

65-2272584

R1384385205

00000000000000000000

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**MESTRADO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DO 3,4-DIBUTIRIL-D-QUIROINOSITOL**  
**NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL DA DIABETES**  
**MELLITUS**

**LUCÍLIA MARIA ABREU LESSA**

613,15

LG31e

00,2

**Fortaleza-2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
MESTRADO EM FARMACOLOGIA**

**Efeito do 3,4-dibutiril-D-quirositol na disfunção  
endotelial da Diabetes Mellitus**

**Lucília Maria Abreu Lessa**

**Dissertação apresentada ao  
Departamento de Fisiologia e  
Farmacologia da Universidade  
Federal do Ceará para obtenção  
do título de Mestre em  
Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles  
Co-orientador: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento**

**Fortaleza, 22 de abril de 2005**



## FICHA CATALOGRÁFICA

L631e

Lessa, Lucília Maria Abreu

Efeito do 3,4 – Dibutiril – D – Quiroinositol na disfunção endotelial da diabetes mellitus. / Lucília Maria Abreu Lessa. – Fortaleza, 2005.

107.:il

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fontelis

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará / Faculdade de Medicina.

1. Diabetes Mellitus – Complicações. 2. Diabetes Mellitus – Terapia.  
3. Diabetes Mellitus – Prevenção e Controle. I. Fontelis, Manassés  
Claudino (Oriet.) II. Título

CDD 616.462

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre 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.

Defesa formal aprovada em 22 de abril de 2005

---

Lucília Maria Abreu Lessa

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Manassés Cláudio Fonteles  
(Orientador)

---

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

---

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz  
(Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Farmácia)

## *Oferecimento*

*Ofereço este trabalho a minha querida família. A minha mãe, Lucila Abreu Lessa, exemplo de determinação, coragem e fortaleza. Capaz de superar todas as dificuldades e sempre achar uma solução. Uma mãe carinhosa e muito amada, obstinada a ver a felicidade dos filhos e que faz justiça ao significado da palavra mãe. Ao meu pai, José Sombra Lessa, exemplo de honra e honestidade. Quem me ensinou o verdadeiro valor de cada atitude que tomamos na vida. Um pai amável e conselheiro de todas as horas. Ao meu irmão Lucílio José Abreu Lessa, de longe a melhor pessoa que conheço. Seu carinho, sua bondade, sua compreensão e solidariedade, sua preocupação, até excessiva, me mostram a cada dia que você é o meu mais querido, amado e melhor amigo. A minha irmã Ione Sombra, carinhosa, preocupada e determinada. Sua maneira correta de enxergar a vida faz de você uma pessoa para se admirar e amar. A minha irmãzinha Anne Caroline Sombra, “minha filhinha”, sua meiguice e alegria têm o poder de cativar todos que a cercam. A minha Segunda mãe, Maria Eliene Sombra da Silva sempre presente, atenciosa e carinhosa. E ao seu filhinho, Eduardo Regino Cardoso Sombra de Brito, meu amorzinho, seu nascimento trouxe mais luz a minha vida. Amo profundamente todos vocês. São o meu porto seguro, a estrutura que preciso para encarar da melhor maneira os desafios da vida.*

*Ofereço também este trabalho ao meu amado Alexandre Leite Lima, meu amor já há tantos anos, mas parece que foi ontem. A você que esteve comigo a cada passo dessa jornada. À pessoa que me ajudou a amadurecer e me mostrou a verdadeira felicidade. Seu caráter e coragem de encarar as dificuldades me estimulam e incentivam. Te admiro e te amo ainda mais pela compreensão, pelos conselhos, pelo carinho e amor. Nunca irei esquecer o irrestrito apoio que sempre me dá, sem o qual não seria possível realizar este sonho..*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça alcançada de terminar este curso de pós-graduação. Por ter me amparado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus preciosos pais, José Sombra Lessa e Lucila Abreu Lessa, por me ensinarem o valor do estudo e serem um modelo para mim de moral e caráter. Pelo incentivo, confiança e amor em todos os momentos.

Aos meus irmãos Lucílio José Abreu Lessa, Ione Sombra e Anne Caroline Sombra, pelos conselhos, confiança, amizade e amor, por tudo o que nos une e que me fizeram melhor do que sou.

Ao meu querido amor Alexandre Leite Lima, pela paciência, pelo companheirismo, pelo carinho, por ter tornado a minha vida completa. Esta será mais uma vitória nas nossas vidas, amo você cada vez mais.

A minha prima, Maria Eliene Sombra da Silva, minha irmã, minha segunda mãe, por estar presente em todos os momentos da minha vida, inclusive neste. Obrigada pelo apoio incondicional e por ter trazido ao mundo um bebê que iluminou a minha vida, meu afilhado, Eduardo Regino Cardoso Sombra de Brito, todos os dias agradeço a Deus por vocês existirem.

A minha madrinha, Maria Zilma Sombra da Silva, um exemplo de mulher de fibra, que passou por muitas desventuras, mas com fé e confiança soube superá-las. Agradeço por sempre me apoiar e confiar em mim. Te amo, tia.

Ao Prof. Manassés Claudino Fonteles, pela orientação desde a iniciação científica. Por ter acreditado e me apoiado todo este período. Agradeço pela atenção, confiança, incentivo e, principalmente, pelo exemplo de profissional e pessoa.

Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, meu amigo-irmão. Por sua dedicação, orientação, compreensão e competência. Pelos dias de descontração lá no sítio, tantas gargalhadas que nunca serão esquecidas. Obrigada pelo apoio e conselhos e, especialmente, pela oportunidade e honra de tê-lo como amigo.

Ao Prof. Dr. Joseph Larner do Departamento de Farmacologia da Universidade de Virgínia da Faculdade de Medicina de Charlottesville e à toda sua equipe, pela orientação, suporte e drogas fornecidas.

Ao Prof. Dr. Michael Brwnlee do Hospital Albert Eistein da Faculdade de Medicina de Nova York pela realização de análises imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Andrew J. Gow da Universidade da Pensilvânia – UPEN pela presteza com que realizou análises de imunohistoquímica de suma importância para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus grandes amigos Clauber Mota Sousa, Maria Daniele Azevedo teixeira, Marta Regina Kerntopf e Patrícia Limaverde pelo companheirismo nos “dias puxados” no laboratório, pelos momentos de diversão, que foram tantos. Tenho certeza que sempre estaremos próximos, participando da vida um do outro.

As minhas queridas amigas e companheiras, Érika Kelly Silva Santiago, Paola Capibaribe Jatahy, Ticiane Meireles de Sousa e Virgínia Augusta Almada Férrer Rodrigues, por todos os momentos de descontração e preocupação compartilhados. E sobretudo pelos conselhos e lealdade durante esses anos de amizade.

Aos bolsistas-amigos Julieta Cunha Martins, Fred Olavo Aragão, Rafael Mohana e Elaine Vasconcelos, pelos momentos de esforço e descontração divididos, pelas brincadeiras, alegria constante e companheirismo.

A todos os amigos que iniciaram o curso de mestrado comigo e aqueles que conheci durante o mesmo, Paulo Sérgio Barbosa, Alexandre Havt Bindá, Ricardo Lira, Monoel Carlos Serra Azul Monteiro, Sandra Monteiro, Ana lourdes Camurça Monteiro, Renata Alves de Sousa, René Duarte e tantos outros, pela amizade, pelos churrascos lá no sítio, por todos os momentos compartilhados.

Aos professores do Instituto de Biomedicina (IBIMED), Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, Dra. Helena Serra Azul Monteiro e Dr. Otoni Cardoso do Vale pela orientação e apoio através da boa infraestrutura do instituto oferecida aos alunos de pós-graduação.

Aos funcionários do IBIMED José Amadeus de Sousa, Jociê Andrade da Silva, Francisco Bento de Oliveira, Kátia Maria Lima, Fabiana Maria da Silva Nascimento, Silvia Helena Freire França, Tereza freire França, Domingos Barreto de Oliveira e Francisca Gardênia de Sousa, pela convivência saudável e acolhedora durante estes anos.

À coordenadora do curso de pós-graduação, Maria Elizabete Amaral de Moraes por sua dedicação, competência e paciência no trato com os alunos de pós-graduação.

Aos professores do curso de Mestrado em Farmacologia, obrigada pelos conhecimentos compartilhados, representam valor inestimável.

À Profa. Dr. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, pelo apoio inigualável, sem a sua colaboração não seria possível apresentar este trabalho.

Às funcionárias da pós-graduação, Sílvia Maria Azevedo de Lima, Áurea Rhanes Farias Noqueira Ylda e Roselene Ferreira, pela cooperação, simpatia e eficiência de todas os momentos.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço especialmente a todos os animais experimentais que ajudaram, mesmo que indiretamente, ao desenvolvimento deste trabalho.

*“O amor suporta tudo, acredita sempre, espera sempre e sofre com paciência. O amor é eterno. As profecias desaparecem, as línguas acabam-se, a ciência passa, pois tanto as nossas profecias como a nossa ciência são imperfeitas. Quando chegar aquilo que é perfeito, tudo o que é imperfeito desaparece. Quando eu era criança, falava como criança, sentia como criança e pensava como criança, depois tornei-me adulto e deixei o modo de ser de criança. Agora, vemos as coisas como num espelho e de maneira confusa. Depois, vemo-las frente a frente. Agora o meu conhecimento é imperfeito, mas depois vou conhecer como Deus me conhece. Agora, existem três coisas: fé, esperança e amor, mas a mais importante é o amor.”  
(I Coríntios 13:7-13)*

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>v</b>
<b>Resumo</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>11</b>
1.1. Apresentação	11
1.2. Aspectos Gerais da Diabetes	15
1.3. Controle da Glicemia e Sinalização da insulina	18
1.3.1. Vias de Sinalização da Insulina	19
1.4. Fisiopatologia da Diabetes Mellitus	21
1.4.1. Diabetes Mellitus Tipo I	21
1.4.2. Diabetes Mellitus Tipo II	22
1.4.3. Mecanismos da Vasculopatia Diabética	24
1.4.3.1. Mecanismos de dano vascular induzido por hiperglicemia	25
1.5. Inositóis – Mediadores Putativos da Insulina	34
<b>2. Objetivos</b>	<b>40</b>
2.1. Objetivos Gerais	40
2.2. Objetivos Específicos	40
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>43</b>
3.1. Animais	43
3.2. Drogas e Substâncias Químicas	44
3.3. Protocolos Experimentais	45
3.3.1. Grupos Experimentais	45
3.3.2. Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos	46
3.3.3. Medida da pressão sanguínea	47

3.3.4. Estudo das drogas na reatividade vascular	47
3.3.4.1. Leito Arteriolar Mesentérico	47
3.3.4.2. Anéis de Aorta	48
3.3.4.3. Perfusão de Rim de coelho em sistema aberto	50
3.3.5. Avaliação do Potencial Antioxidante dos Inositóis	51
3.3.5.1. Teste de redução do azul de nitrotetrazólico	51
3.3.5.2. Produção de radicais livres em células endoteliais	52
3.3.5.3. Imunohistoquímica – Identificação de nitrosotióis e nitrotirosina em proteínas	52
3.4. Análise Estatística	53
<b>4. Resultados</b>	<b>55</b>
4.1. Parâmetros bioquímicos, pressão arterial e variação de peso de ratos diabéticos por aloxana tratados com dibutiril-D-quirositol (db-DCI), mioinositol (mio-INS) ou salina	55
4.2. Avaliação do potencial preventivo da disfunção endotelial	59
4.2.1. Leito vascular mesentérico	59
4.2.2. Anéis de aorta de rato	61
4.3. Avaliação do potencial curativo da disfunção endotelial	62
4.3.1. Leito arteriolar mesentérico	62
4.3.2. Leito arteriolar renal	64
4.3.3. Anéis de aorta	65
4.4. Avaliação do Potencial Antioxidante dos Inositóis	68
4.4.1. Efeito na Atividade do Óxido Nítrico Sintetase Endotelial (eNOS)	68
4.4.2. Efeito na Potenciação da Ação do Óxido Nítrico	68
4.4.3. Efeito na formação de Superóxido	70
4.4.4. Efeito na produção de radicais livres em células endoteliais	71
4.4.5. Imunohistoquímica de células endoteliais de anéis de aorta	73
<b>5. Discussão</b>	<b>75</b>

<b>6. Conclusões</b>	<b>86</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>88</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ADMA	Dimetil-arginina assimétrica
AGE	Produtos finais de glicação avançada
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AR	Aldose Redutase
ATP	Adenosina trifosfato
BH2	Dihidrobiopterina
BH4	Tetrahidrobiopterina
CAT	Catalase
DAG	Diacilglicerol
Db-DCI	dibutiril-D-quirositol
DCI	D-quirositol
DE	Disfunção endotelial
DM	Diabetes Mellitus
DMPA	dimetilaminopiridina
DNA	Ácido desixiribonucleico
EDCI	dimetilaminopropil carbonida
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EPM	Erro padrão da média
ERO (ROS)	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
GLUT-4	Transportador transmembrana de glicose (isoforma 4)
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPIs	Glicosilfosfatidilinositóis
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzido
GSs	Guanilato ciclase solúvel
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H4IIE	Células do Hepatoma
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IBIMED	Instituto de Biomedicina
IP3	Trifosfato de inositol
IPG	Fosfoinositolglicano
KHS	Solução de Krebs Henseleit
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	Metiléster de N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
Mio-INS	Mioinositol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NF-κβ	Fator de transcrição nuclear-κβ
NO	Óxido nítrico
NOSe	Óxido nítrico sintetase endotelial

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Categorização das vias de sinalização envolvidas nas Complicações Diabéticas .....	26
Figura 2.	Vias da aldose redutase e dos polióis.....	27
Figura 3.	Mecanismos pelos quais a produção intracelular de precursores dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) causam dano vascular	30
Figura 4.	Consequências da ativação de proteína quinase C (PKC) induzida por hiperglicemia .....	31
Figura 5.	Formação de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mitocondrial e suas consequências ....	33
Figura 6.	Síntese do 3,4-dibutiril-D-quirositol .....	37
Figura 7.	Em (A) leito vascular mesentérico de rato; (B) sistema de perfusão aberto .....	48
Figura 8.	Em (A) isolamento da aorta torácica; em (B) montagem dos anéis de aorta de ratos ou coelhos no sistema de registro isométrico .....	49
Figura 9.	Sistema de perfusão aberto de rim de coelho .....	51
Figura 10.	Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com dibutiril-D-quirositol (20mg/kg/12h) ou mioinositol (20mg/kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico .....	60
Figura 11.	Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com dibutiril-D-quirositol (20mg/kg/12h) ou mioinositol (20mg/kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica .....	61
Figura 12.	Efeito da incubação de $1\mu M$ de inositois na resposta endotélio-dependente evocada pela acetilcolina (ACh). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de ratos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo .....	63
Figura 13.	Efeito da incubação de $1\mu M$ de inositois na resposta endotélio-dependente evocada pelo Acetilcolina (ACh). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de ratos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo .....	64

- Figura 14. Efeito da incubação de  $1\mu\text{M}$  de inositois na resposta endotélio-dependente evocada pela acetilcolina (ACh). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de coelhos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo ..... 66
- Figura 15. Efeito da incubação de  $1\mu\text{M}$  de inositois na resposta endotélio-dependente evocada pelo Acetilcolina (ACh)). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de coelhos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo ..... 67
- Figura 16. Efeito da incubação por 1 hora com os inositois testados ( $1\mu\text{M}$ ) no aumento do tônus induzido por  $100\mu\text{M}$  de l-NAME em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina ..... 68
- Figura 17. Efeito da SOD, dibutilil-D-quirositol (db-DCI) e mioinositol (mio-INS) na potenciação do relaxamento induzido por óxido nítrico (NO por 1 hora – 1 a  $10\mu\text{M}$ ) em anéis de aorta precontraídos com  $0,1\mu\text{M}$  de fenilefrina (FEN). (A) mio-INS e (B) db-DCI. .... 69
- Figura 18. Efeito da superóxido dismutase (SOD- 0,03 a  $3\text{U/mL}$ ) na redução da reação de azul de nitrotetrazolium (NBT) induzida por formação de superóxido oriundo do sistema xantina/xantina oxidase (XA/XO) é mostrado no painel (A). O painel (B) mostra o efeito dos inositois testados ( $0,01$  a  $1\mu\text{M}$ ) na taxa de redução NBT comparada com a adição isovolumétrica do veículo ..... 70
- Figura 19. Supressão das concentrações de ROS exercida por D-quirositol e 3,4-dibutilil D-quirositol em células endoteliais de aorta de bovino incubadas na presença de  $25\text{mM}$  de glicose ..... 72
- Figura 20. Imunohistoquímica para nitrosotíóis e nitrotirosina de anéis de aorta de ratos diabéticos por aloxana tratados ou não com inositois ..... 73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores de glicose plasmática (em mg/dl) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos.....	16
Tabela 2.	Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos), pressão arterial média, peso corporal e glicemia de ratos euglicêmicos ou diabéticos por aloxana antes e após 4 semanas de tratamento com db-DCI, mio-INS ou salina.....	58
Tabela 3.	Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente (Ach) e endotélio-independente (SNP) no leito arteriolar mesentérico (LAM) de ratos diabéticos por aloxana tratados com salina (1mL/Kg/12h,v.o), db-DCI ou mio-INS (20 mg/Kg/12h v.o.).....	60
Tabela 4.	Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente (Ach) e endotélio-independente (SNP) em anéis de aorta de ratos diabéticos por aloxana tratados com salina (1mL/Kg/12h,v.o), db-DCI ou mio-INS (20 mg/Kg/12h v.o.).....	62
Tabela 5.	Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente (Ach) e endotélio-independente (SNP) no leito arteriolar mesentérico (LAM) de ratos diabéticos por aloxana após a incubação de 1 $\mu$ M de db-DCI ou mio-INS.....	63
Tabela 6.	Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente (Ach) e endotélio-independente (SNP) no leito arteriolar renal (LAR) de coelhos diabéticos por aloxana após a incubação de 1 $\mu$ M de db-DCI ou mio-INS.....	65
Tabela 7.	Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente (Ach) e endotélio-independente (SNP) em anéis de aorta de ratos diabéticos por aloxana após a incubação de 1 $\mu$ M de db-DCI ou mio-INS.....	66
Tabela 8.	Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente (Ach) e endotélio-independente (SNP) em anéis de aorta de coelhos diabéticos por aloxana após a incubação de 1 $\mu$ M de db-DCI ou mio-INS.....	67

## RESUMO

**Efeito do 3,4-dibutiril-D-quirositol na disfunção endotelial da Diabetes Mellitus**

Lucília Maria Abreu Lessa

Orientador: Manasses Claudino Fonteles

A disfunção endotelial (DE) é uma característica comum de diversas patologias com riscos cardiovasculares, incluindo diabetes. Hiperglicemia e hiperlipidemia claramente são fatores predisponentes. Recentemente, a produção mitocondrial de superóxido (RL), com hiperglicemia e hiperlipidemia, mostrou também ser um evento chave relacionado a complicações diabéticas. Componentes de inositol de um mediador putativo inositolglicano da ação da insulina denominado, D-quirositol (DCI) tem demonstrado efeitos metabólicos similares aos da insulina *in vivo*. Nós testamos a hipótese que um derivado sintético mais lipossolúvel do DCI, o 3,4-dibutiril-D-quirositol (db-DCI) poderia prevenir ou reverter a DE em ratos e coelhos diabéticos por aloxana após 4 semanas da indução. Também comparamos o efeito do db-DCI ao do mioinositol (mio-INS) (inositol endógeno). O db-DCI administrado por via oral reduziu a hiperglicemia e hipertrigliceridemia a  $31,1 \pm 3,7\%$  e  $60,9 \pm 5,8\%$ , respectivamente. A administração oral crônica preveniu a DE em anéis de aorta e leitos arteriolares mesentéricos. A administração aguda dos inosítois *in vitro* (uma hora), para todos os tecidos estudados, reverteu a DE. A potenciação do relaxamento induzido por óxido nítrico (NO) pela superóxido dismutase (SOD) e pelos inosítois foi também demonstrada em tecidos diabéticos. Dois inosítois, DCI e db-DCI diminuíram a nível controle a formação elevada de radicais livres (RL) em células endoteliais pós-incubação em alta concentração de glicose, de maneira dose-dependente em concentrações de caráter submicromolar. A redução de azul de nitrotetrazólio (NBT) por superóxido gerado por um sistema xantina/xantina oxidase foi prevenida tanto em presença de SOD como na dos inosítois. A imunohistoquímica de anéis de aorta para nitrosotiois e nitrotirosina demonstrou uma diminuição em anéis diabéticos e uma restauração com a administração de inosítois. Concluindo, os inosítois testados preveniram e reverteram a DE em vasos de resistência e condutância de ratos e coelhos diabéticos, reduzindo RL em células endoteliais e preveniram a sinalização do NO. Estes efeitos positivos estão provavelmente relacionados tanto à atividade metabólica como a de "scavenger" dos inosítois. De cada inositol testado o db-DCI foi mais efetivo.

