.

PINCEMAIL J, THIRION A, DUPUIS M, BRAQUET P, DRIEU K, DEBY C. **Ginkgo biloba extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes.** *Experientia.* 1987 Feb 15;43(2):181-4.

PODJARNY E, BEN-CHETRIT S, RATHAUS M, KORZETS Z, GREEN J, KATZ B, NOBUNAGA T, TOKUGAWA Y, HASHIMOTO K, KIMURA T, MATSUZAKI N, NITTA Y, FUJITA T, KIDOGUCHI KI, AZUMA C, SAJI F. **Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension.** *Gynecol Obstet Invest.* 1996;41(3):189-93.

PRATT D.E.; BIRAC, P.M. **Source of antioxidant activity in soybeans.** *Journal of Food Science*, v.44, p.1720-1722, 1979.

PRATT, D.E.; HUDSON, B.J.F. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.). **Food antioxidants.** London: Elsevier, 1990. p.171.

QUINN, PJ. **A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes.** *Cryobiology* 22, 128-146, 1985.

QUYYUMI AA. **Does acute improvement of endothelial dysfunction in coronary artery disease improve myocardial ischemia? A double-blind comparison of parenteral D- and L-arginine.** *J Am Coll Cardiol.* 32(4):904-11, 1998.

RABB JM, RENAUD ML, BRANDT PA, WITT CW. **Effect of freezing and thawing on the microcirculation and capillary endothelium of the hamster cheek pouch.** *Cryobiology*, 11(6):508-18, 1974.

RABINI RA, STAFFOLANI R, FUMELLI P, MUTUS B, CURATOLA G, MAZZANTI L. **Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients.** *Diabetologia*. 1998 Jan;41(1):101-4.

RATTY, A., K. and DAS, P. N.(1998) **Effects of Flavonoids on Nonenzymatic Lipid Peroxidation: Structure-Activity Relationship.** *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 39, 69-79.

RATYCH, R. E., BULKLEY, G. B., and WILLIAMS, G.M. **Ischemia/reperfusion injury in the kidney.** In **"Transplantation: Approaches to Graft Rejection"** (H. T. MERRYMAN, Ed.), pp. 263-289. A. R. LISS, New York, 1986.

REES DD, PALMER RM, MONCADA S. **Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(9):3375-3378.

REHFELDT, W., RESCH, K., and GOPPELT-STRUEBE, M. **Cytosolic phospholipase A2 from human monocytic cells: Characterization of substrate specificity and Ca<sup>2+</sup> dependent membrane association.** *Biochem. J*. 293, 255-261 (1993).

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

REYES AA, KARL IE, KLAHR S. **Role of arginine in health and in renal disease.** *Am J Physiol*. 1994 Sep;267(3 Pt 2):F331-46. Review.

RICE-EVANS CATHERINE, **structure-Antioxidant activity relationships of Flavonoids and Phenolic Acids,** *Free radical Biology Medicine* 20,933-956, 1996, UK

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.

RICHARDSON, G.A.; EL-RAFEY, M.S.; LONG, M.L. **Flavones and flavone derivatives as antioxidants.** *Journal of Dairy Science*, v.30, p.143-397, 1974.

RIOS, J.L.; MAÑEZ, S.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J. **Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, v.31, n. 6, p.1947-1950, 1992.**

RITTENHOUSE-SIMMONS, S. **Production of diacylglyceride from phosphatidylinositol in activated platelets. *J. Clin. Invest.* 63, 580-587 (1979).**

ROBERTS JD JR. **Inhaled nitric oxide for treatment of pulmonary artery hypertension in the newborn and infant. *Crit Care Med.* 1993 Sep;21(9 Suppl):S374-6. Review.**

ROSS G. **Escape of mesenteric vessels from adrenergic and nonadrenergic vasoconstriction. *Am J Physiol.* 1971 Nov;221(5):1217-22.**

RUSZNYAK, S.; SZENT-GYORGYI, A. **Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature.* 138:27, 1936.**

SANDERS PW. **L-Arginine and arginine analogs in progressive renal failure. *Blood Purif* 1995; 13:219-227, 1995.**

SANTOS KF, OLIVEIRA TT, NAGEM TJ, PINTO AS, OLIVEIRA MG. **Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacol Res.* 40(6):493-6, 1999.**

SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S; OLIVEIRA, M.A. & SOARES,J.F (1999a). **Efeitos das associações de morina-ácido nicotínico e quercetina ácido-nicotínico no controle de lipídeos. *RBCA*, 31(1):5-7.**

SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S; OLIVEIRA, M.G.A. (1999b). **Hypolipidemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacological Research*, Vol 40(6): 493-496.**

SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S; STRINGHETA, P.C. (1999c). **Associations of flavonoids and natural dyes in the control of lipidic metabolism. *Acta Farma. Bonaerense* 18(2): 127-30.**

SVANVIK J. **Mucosal hemodynamics in the small intestine of the cat during regional sympathetic vasoconstrictor activation.** *Acta Physiol Scand.*, 89:19-29, 1973.