## ABSTRACT

**Effects of 3,4-dibutyl D-chiro-inositol on endothelial dysfunction of Diabetes Mellitus**

Lucília Maria Abreu Lessa

Supervisor: Manassés Claudino Fonteles

Endothelial dysfunction (ED) is an early common feature of diseases with cardiovascular risk, including diabetes. Hyperglycemia and hyperlipidemia clearly are causative factors. Recently excessive mitochondrial superoxide (ROS) production with hyperglycemia and hyperlipidemia was also shown to be a key mechanistic event related to diabetic complications. Inositol components of a putative insulin inositol glycan mediator namely, D-chiro-inositol (DCI) have demonstrated *in vivo* insulin-like metabolic effects. We tested the hypothesis that the its soluble derivative 3,4-dibutyl D-chiro-inositol (db-DCI) would prevent or reverse ED in 4-week alloxan-diabetic rats and rabbits. We also compared the effect of db-DCI with the actions of myoinositol (myo-INS) (endogenous inositol). Endothelium-dependent versus endothelium-independent relaxations of aortic rings, arteriolar mesenteric beds of rats and aortic rings and kidneys of rabbits were examined. The administration of db-DCI orally reduced hyperglycemia and hypertriglyceridemia (HTG) to  $31,1 \pm 3,7\%$  e  $60,9 \pm 5,8\%$ , respectively. Chronic oral administration prevented ED in rat aortic rings and arteriolar mesenteric beds. Acute db-DCI administration *in vitro* (one hour), to all diabetic tissues studied reversed ED. The relaxation induced by Ach and NO was potentiated in aortic rings. Potentiation of nitric oxide (NO) relaxation by superoxide dismutase (SOD) and by inositols was also demonstrated in diabetic tissues. Two inositols DCI and db-DCI were tested for their ability to decrease elevated ROS generated by incubation of endothelial cells in high glucose. They were effective dose dependently at low micromolar concentrations. The reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) by superoxide generated by the xanthine/xanthine oxidase system was also evaluated in the presence of SOD or the db-DCI. The inositol prevented NBT reduction with db-DCI more efficacious than the myo-INS. Histochemical examination of aortic rings for protein SNO and nitrotyrosine demonstrated a decrease in diabetic rings for protein SNO and nitrotyrosine demonstrated a decrease in diabetic rings and a restoration with administered db-DCI. In summary, all inositols tested prevented and reversed ED in rat and rabbit conductance and resistance vessels, reducing RS in endothelial cells and preserving NO signaling. These positive effects are probably related to both their metabolic and antioxidant scavenging activities. Of each inositols tested db-DCI was the most effective.

## *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Apresentação

A diabetes mellitus é definida como uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina, e/ou da incapacidade desta de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (Consenso em Diabetes, SBD,2002). Hoje, esta patologia é considerada um importante problema de saúde pública. Sua incidência e prevalência vêm aumentando, alcançando proporções epidêmicas. Está associada a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevida dos indivíduos. Além disso, acarreta altos custos para o seu controle metabólico e tratamento de suas complicações.

Esta síndrome é caracterizada por um descontrole no metabolismo da glicose desencadeando uma característica hiperglicemia crônica. A insulina tem o papel de regulador primário da concentração sanguínea de glicose, dessa forma, tanto na diabetes tipo I, onde há ausência total de insulina, como na diabetes tipo II, onde comumente ocorre resistência à insulina, a regulação deste hormônio está também diretamente relacionada aos mecanismos que rodeiam a fisiopatologia da diabetes.

A doença cardiovascular é a principal responsável pela redução da sobrevida de pacientes diabéticos, sendo a causa mais frequente de mortalidade (Panzram, 1987). O aumento da mortalidade cardiovascular dos pacientes diabéticos está relacionado ao estado diabético *per se* e à agregação de vários fatores de risco cardiovasculares, como obesidade, hipertensão arterial e dislipidemia, entre outros. O esquema terapêutico para diabetes deve levar em consideração a presença destes fatores de risco. A disfunção endotelial é um ponto crucial para o desenvolvimento das complicações associadas a esses fatores de risco, especialmente na diabetes. O endotélio atua como alvo e mediador da microangiopatia diabética.

Nesta patologia ocorre desenvolvimento da microangiopatia específica na retina, glomérulo renal e nervos periféricos que proporciona a ocorrência de cegueira, doença renal e neuropatias debilitantes. Uma alteração constante na função vascular durante a diabetes é a diminuição da atividade de vasodilatadores oriundos do endotélio, tais como óxido nítrico, e uma atividade aumentada de vasoconstritores, tais como angiotensina II e endotelina I (Ginsberg e Huang, 2000; Wei et al., 1998; Cohen, 1993).

Em artérias de animais diabéticos, a disfunção endotelial parece envolver tanto resistência insulínica como hiperglicemia (Hsueh e Law, 1998; Tesfamariam e Cohen, 1992). A atenuação das respostas a vasorelaxantes dependentes do endotélio tem sido demonstrada em anéis isolados de aorta (Nascimento et al., 2003; Rodríguez-Mañas et al., 1998; Hattori et al., 1991; Kamata et al., 1989) e na vasculatura renal de animais diabéticos (Nascimento et al., 2003; Costa e Forti e Fonteles, 1998), indicando que tanto vasos de condutância como de resistência são afetados pela disfunção do endotélio.

Dessa forma, a importância das complicações vasculares nos índices de morbidade e mortalidade na diabetes mellitus é singular. Assim, o endotélio representa tanto um forte alvo terapêutico como também a avaliação da sua função pode fornecer o grau de desenvolvimento das complicações diabéticas. A alteração da vasoreatividade endotélio-dependente tornou-se nas últimas décadas a medida mais utilizada para verificar a função/disfunção endotelial tanto no campo de pesquisa básico como no campo clínico em humanos e animais. A avaliação da função endotelial pode ser estimada indiretamente medindo-se a vasodilatação endotélio-dependente e os níveis plasmáticos de proteínas regulatórias derivadas do endotélio, especialmente o fator de Von Willebrand (Thompson et al., 1995; Omland et al., 1994; Stehouver e Donker, 1993; Ridker et al., 1993; Jansson et al., 1991; Vane et al., 1990). Na diabetes tipo II tem-se demonstrado que a diminuição da vasodilatação endotélio-dependente é um marcador mais sensível de disfunção endotelial do que os níveis plasmáticos do fator de Von Willebrand (Johnstone et al., 1993; Calver et al., 1992).

Por outro lado, estudos mostram que o dano oxidativo é um fator contribuinte no desenvolvimento de complicações da diabetes (Nascimento et al., 2003; Giugliano et al., 1996; Tesfamariam, 1994; Baynes, 1991; Wolff, 1987). Apesar da origem deste estresse oxidativo não estar totalmente definida, está claro que a formação de radicais livres (RL), incluindo ânion superóxido pode estar elevada tanto na diabetes tipo I (Gildel Valle et al., 2005) como na tipo II e até mesmo durante o estado de intolerância a glicose (Ceriello et al., 1998). Alguns estudos demonstram, por exemplo, uma atividade diminuída de enzimas antioxidantes e aumento dos marcadores celulares de lipoperoxidação no córtex renal de animais diabéticos (Dincer et al., 2002; Jachec et al., 2002).

Existem grandes evidências que suportam um papel importante para os radicais livres na atenuação da vasodilatação endotélio-dependente observada em uma variedade de preparações vasculares, isoladas de animais experimentais diabéticos (Nascimento et al., 2003; Rosen et al., 1995; Keegan et al., 1995; Hattori et al., 1991; Diederich et al., 1994; Tesfamariam, 1993; Langenstroer e Pieper; Pieper e Gross, 1988). Acredita-se que esta disfunção envolve principalmente uma biodisponibilidade reduzida do óxido nítrico (NO), oriunda de sua rápida inativação pelo radical superóxido (Darley-Usmar e White, 1997; Gryglewski et al., 1986). Zanetti e colaboradores (2001) confirmam esta relação demonstrando que uma transferência de gene proporcionando o aumento da expressão de isoformas de superóxido dismutase (SOD) reverte a disfunção endotelial em aortas diabéticas, pois a SOD se contrapõe a inativação do NO, aumentando sua atividade (Ohishi e Carmines, 1995). Além disso, já está claro que a disfunção endotelial está acompanhada por uma diminuição da expressão de SOD em aortas de ratos diabéticos (Kobayashi e Kamata, 1999).

Além de se atribuir a diminuição da biodisponibilidade do NO a sua inativação por agentes como o ânion superóxido, outro fator que poderia contribuir seria uma alteração no processo da formação de NO (Meininger et al., 2000). Shafiei e colaboradores (2003) demonstraram em experimentos com imunohistoquímica que a

atividade da enzima NO sintetase (catalisa a reação de formação do NO convertendo L-arginina a NO e citrulina) está diminuída em células endoteliais de aorta de animais diabéticos. Assim o acesso à atividade da enzima NO sintetase, pode ajudar a verificar um possível defeito a nível das células endoteliais e prover mais conhecimentos no intuito de se encontrar vias para se prevenir ou até mesmo tratar a disfunção endotelial na diabetes.

Um sistema de sinalização intracelular da insulina envolvendo a intermediação de moléculas conhecidas como mediadores putativos da insulina tem sido proposto operar em conjunto com a cascata da tirosina quinase (Larner et al., 1990). Estes mediadores putativos são formados por moléculas de inositolfosfoglicanos, como exemplo o mioinositol, o D-qui-ro-inositol e o pinitol, encontrados tanto em tecidos animais como vegetais. Esses inositóis, especialmente o D-qui-ro-inositol, apresentam atividade hipoglicemiante, além de mimetizar diversos efeitos associados a ação da insulina e reverter parcialmente a disfunção endotelial desenvolvida com a diabetes. O 3,4-dibutiril-D-qui-ro-inositol é um análogo sintético do D-qui-ro-inositol, que foi sintetizado com a intenção de aumentar sua retenção devido a maior lipossolubilidade. Dessa forma, acredita-se que os efeitos benéficos desta nova molécula poderão ser mais eficazes e duradouros.

Neste trabalho de dissertação de mestrado salientamos os mecanismos responsáveis pelas complicações associadas a diabetes mellitus, bem como oferecemos uma perspectiva direcionada à terapêutica dessa enfermidade, abordando os efeitos da vasculopatia especialmente associados ao estresse oxidativo. A hipótese testada no nosso trabalho é que o 3,4-dibutiril-D-qui-ro-inositol pode reverter a disfunção endotelial na diabetes e atuar como um potencial antioxidante no combate às complicações relacionadas à esta síndrome.

## 1.2 Aspectos gerais da Diabetes

A diabetes mellitus (DM), uma doença metabólica causada por uma deficiência na secreção de insulina pancreática e/ou dano na responsividade do tecido à insulina, afeta a função de vários músculos lisos a medida em que o quadro se complica. Pacientes diabéticos estão particularmente sujeitos a desordens cardiovasculares, incluindo micro e macroangiopatia, arteriosclerose, insuficiência cardíaca congestiva e hipertensão (Garcia et al., 1974; Jarrett, 1989). A taxa de mortalidade em decorrência de doenças cardiovasculares é quase três vezes maior em pacientes diabéticos que na população em geral (Jarrett, 1989).

A diabetes acomete um grande número de pessoas de todos os níveis sociais, em todo o mundo. Em um quadro não tratado, a diabetes mellitus é reconhecida por uma elevação crônica do nível de glicose no sangue. Este parâmetro é algumas vezes acompanhado por sintomas como sede severa, micção profusa, polifagia, perda de peso, e estupor. A elevada concentração de glicose sanguínea e outras anormalidades bioquímicas resultam da deficiência nas células  $\beta$  do pâncreas endócrino e/ou da diminuição da sensibilidade para a insulina nas células alvo (National Diabetes Data Group, 1979; World Health Organization (WHO) Study Group, 1985).

Nas duas décadas foi observado um aumento expressivo do número de pessoas diagnosticadas com diabetes por todo mundo. Mudanças pronunciadas no ambiente do homem e na sua conduta e estilo de vida, tem acompanhado a globalização, e isto tem resultado em taxas crescentes tanto de diabetes como obesidade.

A evolução para a DM ocorre ao longo de um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem as denominações de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. O primeiro representaria evidências precoces de disfunção da célula beta; o segundo, na presença de glicemia de jejum normal, representaria quadro de resistência insulínica. Na ocorrência de ambos os estágios, haveria um quadro misto, com maior risco para progressão da diabetes e

doença cardiovascular (Davies et al., 2000). Os níveis glicêmicos respectivos para cada estágio estão descritos na tabela 1. Qualquer dos estágios, pré-clínico ou clínico, podem progredir para o estado diabético ou reverter para a normalidade da tolerância à glicose.

**Tabela 1:** Valores de glicose plasmática (em mg/dl) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos

<i>CATEGORIA</i>	<i>JEJUM</i>	<i>2H APÓS 75G DE GLICOSE</i>	<i>CASUAL</i>
<b>Glicemia normal</b>	<110	<140	
<b>Tolerância à glicose diminuída</b>	>110 a <126	≥140 a <200	
<b>Diabetes mellitus</b>	≥126	≥200	≥200 (com sintomas clássicos)

**Fonte:** Consenso Brasileiro de Diabetes, 2002

A classificação da diabetes mellitus atualmente recomendada (World Health Organization (WHO), 1999; Alberti e Zimmet, 1998; Expert Committee, 1997) incorpora o conceito de estágios clínicos da DM, desde a normalidade, passando para a tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia de jejum alterada, até a DM propriamente dita.

A diabetes mellitus do tipo I resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas e tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida. Corresponde a 5% a 10% do total de casos. A forma rapidamente progressiva é comumente observada em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer também em adultos. A forma lentamente progressiva ocorre geralmente em adultos e é referida como diabetes latente auto-imune do adulto (Lada) ((World Health Organization (WHO), 1999).

A diabetes mellitus do tipo II resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir de 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo, mais raramente em adolescentes. Abrange 85% a 90% do total de casos. É importante ressaltar que, nos últimos anos, a incidência de diabetes do tipo II vem crescendo entre crianças e jovens nos Estados Unidos, em associação ao aumento da obesidade (American Diabetes Association, 2000)

A epidemia diabética diz respeito particularmente à diabetes tipo II, presente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A perspectiva global de pessoas com diabetes permite a estimativa de que em 2010 haverá de 150 milhões a 220 milhões de diabéticos e 300 milhões em 2025 (Amos et al., 1997). A maioria dos casos será de diabetes tipo II, a qual está fortemente associada com estilo de vida sedentário e obesidade (Zimmet, 1999).

Apesar da diabetes tipo II ser numericamente mais prevalente na população geral, a diabetes tipo I é a doença crônica mais comum em crianças. Porém, a prevalência da diabetes tipo II vem aumentando em crianças e adolescentes, o padrão poderá ser revertido dentro de duas décadas.

De acordo com o Consenso Brasileiro sobre Diabetes (2002), no Brasil a diabetes mellitus reflete o quadro mundial. Como diagnóstico primário de internação hospitalar, a diabetes aparece como a sexta causa mais frequente e contribui de forma significativa (30% a 50%) para outras causas como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatias, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (Silvestre, 1997). A DM é a principal causa de amputações de membros inferiores (Spilchler et al., 1998), e cegueira adquirida, além de aproximadamente 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise são diabéticos (Bruno & Gross, 2000).

No período de janeiro de 1999 a junho de 2004 foram diagnosticadas no Brasil mais de 730 mil pessoas com diabetes, dos quais 78% apresentavam diabetes tipo II. No Ceará, neste mesmo período, foram diagnosticados mais de 24 mil casos com diabetes mellitus (78% com DM tipo II), representando o nono estado no Brasil na escala de prevalência desta síndrome (Ministério da Saúde, 2004).

Medidas de prevenção para a diabetes são alvos chave para reduzir o impacto desfavorável sobre a morbimortalidade prematura dos pacientes diabéticos (Zimmet, 2001), principalmente com relação às complicações macro e micriangiopáticas que levam a distúrbios cardiovasculares (Zimmet, 1999). Está bem documentado que a síndrome metabólica pode estar presente até dez anos antes da detecção de alterações glicêmicas, dessa forma, a prevenção e combate aos fatores de risco é mais que prudente.

### **1.3. Controle da glicemia e sinalização da insulina**

A concentração plasmática de glicose permanece entre os limites estreitos de 4 a 7mM (72 – 126 mg/dl) em indivíduos normais, excluindo o período pós-prandial e o de jejum. Este controle é governado pelo balanço entre absorção de glicose pelo intestino, produção pelo fígado, e captação e metabolismo pelos tecidos periféricos. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e tecido adiposo, e inibe a produção de glicose hepática, assim tem o papel de regulador primário da concentração sanguínea de glicose. A insulina também estimula o crescimento e diferenciação celular, e promove a estocagem de substratos no tecido adiposo, fígado e músculo por estimular a lipogênese, síntese proteica e de glicogênio, e inibir a lipólise, glicogenólise e lise proteica. A resistência insulínica ou deficiência, resulta na profunda desregulação desses processos, e produz elevação dos níveis pós-prandiais e no jejum, de glicose e lipídio (Saltiel e Kahn, 2001).

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

### 1.3.1 Vias de sinalização da insulina

O receptor de insulina pertence a subfamília de receptores tirosina quinase que inclui o receptor do fator de crescimento insulina-símile (IGF)-1 e o receptor relacionado ao receptor de insulina (IRR) (Patti e Kahn, 1998). Estes receptores são proteínas tetraméricas consistindo de duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$  que funcionam como enzimas alostéricas nas quais a subunidade  $\alpha$  provoca desrepressão da atividade catalítica da subunidade  $\beta$ , seguida por uma transfosforilação das subunidades  $\beta$  e uma mudança conformacional que aumenta ainda mais a atividade catalítica (Patti e Kahn, 1998). A Insulina, os receptores IGF-1 e IRR podem formar híbridos funcionais; assim, uma mutação inibitória em um receptor pode inibir a atividade de outros (Saltiel e Kahn, 2001).

Na presença de concentrações de insulina que produzem efeitos máximos, menos de 10% dos receptores estão ocupados. Após a sua agregação com a insulina, agregam-se em grupos, e os complexos de insulina-receptor são internalizados em vesículas, resultando em regulação decrescente, a insulina internalizada é degradada por lisossomos, enquanto os receptores são reciclados para a membrana plasmática. As ações metabólicas imediatas são mediadas, em grande parte, através da alteração do estado das enzimas-chave pela ativação de uma cascata de quinases e fosfatases, desencadeada pela atividade de tirosina quinase da subunidade  $\beta$  do receptor. As proteínas de substrato do receptor de insulina (IRS) sofrem rápida fosforilação da tirosina em resposta à insulina e ao IGF-1, mas não a outros fatores de crescimento que atuam através das tirosinas quinases receptoras.

Pelo menos nove substratos intracelulares do receptor quinase de insulina/IGF-1 têm sido identificados. Quatro destes pertencem à família das proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS) (White, 1998). As tirosinas fosforiladas nestes substratos atuam como sítios ativadores para proteínas que contêm domínios SH2 (Src – homologia – 2). Muitas destas proteínas SH2 são adaptadores moleculares, tais como a subunidade p85 regulatória da fosfatidilinositol-3-quinase a qual ativa proteínas G pequenas por ligação a fatores de troca de nucleotídeos e exerce vários efeitos importantes, incluindo recrutamento de transportadores da glicose sensíveis à insulina (GLUT-4) do aparelho de Golgi para a membrana plasmática nas células musculares e adipócitos. Outras são as próprias enzimas, incluindo a fosfotirosina fosfatase SHP2 e a tirosina quinase citoplasmática Fyn. A ligação do substrato a essas proteínas SH2 pode regular suas atividades, ou em alguns casos sua localização subcelular. As diferentes proteínas IRS exercem funções diferentes a nível celular, provavelmente devido a diferenças na distribuição tecidual, localização intracelular e atividade intrínseca de proteínas (Saltiel e Kahn, 2001).

De acordo com Lerner e Huang (1998), a elucidação das cascatas de fosforilação é insuficiente para explicar a diversidade de efeitos da insulina. A existência de um mediador putativo para ação da insulina foi inicialmente proposta por

Lerner e associados na base de uma dissociação de várias ações da insulina, a qual sugere que um segundo passo após a ligação da insulina deve envolver vias divergentes.

Estruturalmente esses mediadores são fosfoglicanos de inositóis (IPGs) derivados de lipídios de fosfatidilinositol glicosílicos (GPIs) ou proteínas ancoradas no plasma ou outras membranas celulares (Low e Saltiel, 1988; Romero et al., 1988). A teoria relacionada à ação dos mediadores associados à atividade da insulina implica em um modelo de sinalização do receptor da insulina através tanto de tirosina quinase como de proteínas G. Assim, a insulina se ligaria ao seu receptor ativando a cascata de fosforilação da tirosina quinase como também ativando grandes proteínas G com suas três subunidades  $\alpha\beta\gamma$ . Estas grandes proteínas G ativam pequenas proteínas G por mecanismos ainda não conhecidos, os quais, por sua vez, ativam fosfolipases de membrana C e/ou D para clivar GPIs em IPGs solúveis em água na superfície externa da membrana (Larner e Huang, 1998).

De acordo com Larner e Huang (1999) estes IPGs entram na célula de origem ou células vizinhas por um mecanismo autócrino-parácrino e ativam a fosforilação da tirosina do IRS por uma tirosina quinase celular, tal como Src, recrutada para a membrana pelas subunidades  $\beta\gamma$  dissociadas de grandes proteínas G. A fosforilação da tirosina do IRS mediada por IPGs constitui, então, um mecanismo de “*cross-talk*” com a cascata da tirosina quinase iniciada diretamente pela ligação da insulina ao seu receptor.

## **1.4. Fisiopatologia da Diabetes Mellitus**

### **1.4.1 Diabetes Mellitus Tipo I**

A diabetes mellitus tipo I é uma discreta desordem e sua patogênese envolve fatores ambientais que podem ativar mecanismos autoimunes em indivíduos geneticamente susceptíveis, promovendo uma progressiva perda das células  $\beta$  das

Lerner e associados na base de uma dissociação de várias ações da insulina, a qual sugere que um segundo passo após a ligação da insulina deve envolver vias divergentes.

Estruturalmente esses mediadores são fosfolípidos de inositol (IPGs) derivados de lipídios de fosfatidilinositol glicosílicos (GPIs) ou proteínas ancoradas no plasma ou outras membranas celulares (Low e Saltiel, 1988; Romero et al., 1988). A teoria relacionada à ação dos mediadores associados à atividade da insulina implica em um modelo de sinalização do receptor da insulina através tanto de tirosina quinase como de proteínas G. Assim, a insulina se ligaria ao seu receptor ativando a cascata de fosforilação da tirosina quinase como também ativando grandes proteínas G com suas três subunidades  $\alpha\beta\gamma$ . Estas grandes proteínas G ativam pequenas proteínas G por mecanismos ainda não conhecidos, os quais, por sua vez, ativam fosfolipases de membrana C e/ou D para clivar GPIs em IPGs solúveis em água na superfície externa da membrana (Larner e Huang, 1998).

De acordo com Larner e Huang (1999) estes IPGs entram na célula de origem ou células vizinhas por um mecanismo autócrino-parácrino e ativam a fosforilação da tirosina do IRS por uma tirosina quinase celular, tal como Src, recrutada para a membrana pelas subunidades  $\beta\gamma$  dissociadas de grandes proteínas G. A fosforilação da tirosina do IRS mediada por IPGs constitui, então, um mecanismo de “*cross-talk*” com a cascata da tirosina quinase iniciada diretamente pela ligação da insulina ao seu receptor.

## **1.4. Fisiopatologia da Diabetes Mellitus**

### **1.4.1 Diabetes Mellitus Tipo I**

A diabetes mellitus tipo I é uma discreta desordem e sua patogênese envolve fatores ambientais que podem ativar mecanismos autoimunes em indivíduos geneticamente susceptíveis, promovendo uma progressiva perda das células  $\beta$  das

ilhotas pancreáticas (Harrison et al., 1999). Em vários aspectos, tentativas de se determinar a etiologia da diabetes tipo I têm fracassado, apesar de décadas de pesquisa (Harrison et al., 1999; Atkinson & Maclaren, 1994). A predisposição é mediada por um número de genes que interagem com o ambiente de uma maneira complexa (Harrison et al., 1999; Atkinson & Maclaren, 1994).

Nas últimas décadas têm-se especulado que os fatores ambientais que propiciam a ocorrência da diabetes tipo I em indivíduos geneticamente susceptíveis, possam estar relacionados à: infecções virais (p.ex. coxsackie, citomegalovirus); dieta inicial da criança (substituição precoce da amamentação pelo leite de vaca); infecções prenatais; toxinas (p.ex. nitrosaminas, bafilomicina, concanamicina A); administração de vacinas entre outros. Vale salientar que nenhuma evidência clara do papel de quaisquer desses agentes tem sido estabelecida. No entanto tem sido determinada uma associação consistente de genes associados ao HLA (human leukocyte antigen) como de genes não associados, à predisposição da DM tipo I (Zimmet et al., 2001).

A identificação da natureza dos agentes ambientais que causam esta injúria se torna ainda mais difícil devido ao longo período entre a exposição e o desenvolvimento da hiperglicemia, a complexa genética da doença, e o caráter múltiplo de insultos necessários para se desenvolver a doença (Zimmet et al., 2001).

#### **1.4.2. Diabetes Mellitus Tipo II**

A DM tipo II uma doença multifatorial que mostra heterogeneidade em muitos aspectos (Groop, 1997). Tipicamente, a resistência insulínica é uma característica inicial desta condição, a qual é inicialmente compensada em parte pelo aumento da produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas (hiperinsulinemia) (DeFronzo, 1997). Subsequentemente, a medida que estas células  $\beta$  se tornam exaustas, os efeitos combinados da resistência à insulina e do déficit de secreção de insulina reduzem a captação e utilização de glicose insulino-dependente no músculo esquelético e previne a supressão mediada pela insulina da sobrecarga de glicose hepática (DeFronzo, 1997;

Polonsky et al., 1996). A deterioração continuada do controle endócrino exarceba este distúrbio metabólico e aumenta a hiperglicemia.

Os efeitos deletérios da hiperglicemia crônica (glicotoxicidade) se desenvolvem pela glicação não enzimática de proteínas, efeitos osmóticos e sequelas metabólicas, mas a hiperglicemia não atua sozinha para causar as complicações crônicas características da diabetes tipo II (Brownlee, 1984; Vlassara, 1994). A situação é composta por resistência insulínica, a qual se caracteriza por uma síndrome de fatores de risco cardiovasculares (Reaven, 1995). Esta síndrome metabólica inclui obesidade, hiperinsulinemia (pelo menos inicialmente na diabetes tipo II), hipertensão, dislipidemia, arteriosclerose, microalbuminúria, hipercoagulabilidade, assim como hiperglicemia. Este novo paradigma relacionado à diabetes tipo II também influencia a terapia contemporânea para esta doença, oferecendo novos alvos de combate e não somente diminuir a hiperglicemia (Zimmet, 1999).

Existe um debate contínuo a respeito da causa inicial para o desenvolvimento desta síndrome. Fatores genéticos, obesidade visceral, resistência insulínica e disfunção endotelial podem contribuir tanto isoladamente como em conjunto (Zimmet et al., 1999). No entanto, já é constatado que a morbidade e a mortalidade tanto na diabetes tipo I como na do tipo II são causadas principalmente por suas complicações vasculares (disfunção endotelial) associadas ao aumento exacerbado do estresse oxidativo (Brownlee, 2001; Stehouwer et al., 1997)

A possibilidade de se prevenir a diabetes tipo II por intervenções que afetam o estilo de vida das pessoas com alto risco para a doença é agora o objetivo de um grande número de estudos; estes têm focado as pessoas com tolerância à glicose diminuída (TGD). TGD é definida como hiperglicemia (níveis de glicose intermediários entre normal e diabético) seguindo uma sobrecarga de glicose (World Health Organization, 1999), e afeta pelo menos 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Representa um estágio chave na história natural da diabetes tipo II já que as pessoas neste estágio têm um maior risco futuro de desenvolver a doença World

Health Organization, 1999). Aproximadamente 40% destas pessoas desenvolvem a diabetes em cerca de 5-10 anos, porém alguns voltam ao normal, ou permanecem com TGD (Zimmet et al., 2001). Glicemia de jejum alterada foi introduzida recentemente como outra categoria do metabolismo anormal de glicose (World Health Organization, 1999; American Diabetes Association, 1997). Esta é definida como a concentração basal de glicose no jejum e, da mesma forma que a IT, também está associada a riscos de doenças cardiovasculares e diabetes futura (Zimmet et al., 2001)

### **1.4.3. Mecanismos da Vasculopatia Diabética**

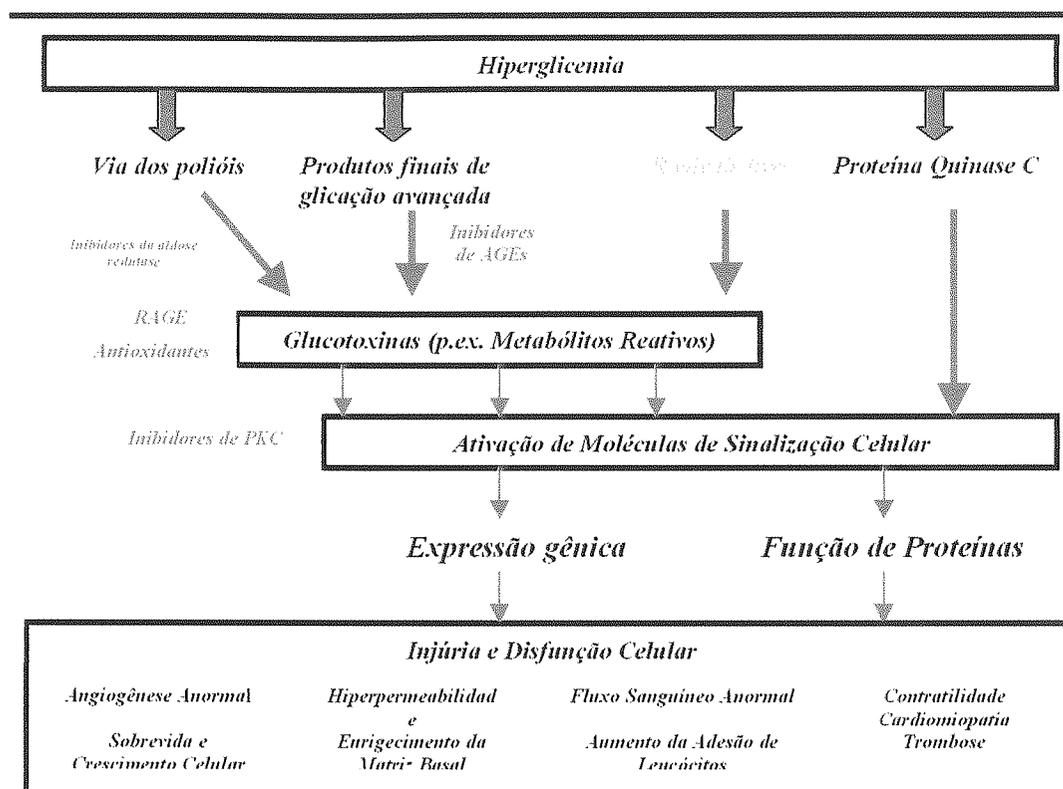
As complicações vasculares permanecem como a principal causa de morbidade e mortalidade na população diabética (Cooper & Johnston, 2000). A diabetes representa um modelo distinto de doença crônica vascular na qual a homeostasia da glicose alterada desencadeia disfunção de múltiplos órgãos. Estas complicações podem ser divididas em microvasculares e macrovasculares. As principais complicações microvasculares são nefropatia, retinopatia, e neuropatia, onde as complicações macrovasculares se manifestam como arteriosclerose acelerada (Feener & King, 1997), clinicamente resultando em doença isquêmica do coração prematura, aumento do risco de doença cerebrovascular, e doença vascular periférica severa (Clark & Lee, 1995 ).

Fatores metabólicos, humorais e hemodinâmicos podem contribuir para a característica disfunção observada na vasculopatia diabética (Figura 1) (Cooper et al., 1998). A doença microvascular na retina, glomérulo, e vasa nervorum tem características fisiopatológicas similares. Inicialmente, no curso da diabetes, a hiperglicemia intracelular causa anormalidades no fluxo sanguíneo e aumenta a permeabilidade vascular. Isto reflete uma atividade reduzida de vasodilatadores tal qual óxido nítrico, atividade aumentada de vasoconstritores tal qual a angiotensina II (A-II) e endotelina I (ET-I), e a formação de fatores de permeabilidade tal qual o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Anormalidades qualitativas e quantitativas da matriz extracelular contribui para um aumento irreversível na permeabilidade

vascular. Com o tempo, ocorre perda de células do espaço microvascular, em parte como resultado de uma morte celular programada, e há uma oclusão capilar progressiva devido tanto a uma superprodução da matriz extracelular induzida por fatores de crescimento tal qual o fator de transcrição- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e para deposição de proteínas plasmáticas ácido-Sciff-positivas extravasada. A hiperglicemia pode também diminuir a produção de fatores tróficos para células endoteliais e neuronais. Quando agrupadas, estas mudanças promovem uma neovascularização induzida por edema, isquemia e hipóxia na retina, peoteinúria, expansão da matriz mesangeal e gloméruloesclerose no rim, e degeneração axonal multifocal dos nervos periféricos.

#### **1.4.3.1. Mecanismos de dano vascular induzido por hiperglicemia**

Como estas diversas patologias microvasculares e macrovasculares resultam da hiperglicemia? Quatro hipóteses principais a respeito de complicações diabéticas causadas por hiperglicemia têm gerado muitos achados, assim como vários ensaios clínicos baseados em inibidores específicos destes mecanismo. As hipóteses mais estudadas são, aumento da via dos polióis; formação exacerbada de produtos finais da glicosilação avançada (AGES); ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC); incremento na via das hexosaminas; e a teoria intermediária do aumento de radicais livres (RL). Apesar de tantos avanços no desenvolvimento da patogenia da vasculopatia diabética, ainda não existe uma hipótese unificada ligando estes mecanismos.



Fonte: Sheetz & King, 2002

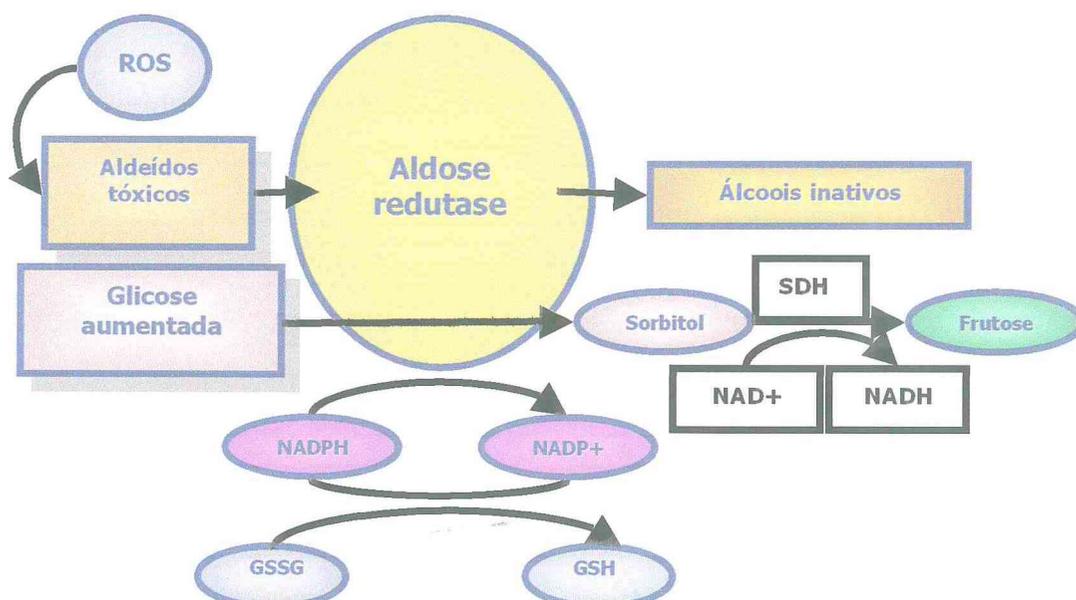
**Figura 1:** Categorização das vias de sinalização envolvidas nas complicações diabéticas. AGEs: produtos finais de glicação avançada; RAGE: receptores de AGEs; PKC: proteína quinase C

### *Incremento da Via dos Polióis*

A elevação do nível de glicose intracelular pode causar um aumento do fluxo da enzima aldose redutase (AR), a qual é somente ativada quando a concentração intracelular de glicose alcança o nível hiperglicêmicos. A aldose redutase utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) para reduzir a glicose a sorbitol, o qual é então oxidado para formar frutose pela sorbitol desidrogenase, com  $\text{NAD}^+$  reduzido a NADH (Figura 2). O fluxo através dessa via durante a hiperglicemia varia de 33% do total da glicose utilizada pelo cristalino de coelhos a 11% por eritrócitos humanos. Assim, a contribuição desta via para o desenvolvimento de complicações diabéticas pode ser grande dentre as espécies, ocorrendo tanto em um sítio localizado como em um tecido como um todo (Brownlee, 2001).

Foram propostos vários mecanismos para explicar o potencial de efeitos deletérios induzidos pela hiperglicemia ao proporcionar um incremento da via dos polióis. O primeiro está relacionado a um estresse osmótico induzido pelo sorbitol. Este não se difunde facilmente através das membranas das células, se sugere, portanto, que resulte em um dano osmótico para células microvasculares. As concentrações de sorbitol medidas em vasos e nervos diabéticos, são, no entanto, consideradas baixas para proporcionar dano osmótico (Brownlee, 2001).

Outros mecanismos se referem ao declínio do NADPH celular causado pelo aumento do fluxo da aldose redutase pode diminuir a formação de óxido nítrico nas células endoteliais (Tesfamariam, 1994) e alterar o balanço redox celular. Além disso, o aumento da ação da sorbitol desidrogenase pode promover um aumento da proporção de NADH/NAD<sup>+</sup> e conseqüentemente alterar atividades de enzimas contribuindo para o desenvolvimento de complicações como a retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética (Figura 2) (Williamson et al., 1993).