SCHACHTER A, GOLDMAN JA, ZUKERMAN Z. **Treatment of oligospermia with the amino acid arginine.** *J Urol* 1973; 110:311-313.

SCHMIDT K, KLATT P, MAYER B. **Uptake of nitric oxide synthase inhibitors by macrophage RAW 264.7 cells.** *Biochem J.* 1994 Jul 15;301 ( Pt 2):313-6.

SCHNEIDER F, LUTUN P, BALDAUF J, QUIRIN L, DREYFUS M, RITTER J, TEMPÉ JD . **Plasma cyclic GMP concentrations and their relationship with changes of blood pressure levels in preeclampsia.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75:40-44.

SELLIGMAN S, BUYON JP, ROBERT MD, CLANCY M, YOUNG BK, ABRAMSON, SB. **The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia.** *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171(4): 944-48.

SHEABAR, F.Z.; NEEMAN, I. **Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives.** *Journal of the American Oil Chemical Society*, v.65, p.990-991, 1988.

SILVER RK, KUPFERMINE MJ, RUSSEL TL, ADLER L, MULLEN TA, CAPLAN MS. **Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia.** *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(4): 1013-7.

SINGBARTL G, HENRICH H. **Adrenergic-induced vascular adjustments-initial and escape reactions. II. Role of beta-adrenergic receptors within different sections of the isolated intestinal vascular bed.** *Pflugers Arch.* 1974 Jan 16;346(1):13-24.

SMÁRASON A, ALLMAN KG, YOUNG D, REDMAN CWG. **Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia.** *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:538-43.

SPEZIALI G, RUSSO P, DAVIS DA, WAGERLE LC. **Hypothermia enhances adrenergic contractility in cerebral arteries of newborn lamb.** (presentaz.). *Association for Academic Surgery*, Hershey, PA, USA, Nov 1993.

STEVENS RB, SUTHERLAND DE, ANSITE JD, SAXENA M, ROSSINI TJ, LEVAY-YOUNG BK, HERING BJ, MILLS CD. **Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway: nitric oxide as cause and effect of diabetes?** *J Immunol.* 1997 Dec 1;159(11):5329-35.

STUEHR DJ, MARLETTA MA. **Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Nov;82(22):7738-42.

SUGIMOTO H, SHIKATA K, MATSUDA M, KUSHIRO M, HAYASHI Y, HIRAGUSHI K, WADA J, MAKINO H. **Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy.** *Diabetologia.* 1998 Dec;41(12):1426-34.

SZENTIVANYI, M., L. PEK: **Characteristic changes of vascular adrenergic reactions in diabetes Mellitus.** *Nature New Biology* 243: 276-277, 1973.

TACHIBANA K, MUKAI K, HIRAOKA I, MORIGUCHI S, TAKAMA S, KISHINO Y. **Evaluation of the effect of arginine-enriched amino acid solution on tumor growth.** *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*9(4):428-34, 1985.

TANGPHAO O, CHALON S, MORENO H JR, HOFFMAN BB, BLASCHKE TF. **Pharmacokinetics of L-arginine during chronic administration to patients with hypercholesterolaemia.** *Clin Sci (Lond).* 96(2):199-207,1999.

UEMURA S, MATSUSHITA H, LI W, GLASSFORD AJ, ASAGAMI T, LEE KH, HARRISON DG, TSAO PS. **Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress.** *Circ Res.* 22;88(12):1291-8. 2001.

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

VINIK AI, ERBAS T. **Recognizing and treating diabetic autonomic neuropathy.** *Cleve Clin J Med.* Nov;68(11):928-30, 932, 934-44, 2001.



WANG Y, MARSDEN PA. **Nitric oxide synthases: gene structure and regulation.** *Adv Pharmacol.*;34:71-90, 1995.

WANG, O. -L. , XUAN, Y. -T., MIRZA, Z., and WHORTON, A. R. **Effects of temperature on bradykinin-induced arachidonate release and calcium mobilization in vascular endothelial cells.** *Biochem. J.* 291, 803-809 (1993).

WEINER C, MARTINEZ E, ZHU LK, GHODSI A, CHESTNUT D. **In vitro release of endothelium-derived relaxing factor by acetylcholine is increased during the guinea pig pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol.* Dec;161(6 Pt 1):1599-605, 1989.

WINTER CG, CHRISTENSEN HN. **Migration of aminoacid across the membran of erythrocyte.** *J Biol Chem*; 239:872-8, 1964.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W. & SHIMIZU, M.). **Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro.** *Phytotherapy Research.* Vol.11:446-450, 1997.

ZHAO, B.; LI, X.; HE, R.G.; CHENG, S.J.; WENJURAN, X. **Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals.** *Cell Biochemistry*, v.14, p.175-177, 1989.

ZINGARELLI B, SALZMAN AL, SZABO C. **Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury.** *Circ Res.* 13;83(1):85-94, 1998.