Fonte: Brownlee, 2001

**Figura 2:** Vias da aldose redutase e dos polióis. ROS: espécies reativas de oxigênio. GSH: glutatona; SDH: sorbitol desidrogenase

Estudos investigando a inibição da via dos polióis *in vitro* demonstraram resultados inconsistentes (Brownlee, 2001). Em um estudo de 5 anos em cachorros, a

inibição da aldose redutase previniu a neuropatia diabética, porém falhou na prevenção da retinopatia ou no enrijecimento da membrana basal de capilares na retina, rim e músculo (Engerman et al., 1994). Vários ensaios clínicos negativos têm questionado a relevância deste mecanismo em humanos (Trial Research Group, 1990). O efeito positivo da inibição da aldose redutase na neuropatia diabética tem, no entanto, sido confirmado em humanos em rigoroso ensaio utilizando o potente inibidor da aldose redutase, zenarestate (Greene et al., 1999).

### *Formação exacerbada dos produtos de glicação avançada (Advanced glycation end products - AGE)*

Durante o curso normal do envelhecimento, as proteínas tornam-se irreversivelmente modificadas por açúcares em um processo conhecido por “reação de Maillard”, promovendo ao tecido um “escurecimento”. A teoria dos AGEs se relaciona à tentativa de explicar as complicações diabéticas como uma forma de envelhecimento acelerado proveniente de modificações covalentes e ligação de proteínas pela ação da glicose e principalmente, de precursores dicarbonil derivados da glicose formados no ambiente intracelular (Brownlee, 2001; Monnier et al., 1984). A glicação de proteínas é uma reação espontânea e é dependente do grau e da duração da hiperglicemia, da meia vida da proteína e da permeabilidade do tecido à glicose livre (Ahmed, 2005). Além disso, acredita-se que a hiperglicemia intracelular é o evento primário na formação de AGEs tanto no ambiente intracelular como no extracelular. Fatores genéticos podem determinar o nível de AGEs nos indivíduos e a predisposição para patologias subjacentes a complicações diabéticas (Leslie et al., 2003).

Nem todos os AGEs foram identificados e os mecanismos pelos quais ocorre sua formação não estão totalmente elucidados. Dada a sua lenta formação, que pode perdurar dias, acreditava-se que apenas proteínas extracelulares de longa vida acumulavam AGEs, no entanto, já se sabe que estes podem ser formados em moléculas de vida curta e até mesmo em fatores de crescimento intracelular (Giardino

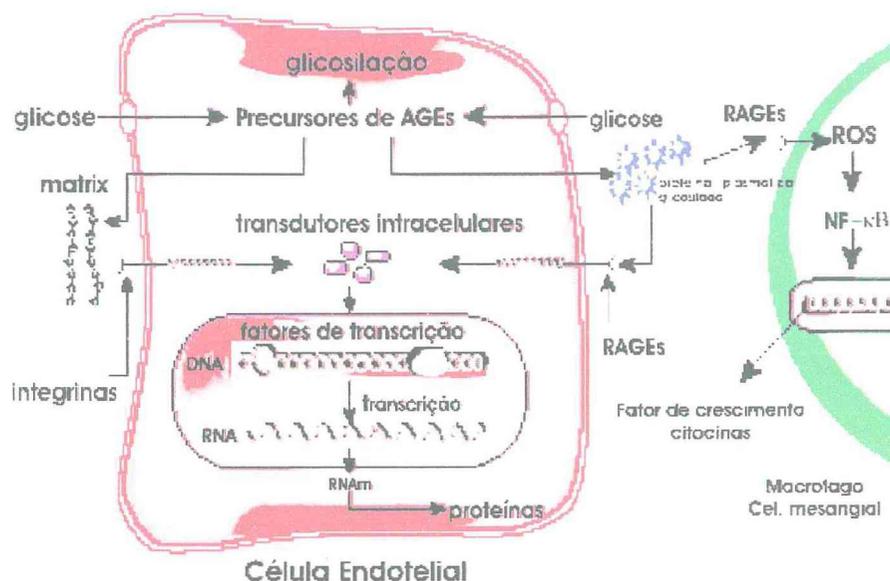
et al., 1994). Além disso, alguns AGEs são exógenos, sendo derivados de alimentos ou mesmo do tabaco (Cerami et al., 1997)

A potencial importância dos AGEs na patogênese de complicações diabéticas está nos achados que demonstram que a utilização de inibidores de AGE preveniram parcialmente várias manifestações funcionais e estruturais da doença microvascular diabética na retina, rim e nervos (Nakamura et al., 1997)

A produção de precursores intracelulares de AGE provoca danos nas células através de três mecanismos gerais. O primeiro é a alteração na função de proteínas intracelulares modificadas por AGEs. O segundo diz respeito a componentes da matriz extracelular modificados por AGEs interagirem anormalmente com outros componentes da matriz e com os receptores para as proteínas da matriz (integrinas) nas células. E o terceiro mecanismo é a ligação de proteínas plasmáticas modificadas por precursores de AGE, a receptores de AGE nas células endoteliais, mesangiais e macrófagos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio mediada pelo receptor. Esta ligação ao receptor de AGE ativa o fator de transcrição pleiotrópica NF- $\kappa$ B, causando modificações patológicas na expressão gênica (Figura 3) (Brownlee, 2001).

A formação de AGE pode danificar o funcionamento da célula por alterar a função de uma larga série de proteínas (Figura 3) (Brownlee et al., 1984), incluindo modificações da estrutura extracelular de proteínas tais como o colágeno (Brownlee, 1995) e de proteínas intracelulares (Giardino et al., 1994; Chibber et al., 1999). Os AGEs alteram a atividade enzimática, diminuem a ligação das enzimas ao ligante, modificam a meia vida de proteínas e alteram a imunogenicidade (Vlassara & Palace, 2002). Radicais livres derivados da glicação causam fragmentação de proteínas e oxidação de ácidos nucleicos e lipídios (Baynes, 1991). Os grupos amino das bases adenina e guanina no DNA são susceptíveis à glicação e formação de AGE,

provavelmente por açúcares intracelulares reativos (Baynes, 2002). Os AGEs podem ainda ser formados em fosfolipídios e induzir lipoperoxidação (Vlassara, 1996).



Fonte: Brownlee, 2001

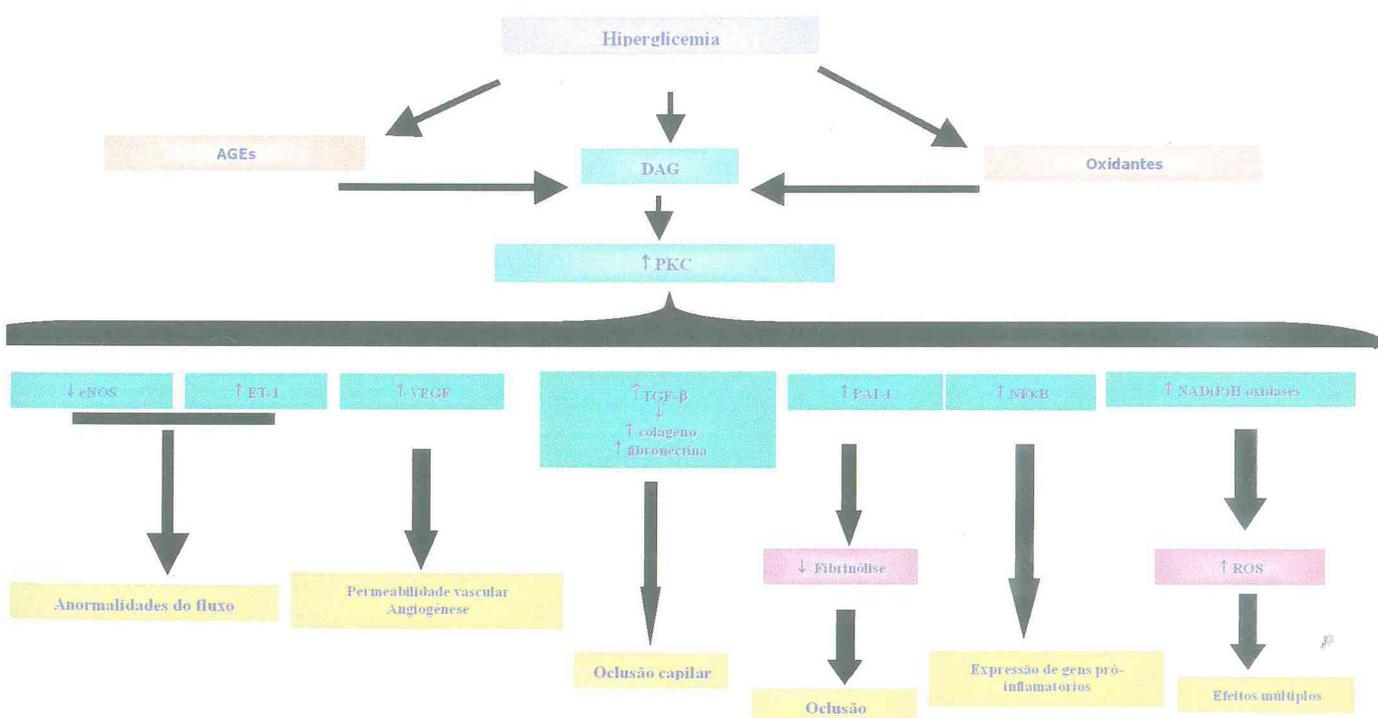
**Figura 3:** Mecanismos pelos quais a produção intracelular de precursores dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) causam dano vascular. RAGE: receptores de AGEs.

### *Proteína Quinase C (PKC)*

O diacilglicerol (DAG) e a PKC são moléculas críticas na sinalização intracelular que podem regular muitas funções vasculares, incluindo permeabilidade, liberação de vasodilatadores, ativação endotelial, e sinalização de fator de crescimento. A ativação fisiológica de PKC mediada por receptor ocorre através da fosfolipase C, a qual promove o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e DAG, os quais ativam novamente PKC (Nishizuka, 1992).

A ativação patológica de PKC pode ocorrer na diabetes. O nível elevado de glicose ativa o fluxo da via glicolítica no estado diabético e promove uma elevação nos níveis intracelulares de gliceraldeído-3-fosfato (Inoguchi et al., 1992). Estes níveis de DAG cronicamente elevados podem, em retorno, ativar PKC. Em adição, DAG-PKC podem indiretamente ser ativados por espécies reativas de oxigênio e AGEs (Figura 4).

A ativação de DAG e PKC está aumentada em vários tecidos de animais diabéticos (Ishii et al., 1998). A ativação de PKC nos vasos sanguíneos da retina, rim e nervos pode produzir dano vascular que inclui permeabilidade aumentada (Nagpala et al., 1996), desregulação do óxido nítrico (Bohlen & Nase, 2001; Kuboki et al., 2000), adesão de leucócitos aumentada (Nonaka et al., 2000) e alterações no fluxo sanguíneo (Shiba et al., 1993). A ativação de PKC pode também estar envolvida na indução da expressão de fatores de crescimento, como VEGF (Williams et al., 1997) e TGF- $\beta$  (Koya et al., 1997) e de sinalização, como VEGF (Aiello et al., 1997) e ET-1 (Schiffrin & Touyz, 1998). Além disso, a ativação de PKC pode também impactar outras vias de sinalização como as que utilizam MAP quinase ou fator de transcrição nuclear (Figura 4) (Tomlinson, 1999).



Fonte: Brownlee, 2001

**Figura 4:** Consequências da ativação de proteína quinase C (PKC) induzida por hiperglicemia. DAG: diacilglicerol; eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial; ET-1: endotelina-1; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral- $\beta$ ; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1.

O tratamento com um inibidor específico de PKC- $\beta$  reduziu significativamente a atividade de PKC na retina e no glomérulo renal de animais diabéticos. Concomitantemente, o tratamento reduziu significativamente o aumento no tempo de

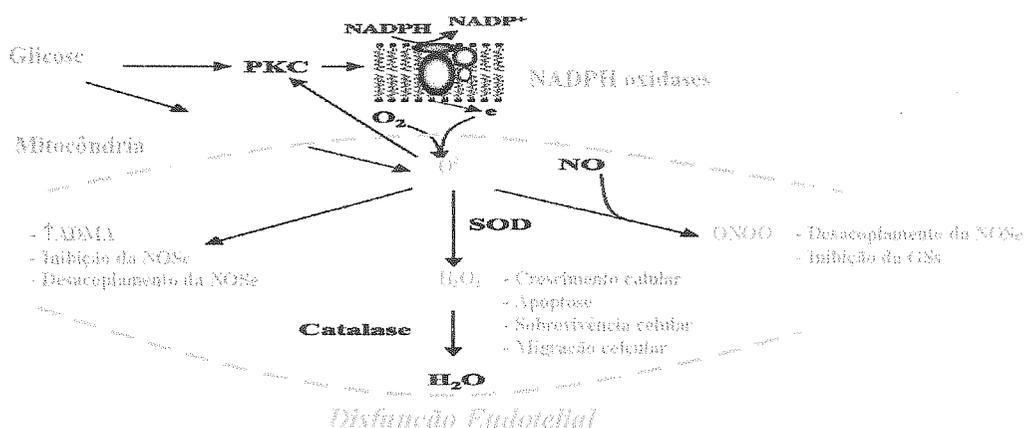
circulação médio na retina induzido pela diabetes, normalizou o aumento na taxa de filtração glomerular e corrigiu parcialmente a excreção urinária de albumina. O tratamento de camundongos com diabetes tipo II com um inibidor específico da isoforma  $\beta$  da PKC melhorou, ainda a expansão glomerular mesangeal acelerada (Koya et al., 2000).

### *Aumento dos Radicais Livres*

Uma das mais antigas teorias relacionadas à complicações diabéticas é que a hiperglicemia pode aumentar o estresse oxidativo através de processos enzimáticos e não-enzimáticos. O metabolismo da glicose através da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico produz equivalentes reduzidos que são usados para guiar a síntese de trifosfato de adenosina via fosforilação oxidativa na mitocôndria. Os produtos oriundos da fosforilação oxidativa mitocondrial inclui radicais livres (RL) como o ânion superóxido, e sua formação é aumentada em um ambiente com nível elevado de glicose (Nishikawa et al., 2000). A produção de ânion superóxido é marcadamente aumentada em consequência de uma diferença de potencial eletroquímico gerada pela elevação do gradiente de prótons na membrana mitocondrial. NishiKawa e colaboradores (2000) observaram que a hiperglicemia aumenta o gradiente de prótons acima de um limiar como resultado de uma superprodução de doadores de elétrons pelo ciclo do ácido tricarboxílico nas células endoteliais. Este ponto representa uma ligação entre os mecanismos que induzem as complicações diabéticas em decorrência da hiperglicemia (Gil-del Valle et al., 2005; Nishikawa et al., 2000; Korshunov et al., 1997).

O estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de complicações tanto na diabetes tipo I (Gil-del Valle et al., 2005) como na diabetes tipo II (Gopaul et al., 1995), e a produção de superóxido por tecidos vasculares e sua interação com o NO exerce um papel importante na fisiopatologia vascular dessas enfermidades (Cai & Harrison, 2000). O superóxido reage rapidamente com o NO, produzindo o oxidante peroxinitrito e reduzindo a bioatividade do NO (Gryglewski et al., 1986). O aumento

na produção de superóxido promove um grande déficit de NO em vasos diabéticos. Em adição à ação “scavenger” de NO, o superóxido pode alterar a atividade e regulação da NO sintetase em células endoteliais (Figura 5) (Peterson et al., 1999) e, além de outras ações potencialmente proaterogênicas como proliferação das células do músculo liso, recrutamento de células inflamatórias e expressão gênica redox-sensível (Wolin, 2000). A redução na sinalização de NO mediada por RL, pode ser acompanhada na diabetes pela redução na síntese de prostaciclina (Sobrevia & Mann, 1997; Ono et al., 1988) acoplada a um aumento na formação de agentes vasoconstritores (Dai et al., 14993; Tesfamariam, 1993). Potenciais fontes de produção de superóxido vascular incluem NAD(P)H- dependente oxidases (Rajagopalan et al., 1996) , xantina oxidase, lipoxigenase, oxidases mitocondriais e NO sintetases (Vasquez-Vivar et al., 1998).



**Figura 5:** Formação de superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) mitocondrial e suas conseqüências. SOD: superóxido dismutase; ONOO<sup>-</sup>: ânion peroxinitrito; ADMA: dimetil arginina assimétrica;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio; NOS<sup>e</sup>: óxido nítrico sintetase endotelial; GSS: guanilato ciclastase solúvel

Para controlar a produção de RL, as células aeróbicas têm desenvolvido seu próprio sistema de defesa, o sistema antioxidante que inclui componentes enzimáticos e não-enzimáticos. Este sistema consiste de antioxidantes de baixo peso molecular como a glutathiona (GSH) e várias enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Diplock, 1994). Existem várias evidências que sugerem que as defesas antioxidantes estão diminuídas na diabetes. Estes estudos incluem status antioxidante total no plasma / soro reduzido ou atividade “scavenger” por RL e oxidisabilidade plasmática na diabetes tipo II, associados à

demonstração de níveis reduzidos de específicos antioxidantes como ácido ascórbico e vitamina E e das enzimas antioxidantes como CAT, SOD e GPx (Ceriello et al., 1998; Mohan & Das, 1997; Jennings et al., 1987; Karpen et al., 1985). No entanto, os níveis de alguns marcadores de estresse oxidativo, tais como lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (Hayden & Reaven, 2000) e isoprostanos urinários (Devaraj et al., 2001), parecem estar aumentados com a diabetes. A inibição do estresse oxidativo, portanto, através da liberação de vários antioxidantes tem mostrado sucesso em bloquear complicações microvasculares da diabetes em vários modelos animais (Nascimento et al., 2003; Kowluru et al., 2001; Lal et al., 2000; Cameron & Cotter, 1995; Nagamatsu et al., 1995; Cameron et al., 1994).

### **1.5. Inositóis – Mediadores Putativos da Insulina**

Estudando o mecanismo de sinalização da insulina, Larner e colaboradores identificaram uma única classe de inositolglicanos, os quais surgem das espécies de inositolglicanos da membrana celular, tanto da região fosfolipídica, como da proteinada. Estes ativam a fosfatase piruvato desidrogenase (PDH), fosfatase 2C (PP2C), e PP1 (Larner, 2001; Huang et al., 1999). Dessa forma, estes compostos simulam algumas das ações metabólicas da insulina no que diz respeito a disponibilizar glicose. A via de sinalização ocorre em adição a via clássica da tirosina quinase, fazendo um “bypass” a partir do receptor da insulina, ativando, porém, IRS2 via fosforilação da tirosina por uma tirosina quinase intracelular (Müller et al., 1998). Por este mecanismo de ação hormonal, a insulina regula a clivagem de um glicopeptídeo ou precursor proteinado para gerar diacilglicerol e inositolglicano que seriam putativos segundos mensageiros.

O mioinositol, além de ser uma forma de inositol é um isômero cíclico de D-glicose. Esta substância está largamente disponível no organismo, tanto como substância formada como substância componente de fosfolipídios. O mioinositol é um álcool circular extremamente estável e é adquirido pelo organismo via alimentação (1g), como inositol livre, associado a fosfolipídios ou como ácido fítico; e via

biossíntese renal (2g) diária. É reabsorvido nos túbulos renais, mantendo sua concentração sanguínea (Sarashina et al., 2004; Clements, 1982). O D-quirositol é um inositol produzido pela epimerização da hidroxila #3 de mioinositol, tem sido mais encontrado em plantas e insetos, outro exemplo de inositol, o pinitol (3-O-metil D-quirositol), é um composto mais abundante em plantas, especialmente o pinheiro (Anderson, 1953).

Estudos iniciais identificaram a presença de pequena concentração de quirositol em tecidos de humanos e animais, incluindo tecido de granulação de ratos (Williamson et al., 1986), placenta humana, urina humana e plasma urêmico (Niwa et al., 1983), na presença de uma grande quantidade de mioinositol. Outro estudo identificou quirositol associado ao mioinositol no fígado de ratos e em células H35 de hepatoma, sem no entanto, determinar a configuração absoluta de quirositol (Mato et al., 1987).

Dois fosfolípidos de inositol (FGI), mediadores putativos da ação da insulina, oriundos de células do fígado de rato, foram purificados e quimicamente analisados (Larner et al., 1988). O primeiro, o qual ativa a fosfatase piruvato desidrogenase (PDH), contendo D-quirositol e galactosamina, e o segundo, o qual inibe a quinase dependente de AMPc e a adenilil ciclase, contendo mioinositol e glucosamina. Este estudo demonstrou definitivamente pela primeira vez a presença de D-quirositol em uma molécula de FGI sem estar associado ao mioinositol.

O FGI contendo D-quirositol e galactosamina tem um papel primário na ativação de PDH e glicogênio sintase, enzimas intracelulares limitantes do metabolismo oxidativo e não-oxidativo da glicose. Este inositolglicano cuja estrutura completa e síntese química já são conhecidas (Larner et al., 2003), produz respostas *in vivo* insulina-símile, isto é, diminui rapidamente níveis elevados de glicemia, alcançando valores considerados normais, quando administrados por via endovenosa a ratos diabéticos, sem induzir hipoglicemia (Larner et al., 2003; Fonteles et al., 1996; Huang et al., 1993). Fonteles e colaboradores (2000), avaliando o efeito

hipoglicemiante do D-quirositol e do pinitol, demonstraram ainda que a hipoglicemia induzida é potenciada pela associação à infusão de manganês. A concentração de insulina destes animais não foi alterada significativamente. Além disso, os inositóis aumentam a gliconeogênese em diafragmas de ratos normais após a injeção intraperitoneal e com relação a este efeito o mediador utilizado contendo D-quirositol foi 50 a 100 vezes mais potente que o mediador contendo mioinositol (Huang et al., 1993).

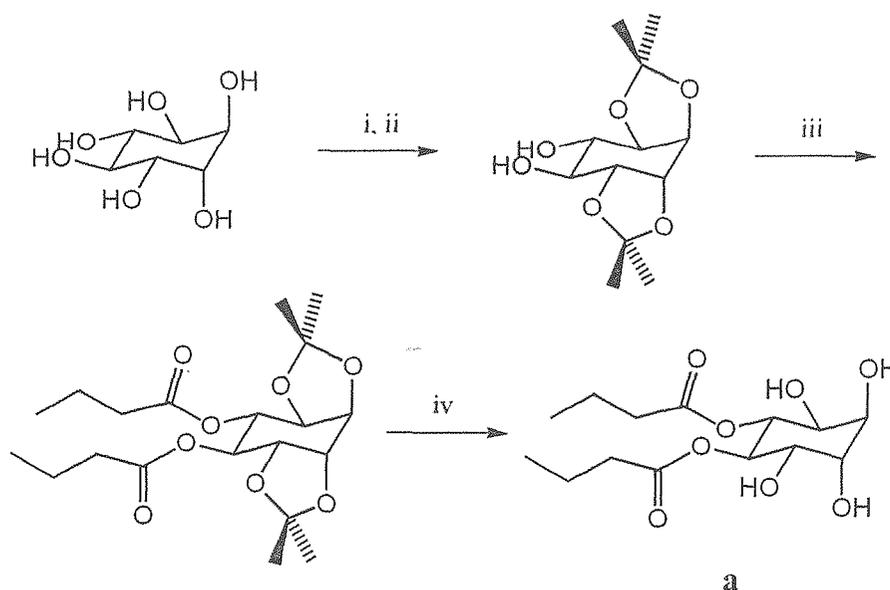
Com o intuito de ter acesso à significância fisiológica dos inositóis, as concentrações de quirositol e mioinositol foram medidas na urina e em tecidos de pacientes diabéticos, e estas amostras foram comparadas a controles. Na urina humana (Kennington et al., 1990), urina de macacos (Ortmeyer et al., 1993), urina de ratos diabéticos tipo II geneticamente modificados (Goto-Kakizaki - G/K) (Suzuki et al., 1991), músculo, fígado e rim de ratos G/K (Sun et al., 2002) e músculo de humanos diabéticos tipo II (Asplin et al., 1993) foi demonstrado que o conteúdo de quirositol estava diminuído, enquanto que o de mioinositol estava aumentado. A diminuição de quirositol na urina de humanos (Suzuki et al., 1994) e macacos (Ortmeyer et al., 1993) foi irreversivelmente correlacionada ao grau de resistência insulínica. Tanto a sensibilidade à insulina, como a taxa de desaparecimento de glicose, ativação da glicogênio sintase e inativação da fosforilase do músculo esquelético e tecido adiposo correlacionaram-se com a excreção urinária de D-quirositol (Ortmeyer et al., 1993). A taxa de excreção urinária de D-quirositol se relaciona de maneira linear à diminuição da sensibilidade à insulina. Correlações similares foram obtidas em pacientes humanos com intolerância à glicose e pacientes com diabetes tipo II quando comparados a controles (Suzuki et al., 1994). Taxas alteradas da excreção urinária de mioinositol e D-quirositol têm sido propostas como um índice mais sensível de resistência insulínica e intolerância à glicose em pacientes humanos (Sarashima et al., 2004; Larner, 2002; Larner e Craig, 1996).

Na tentativa de corrigir o balanço destes inositóis, estudos demonstram que a administração de D-quirositol a ratos (Ortmeyer et al., 1993b), macacos (Ortmeyer

et al., 1995) e humanos (Larner, 2002; Larner et al., 1998) diabéticos do tipo II por estreptozotocina, diminuiu efetivamente a hiperglicemia, hipertrigliceridemia e aumentou a disponibilidade de glicose. D-qui-ro-inositol foi também efetivo na síndrome do ovário policístico em humanos, onde a resistência insulínica é um fator predisponente, restaurando a ovulação e o balanço metabólico (Nestler et al., 1999).

Experimentos realizados em nosso laboratório em modelos animais diabéticos, demonstram uma ação benéfica dos inositolis (D-qui-ro-inositol e 3-O-metil-D-qui-ro-inositol) na prevenção e reversão da disfunção endotelial. Tem-se postulado ainda a atuação dos inositolis como antioxidantes, onde eles poderiam agir como quelantes de metais de transição como o  $\text{Fe}^{2+}$  (Hosoda et al., 2000; Ramakrishnan et al., 1999; Phillipy e Graf, 1997) ou poderiam ser oxidados via oxidases dependentes de nucleotídeos a inososes e assim atuarem com antioxidantes (Larner et al., 1956).

Em virtude da curta meia vida do DCI, o grupo do professor Joseph Larner sintetizou o 3,4-dibutiril-D-qui-roinositol (db-DCI) no intuito de aumentar sua retenção devido a sua alta lipossolubilidade. O 3,4-dibutiril-D-qui-roinositol foi preparado a partir do D-qui-ro-inositol obtido do Allomed, Inc. Glen Allen, VA., em quatro passos (figura 6).



**Figura 6:** Síntese do 3,4 –dibutiril-D-qui-roinositol (a)  
 i. DMP, pTsOH, DMF, 60 C; ii. 80 % AcOH, H<sub>2</sub>O, 50 C;  
 iii. butyric acid, DMAP, EDCI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; iv. 70% AcOH, H<sub>2</sub>O, reflux

A formação da tri-acetonida foi seguida por desproteção seletiva de trans-acetonida e D-quirositol 1,2; 5,6-di-acetonida disponível em 73% do conteúdo total. A acilação foi realizada com ácido butírico, 1-etil-3-(3'- dimetilaminopropil) carbonida (EDCI), e dimetilaminopiridina catalítica (DMAP) em 48% do conteúdo. As acetonidas foram então removidas em AcOH/H<sub>2</sub>O(12/5, refluxo, 30min) para disponibilizar 3,4-dibutiril-D-quirositol puro em 95% do conteúdo depois da recristalização de EtOAC aquecido.

Este trabalho de dissertação apresenta os efeitos deste composto, o 3,4-dibutiril-D-quirositol, um composto mais lipossolúvel que o D-quirositol, na prevenção e reversão de complicações vasculares provenientes da diabetes. Assim como, objetiva investigar os possíveis mecanismos associados ao desenvolvimento destes efeitos.

# Objetivos

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

- Determinar a eficácia do 3,4 dibutiril d-qui-ro-inositol (db-DCI) em prevenir, diariamente, e reverter complicações micro e macrovasculares da diabetes e explorar o mecanismo de ação como um antioxidante, na prevenção do desenvolvimento da doença vascular, comparando com o mioinositol (mio-INS), o precursor dos inositóis endógeno.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração oral crônica *in vivo* de db-DCI e mio-INS a ratos diabéticos por aloxana no perfil glicêmico e lipídico; na pressão arterial média e na variação de peso corpóreo;
- Avaliar o efeito da administração oral crônica *in vivo* de db-DCI e mio-INS a ratos diabéticos por aloxana na disfunção endotelial de anéis de aorta e do leito arteriolar mesentérico;
- Investigar se a incubação *in vitro* por 1 hora de db-DCI e mio-INS em anéis de aorta de ratos e coelhos diabéticos, no leito arteriolar mesentérico de ratos diabéticos e no leito arteriolar renal de coelhos diabéticos;
- Avaliar o efeito da incubação de db-DCI e mio-INS no incremento do tônus induzido por L-NAME;
- Investigar o efeito da incubação *in vitro* dos inositóis testados na vasodilatação produzida por NO e comparar seus efeitos aos da SOD;
- Testar a hipótese de que os inositóis atuam como antioxidantes na redução de ânion superóxido *in vitro* e mitocondrial;

- Investigar a ação do tratamento crônico *in vivo* com os inositóis testados na formação de produtos de nitrosotiois e nitrotirosina, produtos finais da sinalização do NO em anéis de aorta por meio de análise imunohistoquímica

## *Material e Métodos*

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Biomedicina (IBIMED) e mantidos sob ciclo de claro-escuro de 12 horas com livre acesso à ração (Purina Rat Chow®) e água. Todos os experimentos seguiram as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório e estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação animal. Foram utilizados nos protocolos experimentais os seguintes grupos:

1. Ratos Diabéticos: Ratos Wistar machos com menos de 1 ano, pesando entre 250 – 300g que receberam, para a indução de diabetes, por via endovenosa (veia peniana), aloxana (45mg/kg) de acordo com Sannomiya e colaboradores (1997). Após a injeção os animais foram colocados em caixas apropriadas (4 animais por caixa), tendo livre acesso à ração padrão e com sacarose 10% acrescida à água de beber por 48 horas. No terceiro dia após a indução os animais foram colocados em jejum por 12 horas e no dia seguinte uma amostra de 2mL de sangue foi coletada do plexo infraorbital e a glicemia e o perfil lipídico determinados. Os animais com glicemia igual ou superior a 200mg/dL (11mM) foram incluídos no estudo. As respostas vasculares foram comparadas com animais de mesma idade e sexo, os quais sofreram injeção de salina na veia peniana e após 96 horas foram diagnosticados pelas amostra de sangue coletadas do plexo infraorbital, como euglicêmicos (< 100mg/dL).

2. Coelhos da raça Nova Zelândia, pesando de 2,0 – 2,5Kg, normais e diabéticos por injeção de aloxana (150mg/Kg), administrada por via intraperitoneal, foram utilizados neste estudo para coleta da aorta e rins.

### 3.2. Drogas e substâncias químicas

Acetilcolina e nitroprussiato sódico foram adquiridos do Merck (New Jersey, NJ, USA) e diluídos em solução de Krebs Henseleit (KHS - composição p/ 1L: 6,7g de NaCl, 0,37g de KCl, 0,17g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 0,144g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,1g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,31g de  $\text{CaCl}_2$  e 0,65g de glicose) diariamente quando necessário. A acetilcolina foi diluída em ácido acético a 0,01N, e o nitroprussiato de sódio, foi diluído em salina e protegido da luz com uso de frasco âmbar envoltos em papel alumínio. Os fármacos utilizados foram mantidos em isopor com gelo e o volume residual era descartado ao fim do experimento. Nitrato de sódio foi obtido da *Sigma/Aldrich Chemical Corporation* (Saint Louis, MO, USA) e diluído, no momento de uso, em KHS com pH ajustado para 2,0. A Indometacina, adquirida da *Sigma Chemical* (St. Louis, MI, USA), suspensa em solução de bicarbonato a 3% e diluída em KHS, foi estocada a  $-4^\circ$ . As enzimas, superóxido dismutase (SOD) e xantina oxidase (XO), e a aloxana foram também obtidas da *Sigma/Aldrich Chemical Corporation* (Saint Louis, MI, USA) e diluídas apenas no dia de uso, mantidas em isopor com gelo e usadas em menos de 1 hora após a diluição. O mesmo procedimento, em relação à estocagem e uso foi adotado para as demais drogas.

Os inositóis utilizados, 3,4-dibutiril d-chiro-inositol (db-DCI) e mioinositol (mio-INS), foram fornecidos pelo Dr. Joseph Larner do Allomed corporation (Gleen Allen, VA, USA) e diluídos em KHS para fazer soluções de 20mg/ml em um volume suficiente para apenas um dia. Todos os sais utilizados foram obtidos do Reagen e Grupo Química (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

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

### 3.3. Protocolos experimentais

#### 3.3.1. Grupos Experimentais

O relaxamento dependente do endotélio, induzido por acetilcolina, e o relaxamento independente do endotélio, induzido por nitroprussiato de sódio, foram comparados em tecidos obtidos de animais diabéticos por aloxana *versus* animais euglicêmicos, após tratamento agudo ou crônico com as drogas testadas. Os grupos utilizados para este protocolo foram:

- Ratos diabéticos, tratados com db-DCI (20mg/kg/12h; v.o.) durante 4 semanas, dos quais foram estudados o leito arteriolar mesentérico (LAM) e anéis de aorta (AA)
- Ratos diabéticos, tratados com mio-INS (20mg/kg/12h; v.o.) durante 4 semanas, dos quais foram estudados o LAM e anéis de aorta;
- Ratos diabéticos, tratados com salina durante 4 semanas, dos quais foram estudados o LAM e anéis de aorta;
- Ratos diabéticos, dos quais foram estudados o LAM e anéis de aorta para avaliação do potencial curativo do db-DCI, em testes *in vitro*.
- Ratos diabéticos, dos quais foram estudados o LAM e anéis de aorta para avaliação do potencial curativo do mio-INS, em testes *in vitro*.
- Ratos euglicêmicos dos quais foram estudados o LAM e anéis de aorta;
- Coelhos diabéticos, dos quais o leito arteriolar renal (LAR) e anéis de aorta foram tratados com db-DCI ou mio-INS, em testes *in vitro*, para avaliação do potencial curativo;

- Coelhos euglicêmicos dos quais o LAR e anéis de aorta foram estudados em testes *in vitro*.

Nos experimentos de avaliação do potencial antioxidante foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- Ratos diabéticos, dos quais foram estudados anéis de aorta tratados agudamente com db-DCI (1, 3 e 10 $\mu$ M / *in vitro*)
- Ratos diabéticos, dos quais foram estudados anéis de aorta tratados agudamente com mio-INS (1, 3 e 10 $\mu$ M / *in vitro*)

### 3.3.2. Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos

Amostras de sangue venoso foram obtidas por punção do plexo infraorbital e mantidos em tubos de coleta (Vacuette, São Paulo, SP, Brasil) para soro (determinação do perfil lipídico) ou plasma (análise de glicose). Durante a realização da coleta os animais permaneceram sob anestesia etérea.

As coletas foram feitas antes da injeção intravenosa de aloxana, ou salina no dia zero, 96 horas depois da indução e após o tratamento de quatro semanas com db-DCI, mio-INS ou salina.

O soro foi obtido depois da centrifugação a 3000 rpm g por 5min a temperatura ambiente. A concentração plasmática de triglicérides e colesterol total foi determinada por métodos padrão enzimáticos com auxílio de kits comerciais (BIOTÉCNICA, São Paulo, Brasil) com leitura semi-automática através do aparelho LABQUEST (Labtest, Lagoa Santa, MG – Brasil). O nível HDL-colesterol foi determinado por mensuração de colesterol no supernadante líquido depois da precipitação do plasma com MgCl<sub>2</sub> e dextran sulfato (BIOTÉCNICA, São Paulo,

Brasil) e a concentração de LDL-colesterol foi calculada usando a equação de Friedewald –  $LDL = CT / (HDL + VLDL)$  (Friedewald et al., 1972).

### 3.3.3. Medida da pressão sanguínea

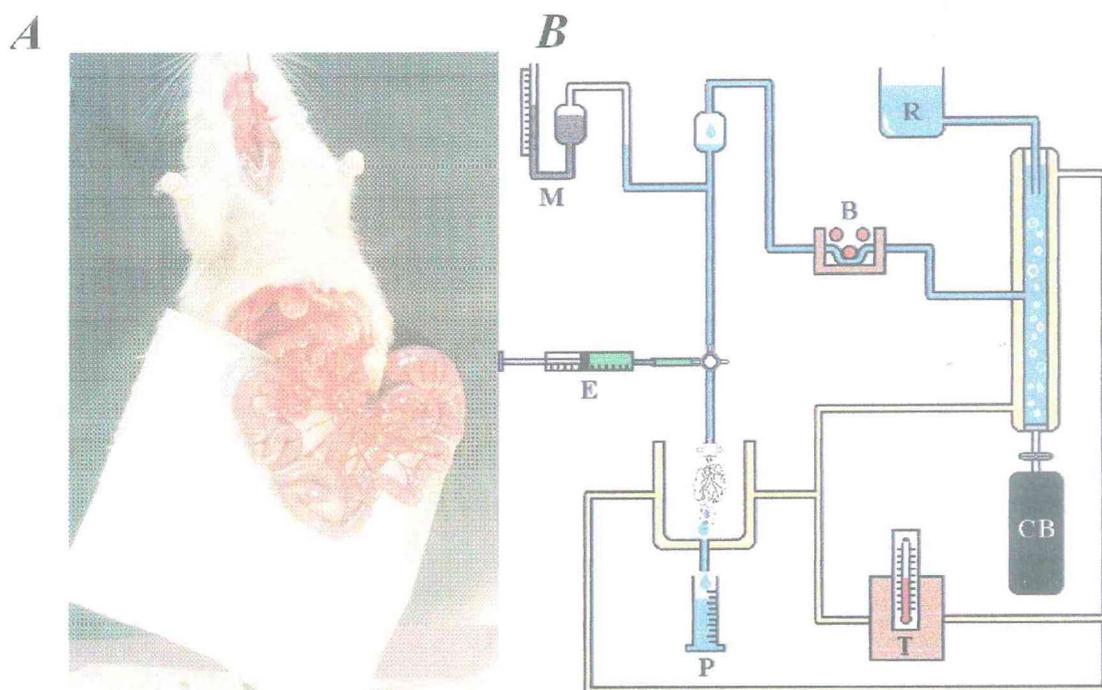
Os ratos foram anestesiados com pentobarbital (50mg/kg), a artéria carótida direita foi isolada, canulada e a pressão sanguínea foi medida diretamente através de um transdutor de pressão (P23 Gould Statham, Oxnard, CA, USA) conectado a um polígrafo (Narco Biosystems, Houston, Texas, USA). A pressão arterial foi medida depois de um período de 30 minutos de equilíbrio

### 3.3.4. Estudo das drogas na reatividade vascular

#### 3.3.4.1. Leito Arteriolar Mesentérico

Após realizada anestesia com pentobarbital, foi feita uma incisão no abdômem do rato, a artéria mesentérica superior foi isolada e canulada com um catéter de polietileno (PE40) em sua bifurcação com a aorta abdominal. O mesentério foi cuidadosamente removido por cortes bem próximos à borda intestinal, com o auxílio de uma pequena tesoura, em seguida foram amarrados os ramos da artéria mesentérica superior: pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico; e o leito vascular foi retirado (Figura 7A). Logo após, o leito vascular foi rapidamente perfundido com KHS (aquecida a 37°C oxigenada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) em um sistema aberto (Figura 7B) com um fluxo constante de 4ml/min mantido por uma bomba peristáltica, e as alterações na pressão de perfusão foram continuamente registradas em um polígrafo de quatro canais (Narco Biosystems, Houston, Texas, USA) por meio de um transdutor de pressão (P23 Gould Statham, Oxnard, CA, USA). Depois de um período de equilíbrio de 30 minutos, fenilefrina (1 a 5µM) foi infundida por meio de uma bomba de infusão a uma velocidade constante (0,1ml/min) com o intuito de alcançar uma pressão de perfusão estável (100 – 120mmHg). Curvas de concentração x

resposta desenvolvidas por vasodilatadores, isto é, acetilcolina (Ach;  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M), nitroprussiato sódico (SNP;  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M) ou nitrato de sódio pH 2,0 (NO;  $10^{-6}$  a  $3 \times 10^{-4}$   $\mu$ M). As drogas foram injetadas em bolus de 50  $\mu$ l, que não demonstram previamente alteração na pressão de perfusão, através de um acesso ao lado do sistema, logo acima da cânula da artéria mesentérica. Todos os experimentos foram desenvolvidos na presença de indometacina ( $10^{-5}$  M), na solução de perfusão com o intuito de evitar a interferência de produtos da cicloxigenase.

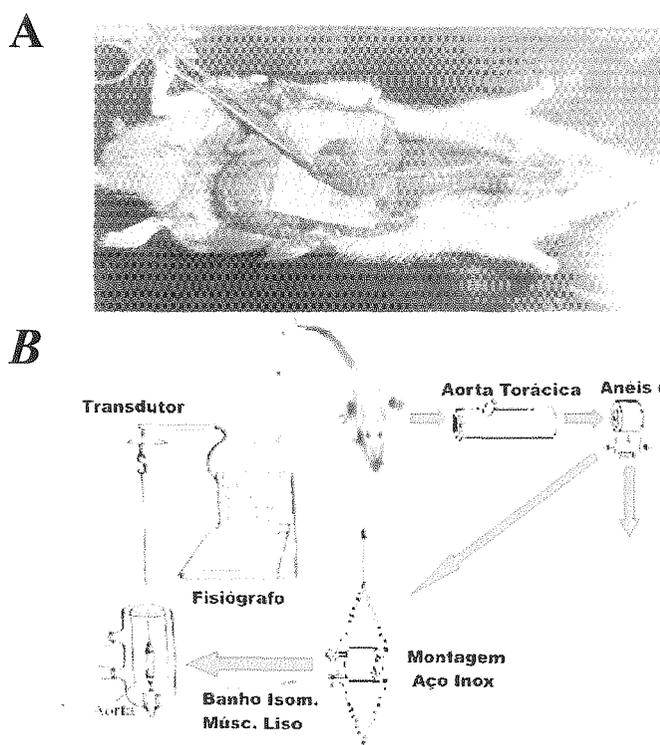


**Figura 7:** Em (A) leito vascular mesentérico de rato; (B) sistema de perfusão aberto: M-manômetro; B-bomba de perfusão; R-reservatório para solução perfusora; CB-mistura carbogênica; T-termostato; P-solução perfundida; E-injeção de drogas

### 3.3.4.2. Anéis de aorta

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a aorta tóraca foi rapidamente excisada (Figura 8A). Segmentos de 5 mm foram montados horizontalmente em banhos de 5 mL de capacidade em solução de Krebs-Henseleit (Figura 8B). Os registros das alterações de tensão foram obtidos por intermédio de um transdutor de força acoplado a um polígrafo. Após um período de equilíbrio de 1 hora

com lavagens a cada 15 minutos o anel vascular foi contraído com fenilefrina (FEN). No platô da contração (correspondente a aproximadamente 60% da resposta máxima) induzida pela FEN foi construída uma curva concentração resposta à acetilcolina ( $10^{-12}$  a  $10^{-5}$ M). A curva de relaxamento, que depende do endotélio, foi comparada em tecidos obtidos de ratos euglicêmicos e de ratos diabéticos por aloxana tratados durante 1 mês com db-DCI ou mio-INS ou salina. Nos experimentos *in vitro*, onde se utilizou anéis de aorta de coelhos e ratos diabéticos por aloxana, o db-DCI ou o mio-INS foram adicionados ao banho por 1 hora antes da realização de uma segunda curva de acetilcolina, foi feita a comparação entre a curva inicial, na ausência da droga testada, e a segunda curva de acetilcolina. As respostas obtidas com este protocolo foram comparadas com as de anéis de aorta obtidos de animais euglicêmicos. Todos os experimentos foram realizados na presença de indometacina no banho.



**Figura 8:** Em (A) isolamento da aorta torácica; em (B) montagem dos anéis de aorta de ratos ou coelhos no sistema de registro isométrico

Em um segundo conjunto de experimentos com anéis de aorta, a resposta potenciadora de tônus induzida por L-NAME ( $100\mu\text{M}$ ) aplicado no platô da resposta

vasoconstritora submáxima da fenilefrina ( $0,1\mu\text{M}$ ), foi avaliada em anéis de aorta de animais diabéticos tratados durante 1 mês com db-DCI, ou mio-INS, ou salina. Neste mesmo conjunto de experimentos, a resposta potenciadora da SOD-I no relaxamento induzido por NO (nitrato de sódio  $10^{-2}$ ; NO -  $1\mu\text{M}$ ) foi comparada com a resposta dos inositóis db-DCI e mio-INS ( $1,3$  e  $10\mu\text{M}$ ). Tanto a SOD-I como os inositóis eram adicionados no platô da contração de fenilefrina e 3 minutos depois era adicionado ao banho  $1\mu\text{M}$  de nitrato de sódio, e então observada a potenciação induzida no relaxamento.

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

Coelhos Califórnia foram anestesiados com pentobarbital sódico ( $50\text{ mg/Kg}$ ; i.m) e uretana ( $1,2\text{ g/Kg}$ ; i.p) e traqueostomizados para ventilação artificial utilizando-se bomba Palmer (Palmer Instruments, London, UK). A seguir, após incisão na linha alba, a cavidade abdominal foi exposta e o rim esquerdo removido após canulação da artéria renal. Imediatamente foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit com pH ajustado para 7,4 e oxigenado com mistura carbogênica ( $95\% \text{O}_2$  e  $5\% \text{CO}_2$ ) num fluxo constante de  $4\text{ mL/min}$  usando uma bomba peristáltica Watson-Marlow (Falmouth, Cornwall, England) (Figura 9).

A pressão de perfusão foi constantemente monitorada por intermédio de um transdutor de pressão acoplado a um polígrafo (Narco Biosystems, Houston, TX, USA) acoplado ao sistema de perfusão. Após um período de 30 min de estabilização foi adicionada fenilefrina ( $1$  a  $5\mu\text{M}$ ), por meio de uma bomba de infusão a uma velocidade constante ( $0,1\text{ml/min}$ ) com o intuito de alcançar uma pressão de perfusão estável ( $100 - 120\text{mmHg}$ ). Curvas dose-resposta dos vasodilatadores, i.e., acetilcolina (Ach;  $10^{-9}$  a  $10^{-3}\text{ M}$ ) e nitroprussiato de sódio (SNP;  $10^{-9}$  a  $10^{-3}\text{ M}$ ) foram injetadas em bolus em volumes ( $50\mu\text{l}$ ) que não afetavam a pressão de perfusão.

Nestes experimentos apenas a atividade direta dos compostos foi avaliada. Após as primeiras curvas de Ach ou nitroprussiato de sódio (SNP), o leito renal foi

perfundido por 30 min com a mesma solução adicionada das drogas a serem testadas, i.e., db-DCI e mio-INS, em experimentos separados. Todos os experimentos foram realizados com solução nutritora contendo indometacina para evitar a participação de prostanóides.

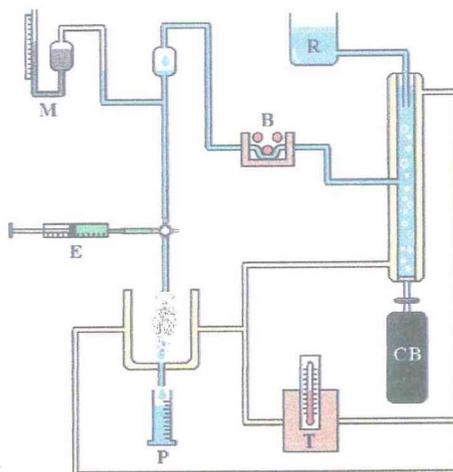


Figura 9: Sistema de perfusão aberto de rim de coelho

### 3.3.5. Avaliação do potencial antioxidante dos inositóis

#### 3.3.5.1. Teste da redução de Azul de Nitrotetrazólico (NBT)

A detecção da redução de azul de nitrotetrazólico (NBT-do inglês *nitroblue tetrazolium*) foi realizada segundo o método descrito por Hartog e colaboradores (2003). O princípio do método relata que o NBT pode ser reduzido pelo  $O_2^-$  através de reações de transferência de 1 elétron. A redução do NBT a diformazan é processada em dois passos, gerando um intermediário estável parcialmente reduzido, monoformazan ( $NBT^+$ ). A formação deste intermediário pode ser monitorada espectrofotometricamente utilizando-se filtro de 550 a 560nm:  $E_m = 1,5 \times 10^4 [mol/L]^{-1} \times cm^{-1}$  (Tarpey e Fridovich, 2001). Os radicais superóxido foram gerados pela reação de xantina (1mM) e xantina oxidase (10mU/mL) em uma solução de tampão fosfato (pH 7,8 a 25°C). Os radicais  $O_2^-$  foram detectados pela reação com o sal de tetrazólico, azul de nitrotetrazólio (NBT; 50 $\mu$ M). A taxa de redução do NBT foi monitorada

espectrofotometricamente na faixa de 560nm usando um Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England). A enzima SOD-1, reage com  $O_2^-$  diminuindo a taxa de redução de NBT e foi usada como controle positivo. O volume de reação foi fixo em 2mL. Os inositóis, db-DCI e mio-INS, foram adicionados aos tubos de ensaio imediatamente antes da adição dos reagentes nas concentrações de 0,01 a  $1\mu M$  e a SOD-1 nas concentração de 0,03 a 3u/mL.

### **3.3.5.2. Produção de Radicais Livres em células endoteliais**

Células endoteliais de aorta bovina foram cultivadas em um ambiente com nível de glicose normal (5mM) e em outro com alta concentração de glicose (25mM) por 4-6 horas, como previamente descrito por Nishikawa e colaboradores (2000). A formação de radicais livres (RL) foi determinada fluorometricamente usando o marcador CM-H2DCFDDA. As células foram carregadas com  $10\mu M$  de CM-H2DCFDDA, incubadas por 45 min, a  $37^\circ C$ , e, então analisadas em um leitor de fluorescência HTS 7000. A produção de RL foi relatada em nmol/mL em um curva padrão produzida com  $H_2O_2$ . Os inositóis testados, DCI e db-DCI, foram adicionados no tempo zero (Esta análise foi realizada no Hospital Albert Eistein na Faculdade de Nova York, pelo grupo do prof. Brownlee).

### **3.3.5.3. Imunohistoquímica – Identificação de nitrosotióis e nitrotirosina em proteínas**

Anéis de aorta de ratos diabéticos tratados por quatro semanas com salina, mio-INS e db-DCI, e de ratos euglicêmicos foram fixados, embebidos em parafina, seccionados e tratados com anticorpos para nitrosotióis e nitrotirosina como previamente descrito por Gow e colaboradores (1998). As seções coradas foram avaliadas visualmente por observadores independentes e, então, quantificadas (Esta análise foi realizada na Universidade da Pensilvânia –UPEN pelo grupo do prof. Andrew J. Gow).

### 3.4. Análise estatística

Os parâmetros bioquímicos foram analisados através do test t de Student bicaudal pareado e foi considerado significativamente diferente se a probabilidade de ocorrência de hipótese nula for menor que 5%. O relaxamento, tanto nos anéis de aorta, leito vascular mesentérico como no leito arteriolar renal, serão expressos como porcentagem da fase de platô de vasoconstrição induzido por fenilefrina. Os valores de  $PD_{50}$ , significando o log negativo da dose efetiva requerida para produzir metade do efeito máximo, foram calculados utilizando GRAPHPAD PRISM software. A resposta máxima vasorelaxante para agonistas, valores  $PD_{50}$  de agonistas e parâmetros bioquímicos em um grupo ou entre grupos foram comparados por test t de Student pareado e não pareado, respectivamente, com significância de  $p < 0,05$ . A variação das curvas de agonistas foram comparadas por análise fatorial de duas vias ANOVA 5% de significância, seguida do teste de Tukey e Kramer. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

## Resultados

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros bioquímicos (perfil glicêmico e lipídico), pressão arterial média e variação de peso de ratos diabéticos por aloxana tratados com db-DCI, mio-INS ou salina

A diabetes induzida por aloxana (50mg/kg i.v.) foi caracterizada por uma hiperglicemia acompanhada de leve hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (Tabela 2). A glicemia dos animais diabéticos por aloxana tratados durante 4 semanas com salina, mostrou-se bastante acentuada quando comparada a dos animais euglicêmicos tratados com salina por 4 semanas (Diabético –  $392 \pm 31,7$  mg/dL; Euglicêmicos –  $89,6 \pm 9$  mg/dL). O tratamento com db-DCI reduziu significativamente a glicemia (Db + db-DCI –  $248,8 \pm 10,2$  mg/dL versus Db –  $360,9 \pm 15,4$  mg/dL), no entanto o tratamento com mio-INS não reduziu significativamente a glicemia dos animais diabéticos (Diab. + mio-INS –  $355,2 \pm 14,6$  mg/dL; Diab. –  $367,4 \pm 16,3$  mg/dL). Os valores percentuais dessa queda na glicemia após a administração oral dos inositóis foram de  $31,1 \pm 3,7\%$  e  $8,8 \pm 1,4\%$  ( $p < 0,05$ ) para o tratamento com db-DCI e mio-INS respectivamente (Tabela 2).

O nível de triglicerídeos (TG) dos animais diabéticos foi muito elevado quando comparado ao do grupo euglicêmico (Diab. –  $132 \pm 29,7$ ; Eugli. –  $63 \pm 8,3$  mg/dL). No entanto, com relação aos níveis de triglicerídeos, o tratamento de animais diabéticos por aloxana com db-DCI proporcionou uma redução significativa desses níveis (Diab. –  $213 \pm 12,4$ ; Diab.+ db-DCI –  $110,5 \pm 10,4$ ) (Tabela 2). O tratamento com mio-INS também proporcionou queda nos níveis de triglicerídeos dos animais diabéticos (Diab. –  $240,5 \pm 16,1$ ; Diab. + db-DCI –  $94,3 \pm 6,5$ ). O percentual desta queda pronunciada foi de  $60,9 \pm 5,8\%$  e  $48,1 \pm 5,1\%$  ( $p < 0,05$  vs. controle interno; tabela 2) para a administração com db-DCI e mio-INS respectivamente. Nos animais controle, uma moderada diminuição de  $19 \pm 4,7\%$  foi observada. Pode-se constatar que os inositóis atuaram cronicamente para restaurar o balanço metabólico.

O ganho de peso no período de tratamento de quatro semanas nos animais diabéticos foi significativamente menor quando comparado com os animais euglicêmicos (Eugli –  $315,0 \pm 21,0$  vs. Diab –  $231,0 \pm 15,4$ ,  $p < 0,05$ ). Nos animais diabéticos tratados com db-DCI e mio-INS, essa queda no peso médio dos ratos não tratados foi parcialmente revertida (db-DCI -  $207,2 \pm 6,8$  vs. Diab –  $163,8 \pm 6,4$ ; mio-INS –  $273,0 \pm 27,2$  vs.  $214,6 \pm 20,2$ )

A pressão arterial média dos animais diabéticos sofreu um leve incremento quando comparada a dos animais euglicêmicos (eugli –  $91 \pm 4,3$  vs. Diab. –  $125 \pm 8,7$  mmHg,  $p < 0,05$ ). O tratamento com db-DCI e mio-INS não permitiu um incremento significativo da pressão arterial média dos animais tratados (db-DCI –  $108,0 \pm 5,6$ ; mio-INS –  $116,7 \pm 9,0$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídes), pressão arterial média, peso corporal e glicemia de ratos euglicêmicos ou diabéticos por aloxana antes e após 4 semanas de tratamento com db-DCI, mio-INS ou salina.

Grupos (I to III)	n	Peso corporal (g)	PAM (mmHg)	Glicose sérica (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
(I) euglicêmico	7	247±15,6		89,6± 9	77,3± 5,8	63±8,3	28±2,5	12,6±2,5	36,7±8,6
(I) euglicêmico salina	7	315 ± 21*	91 ± 4,3	77,3±6,6	73±12,7	82±12	21±1,9	17±1,6	35±4,6
(II) diabético	12	214 ± 12,3		392±31,7	88,7±7,9	132±29,7	26,4±2	26,5±5,9	35,8±5,0
(II) diabético+ salina	12	231 ± 15,4	125±8,7#	435,2±35,6	79,4±4,3	107±8	20,5±1,7	21,4±2,2	37,5±2,6
(III) diabético	8	214.6±20.2		367.4±16.3 <sup>#</sup>	97.7±4.5	240.5±16.1 <sup>#</sup>	23.2±2.6	31.3±4.1 <sup>#</sup>	43.2±2.6
(III) diabético+mio-INS	8	273.0±27.2	116.7±9.0	335.2±14.6 <sup>#</sup>	79.2±4.6	94.3±6.5*	21.5±2.8	18.9±3.7 <sup>#</sup>	38.8±3.7
(IV) diabético	8	163.8± 6.4		360.9±15.4 <sup>#</sup>	94.1±6.4	213.0±12.4 <sup>#</sup>	17.8±4.3	36.5±4.2 <sup>#</sup>	39.8±3.5
(IV) diabético+db-DCI	8	207.2±6.8	108.0±5.6	248.8±10.2 <sup>*#</sup>	70.9±5.0	110.5±10.4*	26.1±2.5	22.1±4.5 <sup>#</sup>	22.7±2.4

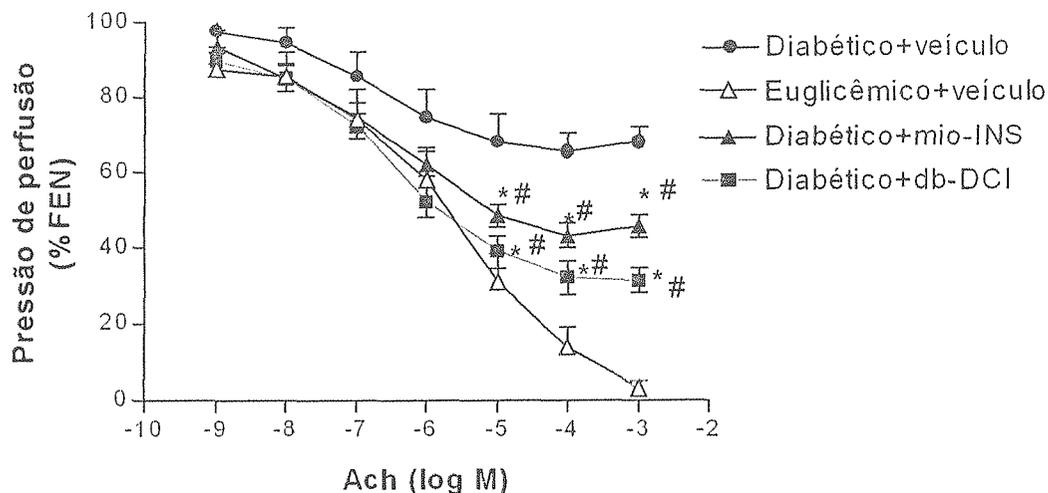
Os dados são expressos como média ± EPM. \* p<0,05, teste t de Student pareado bicaudal, comparado com grupo controle respectivo, i.e., com os valores obtidos antes do início dos respectivos tratamentos. # p<0,05, teste t de Student não-pareado bicaudal, comparado com grupo euglicêmico. & p<0,05, teste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

## 4.2. Avaliação do potencial preventivo da disfunção endotelial

### 4.2.1. Leito vascular mesentérico

O relaxamento endotélio-dependente produzido pela Acetilcolina no leito vascular mesentérico (LVM) foi bastante atenuado em tecidos de ratos diabéticos por aloxana tratados com salina durante 4 semanas, obtendo, portanto, uma resposta máxima ao estímulo vasodilatador de  $32,1 \pm 4,3\%$ . No entanto, a diminuição máxima na pressão de perfusão do LVM de ratos normoglicêmicos tratados com salina por 4 semanas foi de  $96,9 \pm 2,1\%$ .

Tecidos obtidos de ratos diabético tratados por 4 semanas com dibutiril-d-quirositol (db-DCI) e mioinositol (Mio-INS) obtiveram respostas máximas ao estímulo vasodilatador endotélio-dependente de  $68,8 \pm 3,3\%$  e  $54,4 \pm 3,2\%$ , respectivamente (Figura 10). A resposta vasodilatadora ao agonista de ação independente do endotélio, o nitroprussiato de sódio, não apresentou diferença entre os grupos, promovendo um relaxamento de 100% em todos os grupos testados (Tabela 3).



**Figura 10:** Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com 3,4-dibutiril-D-quirositol (db-DCI) (20mg/kg/12h) ou mioinositol (mio-INS) (20mg/kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina no leito arteriolar mesentérico. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Diabético + salina. # $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Euglicêmico + salina.

**Tabela 3.** Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente, acetilcolina (ACh), e endotélio-independente, nitroprussiato de sódio (SNP), no leito arteriolar mesentérico (LAM) de ratos diabéticos por aloxana tratados com salina (1mL/Kg/12h, v.o.), 3,4-dibutiril-D-quirositol (db-DCI) ou mioinositol (mio-INS) (20 mg/Kg/12h v.o.).

Tratamento	Agonista	$R_{max}$	$PD_2$	N
Eugli+veículo	Ach	96,9 $\pm$ 2,7%	5,4 [5,8-5,2]	7
	SNP	100 $\pm$ 0	7.4 [7.9-6.9]	7
Diab+veículo	Ach	32,1 $\pm$ 4,3%	6,7 [7,1-6,3]	12
	SNP	100 $\pm$ 0	6.7 [6.9-6.4]	12
Diab+mio-INS	Ach	54,4 $\pm$ 3,2%	6,5 [6,9-6,1]	8
	SNP	100 $\pm$ 0	7.8 [7.1-8.5]	8
Diab+db-DCI	Ach	68,8 $\pm$ 3,3%	6,6 [7,3-5,9]	8
	SNP	100 $\pm$ 0	7.9 [7.2-8.6]	8

#### 4.2.2 Anéis de aorta de rato

A resposta máxima endotélio-dependente de anéis de aorta de ratos normoglicêmicos foi de  $88,3 \pm 3,5$ , enquanto que tecidos obtidos de ratos diabéticos tratados com salina obtiveram uma resposta máxima de  $43,7 \pm 7,6$ . Anéis de aorta de ratos diabéticos tratados com db-DCI e Mio-INS, durante 4 semanas, obtiveram respostas máximas de  $64,3 \pm 4,9$  e  $38,7 \pm 4,5$ , respectivamente (Figura 11). O relaxamento endotélio-independente, induzido por SNP não apresentou diferença entre os grupos (Tabela 4).

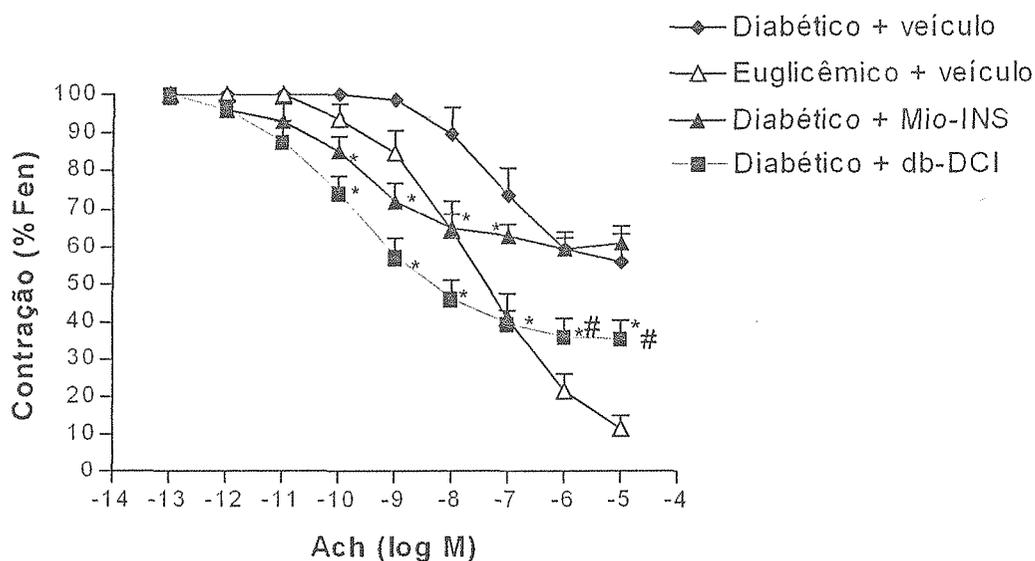


Figura 11: Efeito do tratamento de ratos diabéticos por aloxana com 3,4-dibutiril-D-quirositol (db-DCI) (20mg/kg/12h) ou mioinositol (mio-INS) (20mg/kg/12h) durante 1 mês na resposta endotélio-dependente induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 7 unidades experimentais. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Diabético + salina. # $p < 0,05$ , ANOVA seguida da correção de Tukey-Kramer vs. Euglicêmico + salina.

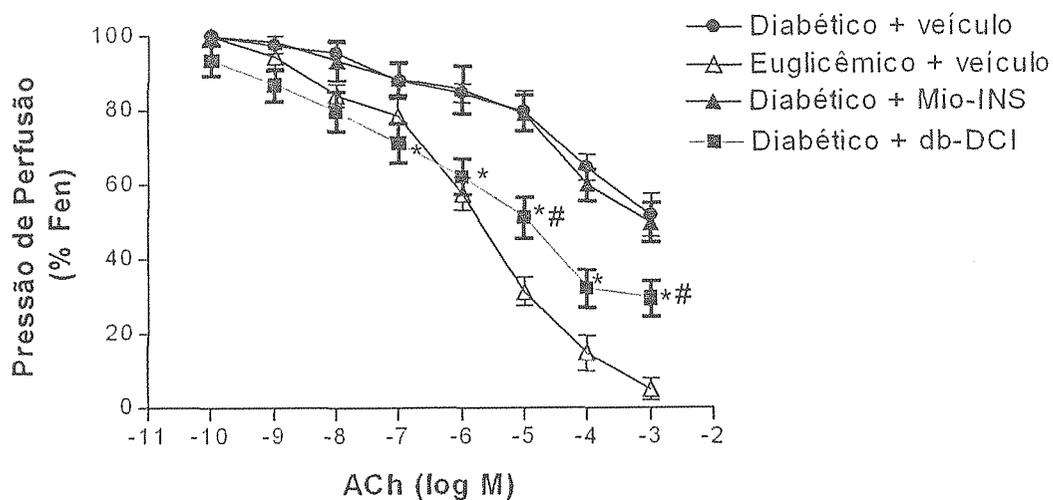
**Tabela 4.** Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente, acetilcolina (Ach), e endotélio-independente, nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de aorta de ratos diabéticos por aloxana tratados com salina (1mL/Kg/12h,v.o.), 3,4-dibutiril-Dquiroinositol (db-DCI) ou mioinositol (mio-INS) (20 mg/Kg/12h v.o.).

Tratamento	Agonista	R <sub>max</sub>	PD <sub>2</sub>	N
Eugli+veículo	Ach	88,3±3,5%	7,5 [7,6-7,4]	7
	SNP	100±0	7.4 [7.9-6.9]	7
Diab+veículo	Ach	43,7±7,6%	7,2 [7,6-6,8]	12
	SNP	100±0	6.7 [6.9-6.4]	12
Diab+mio-INS	Ach	38,7±4,5%	9,6 [9,9-9,4]	8
	SNP	100±0	7.8 [7.1-8.5]	8
Diab+db-DCI	Ach	64,3±4,9%	9,7 [9,7-9,6]	8
	SNP	100±0	7.9 [7.2-8.6]	8

### 4.3. Avaliação do potencial curativo da disfunção endotelial

#### 4.3.1. Leito arteriolar mesentérico

A diminuição máxima na pressão de perfusão induzida pela Ach em tecidos obtidos de ratos euglicêmicos foi de  $95,1 \pm 2,9\%$  comparada a  $48,3 \pm 5,7\%$  nos leitos de animais diabéticos tratados com salina (Figura 12). A incubação por uma hora de  $1\mu\text{M}$  de db-DCI e mio-INS proporcionou uma resposta máxima ao estímulo vasodilatador de  $70,7 \pm 4,6\%$  e  $50,3 \pm 5,6\%$ , respectivamente. A redução na pressão de perfusão induzida pelo vasodilatador endotélio-dependente, SNP, adicionado ao LAM, não se apresentou diferença entre os grupos tratados ou não tratados (Tabela 5).



**Figura 12:** Efeito da incubação de  $1\mu\text{M}$  de inositóis na resposta endotélio-dependente evocada pela acetilcolina (ACh). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de ratos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 7 animais. \* $p < 0.05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de ratos diabéticos e # $p < 0.05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de ratos euglicêmicos

**Tabela 5.** Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente, acetilcolina (ACh), e endotélio-independente, nitroprussiato de sódio (SNP), no leito arteriolar mesentérico (LAM) de ratos diabéticos por aloxana após a incubação de  $1\mu\text{M}$  de 3,4-dibutiril-D-quirositol (db-DCI) ou mioinositol (mio-INS).

Tratamento	Agonista	$R_{\text{max}}$	$\text{PD}_2$	N
Eugli+veículo	ACh	95,1 $\pm$ 2,9%	5,8 [6,3-5,2]	6
	SNP	100 $\pm$ 0	6.4 [6,5-6,3]	6
Diab+veículo	ACh	48,3 $\pm$ 5,7%	4,6 [5,4-3,8]	6
	SNP	100 $\pm$ 0	6,3 [6,8-5,8]	6
Diab+mio-INS	ACh	50,3 $\pm$ 5,6%	4,7 [5,3-4,0]	6
	SNP	100 $\pm$ 0	6,9 [6,3-7,5]	6
Diab+db-DCI	ACh	70,7 $\pm$ 4,6%	5,7 [6,6-4,9]	6
	SNP	100 $\pm$ 0	7,2 [6,8-7,6]	6

### 4.3.2. Leito arteriolar renal

O relaxamento endotélio-dependente produzido pela Acetilcolina no leito arteriolar renal (LAR) foi bastante atenuado em tecidos de coelhos diabéticos por aloxana não tratados, obtendo, portanto, uma resposta máxima ao estímulo vasodilatador de  $22,9 \pm 3,6\%$ . No entanto, a diminuição máxima na pressão de perfusão do LAR de coelhos normoglicêmicos foi de  $63,6 \pm 4,9\%$  (Figura 13). Esses dados confirmam a ocorrência do dano endotelial presente no desenvolvimento da diabetes.

Tecidos obtidos de coelhos diabético tratados com dibutilil -d-quirositol (db-DCI) obtiveram uma resposta máxima ao estímulo vasodilatador endotélio-dependente de  $58,3 \pm 5,9\%$ , enquanto que o tratamento com mio-INS forneceu uma resposta máxima de  $36,7\% \pm 3,1\%$  (Figura 9). A resposta ao SNP não foi diferente entre os grupos (Tabela 6).

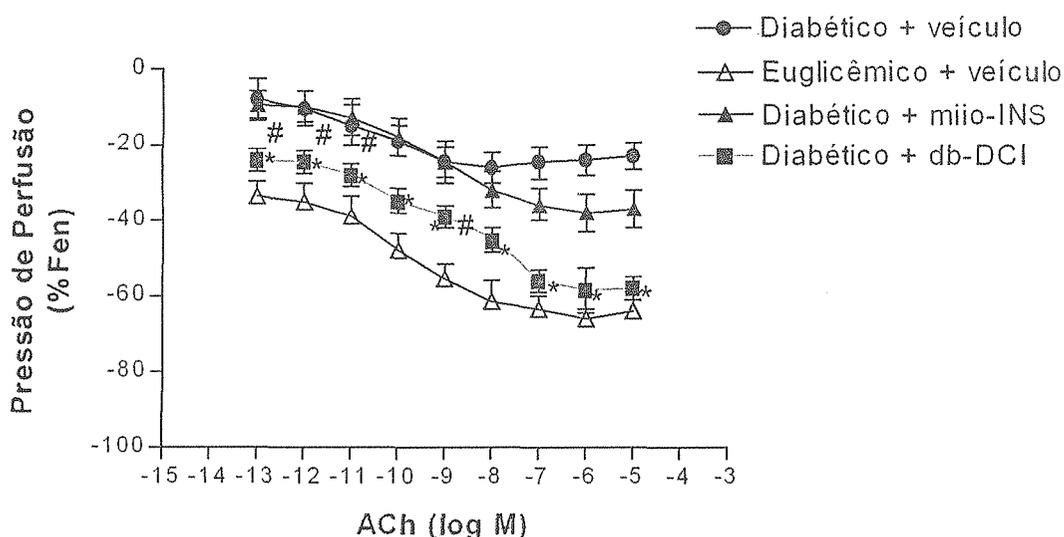


Figura 13: Efeito da incubação de  $1\mu\text{M}$  de inositol na resposta endotélio-dependente evocada pela acetilcolina (ACh). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de coelhos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 7 animais. \* $p < 0,05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de coelhos diabéticos e # $p < 0,05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de coelhos euglicêmicos

**Tabela 6:** Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente, acetilcolina (Ach), e endotélio-independente, nitroprussiato de sódio (SNP) no leito arteriolar renal (LAR) de coelhos diabéticos por aloxana após a incubação de  $1\mu\text{M}$  de 3,4-dibutiril-D-quirositol (db-DCI) ou mioinositol (mio-INS).

Tratamento	Agonista	$R_{\text{max}}$	$PD_2$	n
Eugli+veículo	Ach	63,6±4,9%	9,8 [10,09-9,5]	6
	SNP	100±0	7,3 [7,7-7,0]	6
Diab+veículo	Ach	22,9±3,6%	9,6 [10,1-9,2]	6
	SNP	100±0	6,8 [7,0-6,6]	6
Diab+mio-INS	Ach	36,7±3,1%	9,3 [9,7-9,3]	6
	SNP	100±0	7,1 [7,3-6,9]	6
Diab+db-DCI	Ach	58,3±5,9%	8,7 [9,4-7,9]	6
	SNP	100±0	7,1 [7,4-6,8]	6

### 4.3.3. Anéis de aorta

A resposta máxima vasodilatadora à Ach obtida de anéis de aorta de ratos euglicêmicos foi de  $94,4 \pm 4,6\%$  comparada com  $43,6 \pm 2,5\%$  em anéis de aorta de ratos diabéticos incubados com salina. Após uma hora de incubação com  $1\mu\text{M}$  de mio-INS ou db-DCI, a resposta máxima foi de  $50,4 \pm 3,6\%$  e  $67,4 \pm 5,4\%$ , respectivamente (Figura 14). A resposta dos tecidos ao SNP não diferiu entre os grupos (Tabela 7).

Anéis de aorta de coelhos diabéticos obtiveram resposta máxima à Ach de  $41,3 \pm 2,5\%$  comparada com  $97,9 \pm 1,3\%$  de anéis de coelhos euglicêmicos ( $p < 0,05$ ). A incubação dos anéis de aorta por uma hora com  $1\mu\text{M}$  de inositóis aumentou a resposta endotelial para  $53,3 \pm 5,6\%$  para os tecidos tratados com mio-INS e  $85,4 \pm 4,3\%$  para os tratados com db-DCI (Figura 15). A respostas dos tecidos ao SNP não diferiu entre os grupos (Tabela 8).

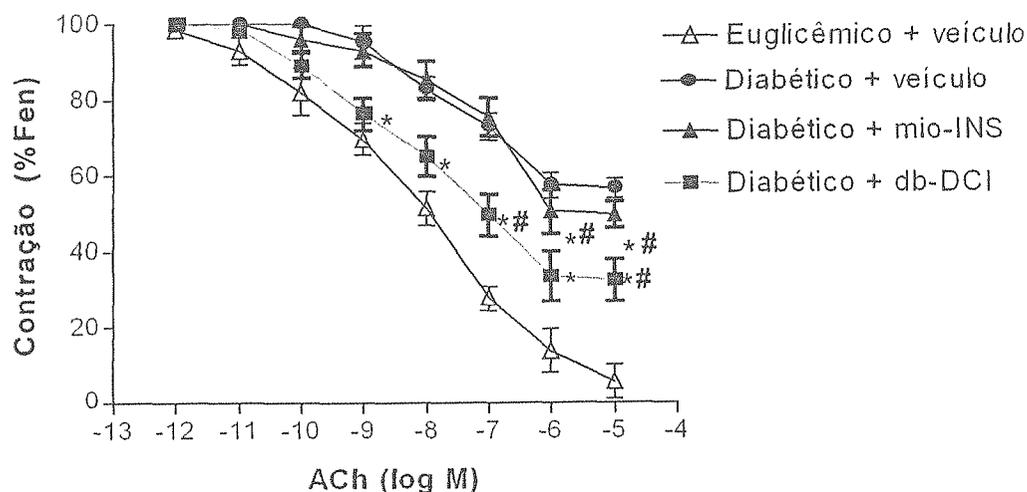
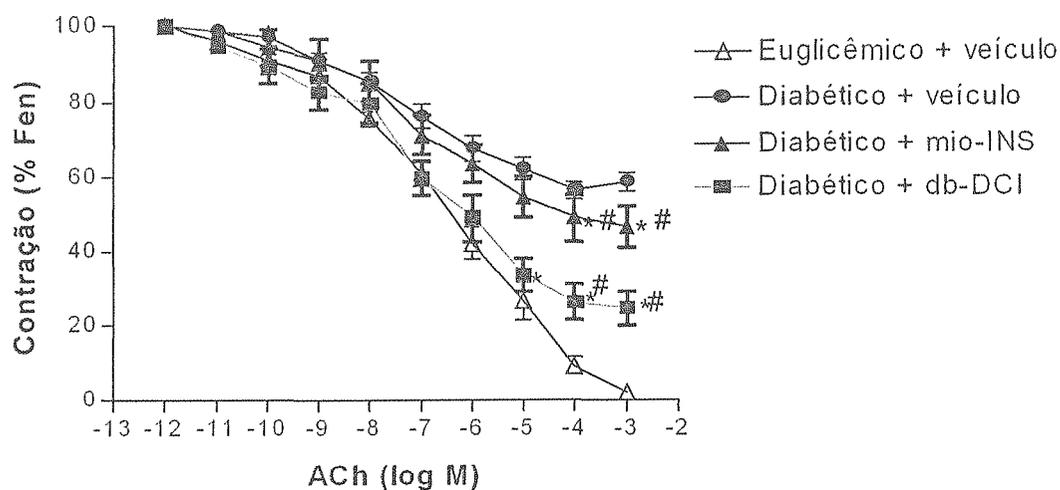


Figura 14: Efeito da incubação de  $1\mu\text{M}$  de inosítois na resposta endotélio-dependente evocada pela acetilcolina (ACh). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de ratos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 7 animais. \* $p < 0,05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de ratos diabéticos e # $p < 0,05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de ratos euglicêmicos

Tabela 7. Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente, acetilcolina (ACh), e endotélio-independente, nitroprussiato de sódio (SNP), em anéis de aorta de ratos diabéticos por aloxana após a incubação de  $1\mu\text{M}$  de db-DCI ou mio-INS

Tratamento	Agonista	$R_{\text{max}}$	$PD_2$	N
Eugli+veículo	Ach	$94,4 \pm 4,6\%$	7,9 [8,2-7,6]	6
	SNP	$100 \pm 0$	8,0 [8,6-7,8]	6
Diab+veículo	Ach	$43,6 \pm 2,5\%$	7,4 [7,9-6,9]	6
	SNP	$100 \pm 0$	7,6 [8,1-7,2]	6
Diab+mio-INS	Ach	$50,4 \pm 3,6\%$	6,9 [7,8-6,1]	6
	SNP	$100 \pm 0$	7,7 [7,2-8,2]	6
Diab+db-DCI	Ach	$67,4 \pm 5,4\%$	8,0 [8,6-7,3]	6
	SNP	$100 \pm 0$	7,2 [6,8-7,6]	6



**Figura 15:** Efeito da incubação de  $1\mu\text{M}$  de inositóis na resposta endotélio-dependente evocada pela acetilcolina (ACh). As respostas foram comparadas com as obtidas de tecidos euglicêmicos ou de coelhos diabéticos tratados isovolumetricamente com veículo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 7 animais. \* $p < 0.05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de coelhos diabéticos e # $p < 0.05$  vs. respostas obtidas de tecidos oriundos de coelhos euglicêmicos

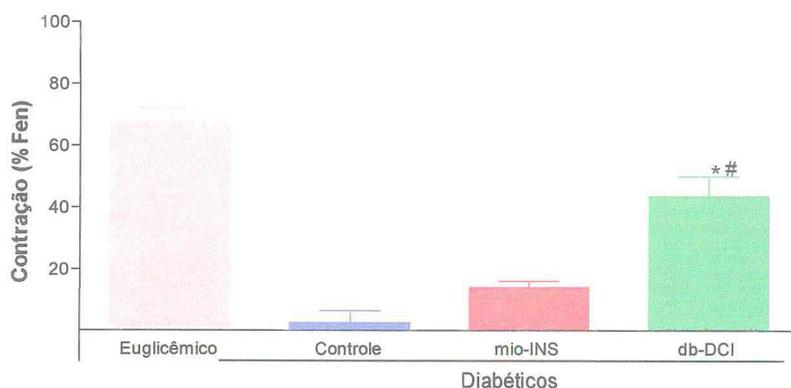
**Tabela 8:** Parâmetros de curvas dose-resposta para o agonista endotélio-dependente, acetilcolina (ACh), e endotélio-independente, nitroprussiato de sódio (SNP), em anéis de aorta de coelhos diabéticos por aloxana após a incubação de  $1\mu\text{M}$  de 3,4-dibutiril-D-quirositol (db-DCI) ou mioinositol (mio-INS).

Tratamento	Agonista	$R_{\text{max}}$	$\text{PD}_2$	N
Eugli+veículo	Ach	$97,9 \pm 1,3\%$	6,0 [6,3-5,8]	7
	SNP	$100 \pm 0$	6,9 [7,2-6,6]	7
Diab+veículo	Ach	$41,3 \pm 2,5\%$	7,2 [7,5-6,8]	12
	SNP	$100 \pm 0$	6,7 [6,9-6,5]	12
Diab+mio-INS	Ach	$53,3 \pm 5,6\%$	6,9 [7,2-6,5]	8
	SNP	$100 \pm 0$	6,6 [6,9-6,3]	8
Diab+db-DCI	Ach	$85,4 \pm 4,3\%$	6,8 [7,3-6,2]	8
	SNP	$100 \pm 0$	6,9 [7,2-6,6]	8

#### 4.4. Avaliação do Potencial Antioxidante dos Inositóis

##### 4.4.1 Efeito na Atividade da Óxido Nítrico Sintetase Endotelial (eNOS)

No intuito de avaliar a atividade basal de eNOS, foi determinado o aumento no tônus induzido pela adição de 100 $\mu$ M de L-NAME em anéis de aorta de ratos diabéticos pre-contraídos com fenilefrina. Como mostra a figura 16, o incremento no tônus induzido por L-NAME nestes animais foi bastante reduzido ( $8,6 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,05$ )) quando comparado a resposta obtida de anéis de ratos euglicêmicos ( $67,3 \pm 4,9\%$  ( $p < 0,05$ )). A incubação com os inositóis testados (1 $\mu$ M, por 1 hora) restaurou este incremento no tônus contrátil induzido por L-NAME nos anéis de aorta de ratos diabéticos, sendo que as respostas máximas pós incubação de mio-INS e db-DCI foram de  $14 \pm 2,7\%$  e  $43,5 \pm 6,4\%$  ( $p < 0,05$ ) respectivamente.

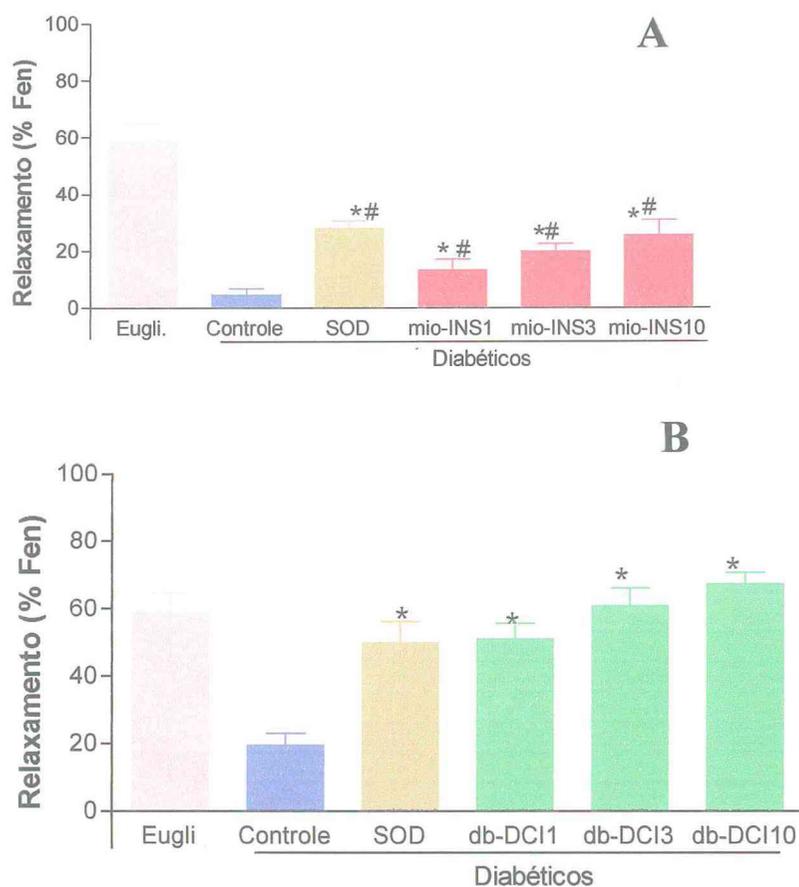


**Figura 16:** Efeito da incubação por 1 hora com os inositóis testados (1 $\mu$ M) no aumento do tônus induzido por 100 $\mu$ M de L-NAME em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.

##### 4.4.2. Efeito na Potenciação da Ação do Óxido Nítrico

A vasodilatação induzida por NO exógeno foi bloqueada em anéis de aorta de ratos diabéticos, porém o efeito foi restaurado em tecidos tratados agudamente com mio-INS, db-DCI e SOD (figura 17). O relaxamento induzido por 1 $\mu$ M de NO foi de  $58,9 \pm 5,7\%$  em anéis de aorta de ratos euglicêmicos e de  $4,6 \pm 2,1\%$  ( $p < 0,05$ ) em anéis de aorta de ratos diabéticos (figura 17). A incubação de 1 minuto com SOD

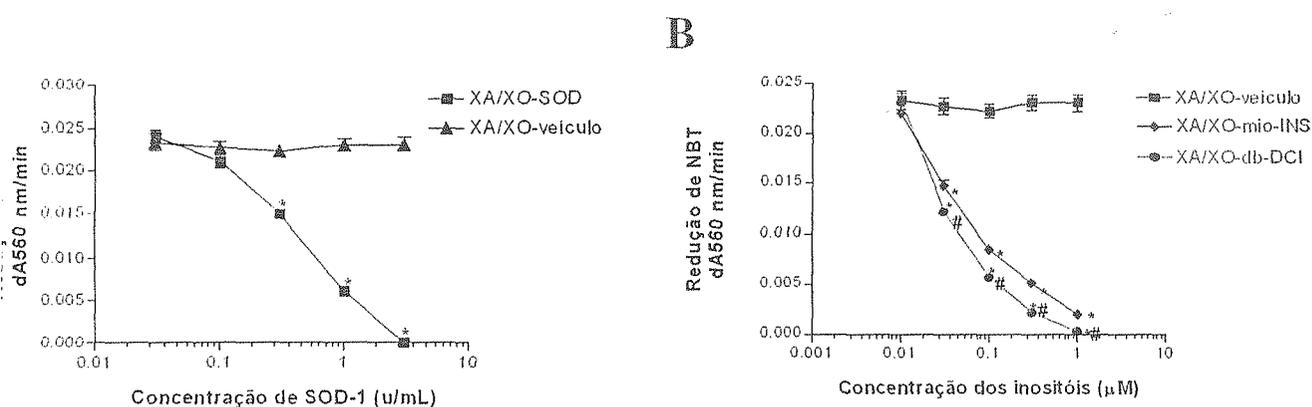
melhorou esta resposta para  $31,2 \pm 5,6\%$ , enquanto a adição do veículo não obteve efeito. A adição dos inositóis claramente incrementou o relaxamento induzido por NO de maneira dose-dependente (figura 17 A e B). Na maior concentração utilizada ( $10\mu\text{M}$ ) a resposta ao NO dos anéis de aorta de ratos diabéticos foi de  $25,3 \pm 5,5\%$  para a incubação com mio-INS, de  $67,2 \pm 3,4\%$  para o db-DCI e de  $19,3 \pm 3,8\%$  para o veículo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17:** Efeito da superóxido dismutase (SOD), 3,4-dibutiril-Dquirositol (db-DCI) e mioinositol (mio-INS) na potenciação do relaxamento induzido por óxido nítrico (NO por 1 hora – 1 a  $10\mu\text{M}$ ) em anéis de aorta precontraídos com  $0,1\mu\text{M}$  de fenilefrina (FEN). (A) mio-INS e (B) db-DCI. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5 unidades experimentais. \*  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer, diab (C) vs. tratado com inositol. #  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer, Eugli vs. tratado com inositol. Eugli = tecido euglicêmico.

#### 4.4.3. Efeito na formação de superóxido

Os resultados anteriormente relatados sugerem um possível papel antioxidante dos inositóis testados, portanto, para investigar esta possibilidade nós testamos a ação das drogas diretamente na formação de radicais livres *in vitro* em um sistema xantina/xantina oxidase. Como mostra a figura 18B, os dois inositóis testados diminuíram a taxa de redução de azul de nitrotetrazólico (NBT) induzida pela formação de superóxido oriunda da oxidação da xantina pela xantina oxidase. Os inositóis foram ativos de maneira dose-dependente em concentrações de nível sub-micromolar, sendo o db-DCI mais efetivo que o mio-INS. A taxa de redução não foi diferente nos controles com salina (Figura 18A), ao mesmo tempo que a SOD (1U/mL) efetivamente reduziu a taxa de reação. Em uma concentração de 3U/mL, a SOD aboliu completamente a redução de NBT pelo superóxido (Figura 18A).

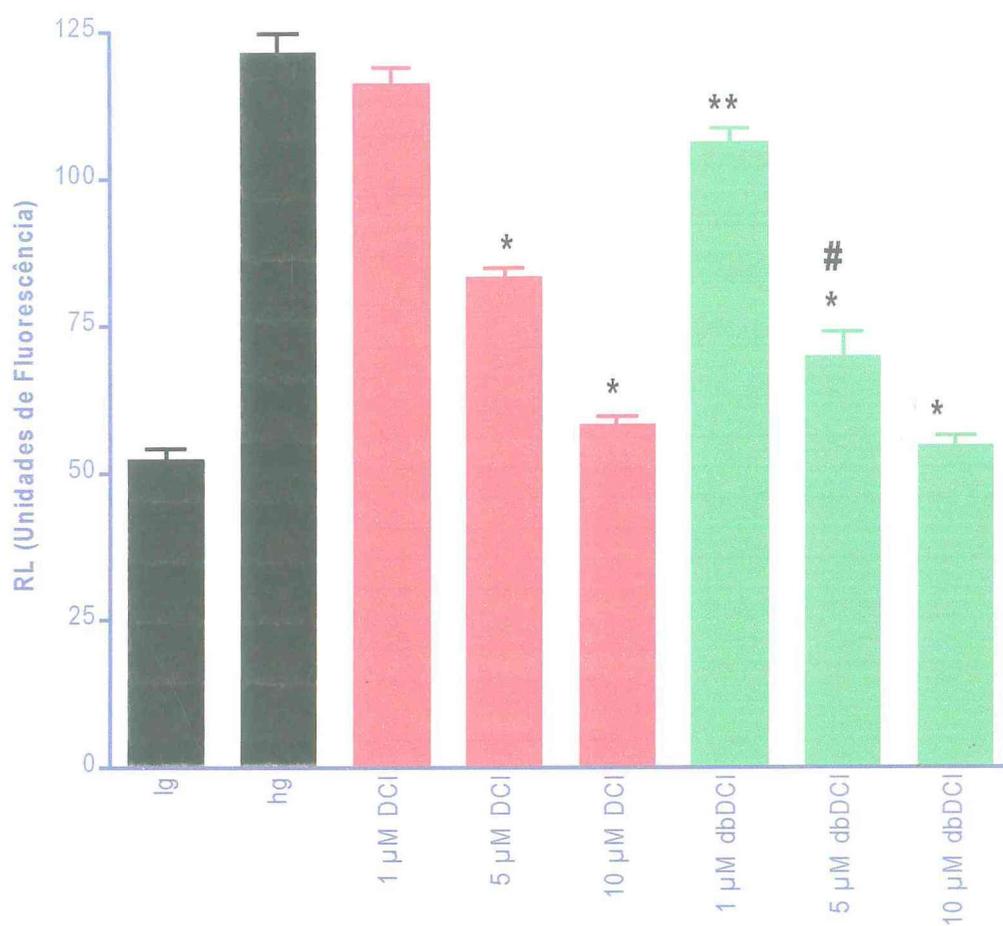


**Figura 18:** Efeito da superóxido dismutase (SOD- 0,03 a 3U/mL) na redução da reação de nitroblu tetrazolium (NBT) induzida por formação de superóxido oriundo do sistema xantina/xantina oxidase (XA/XO) é mostrado no painel (A). O painel (B) mostra o efeito dos inositóis testados (0,01 a 1 $\mu$ M) na taxa de redução NBT comparada com a adição isovolumétrica do veículo. \*  $p < 0.05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer, inositóis vs. veículo. #  $p < 0.05$ , ANOVA seguido de Tukey-Kramer, db-DCI vs. mio-INS. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=12$ ).

#### 4.4.4. Efeito na produção de radicais livres em células endoteliais

Sendo a formação endoetial de RL um fator chave para o desenvolvimento de complicações diabéticas induzindo disfunção endotelial, nós testamos a ação dos inositóis em reduzir a formação de RL na presença de uma alta concentração de glicose.

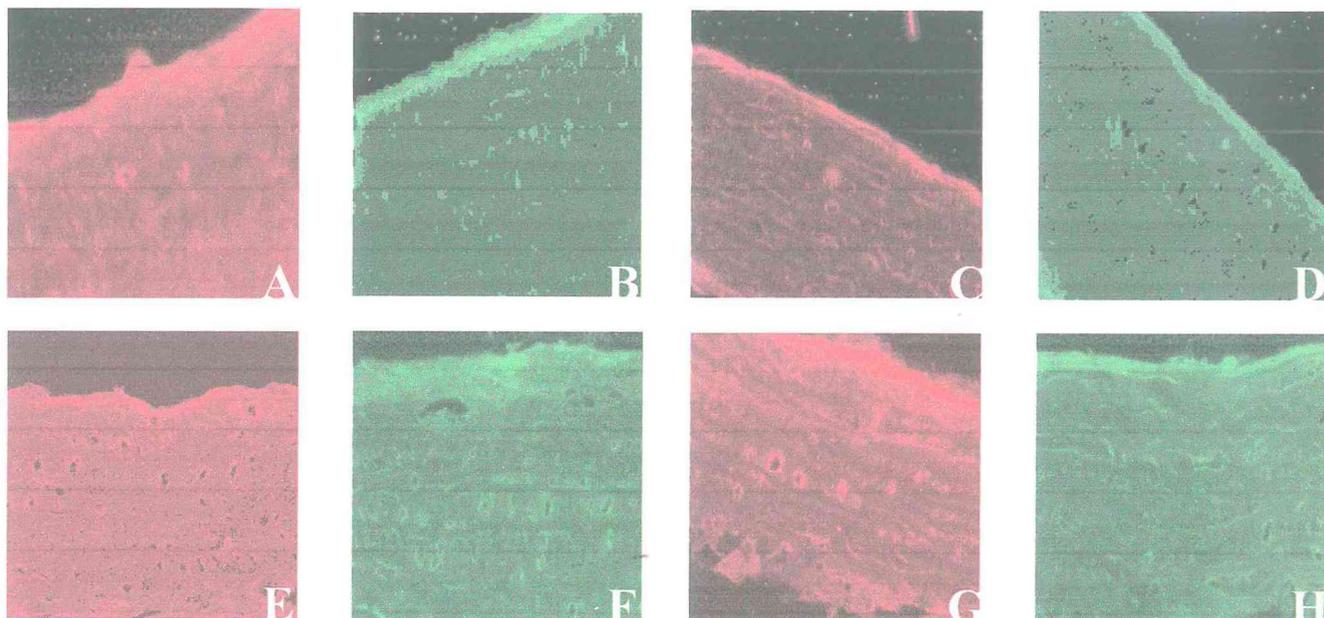
Como mostra a figura 19, dois inositóis, DCI e db-DCI, foram testados e comparados em uma análise com células endoteliais. Adicionados na concentração de 1 - 10 $\mu$ M, ambos os inositóis reduziram a nível basal a elevada formação de RL na presença de uma alta concentração de glicose (25mM). Neste experimento o nível basal da formação de RL a uma concentração de 5mM de glicose, foi de  $25,4 \pm 1,8$  nmol.ml<sup>-1</sup> e em uma concentração elevada de glicose (25mM) foi de  $121,5 \pm 3,4$  nmol.ml<sup>-1</sup>. A incubação de DCI e db-DCI preveniu o aumento da produção de R induzido pela alta concentração de glicose de maneira dose-dependente (Figura 19). A incubação de 10 $\mu$ M de DCI reduziu a produção de RL a  $58,2 \pm 1,3$  nmol.ml<sup>-1</sup> ( $p > 0,001$  vs. glicose a 25mM sozinha) e db-DCI na mesma concentração reduziu a produção de RL a  $54,5 \pm 1,8$  nmol.ml<sup>-1</sup> ( $p > 0,001$  vs. glicose a 25mM sozinha).



**Figura 19:** Supressão das concentrações de ROS exercida por D-quirositol e 3,4-dibutiril D-quirositol em células endoteliais de aorta de bovino incubadas na presença de 25mM de glicose. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de seis experimentos. ANOVA seguido de TUKEY.  $P < 0,001$  vs. 25mM de glicose (hg) sozinha. \*\*  $p < 0,01$  vs. 25mM de glicose sozinha. #  $p < 0,05$  vs. 5µM de DCI + 25mM de glicose. Db-DCI=Dibutiril D-quirositol; 1g = 5mM de glicose.

#### 4.4.5. Imunohistoquímica de células endoteliais de anéis de aorta

Um incremento da via de formação do óxido nítrico pelos inositóis foi investigado por análise imunológica de produtos finais da sinalização do NO, foram analisados produtos de nitrosotióis e nitrotirosina. Como mostra a figura 20, anéis de aorta de animais euglicêmicos e diabéticos tratados com salina, mio-INS e db-DCI durante quatro semanas, foram corados com seus específicos anticorpos. O grau de coloração tanto para nitrosotióis como para nitrotirosina foi claramente reduzido nos anéis provenientes de animais tratados com salina quando estes comparados aos anéis de animais euglicêmicos. O tratamento com os inositóis efetivamente restaurou a coloração para níveis controles tanto para nitrosotióis como para nitrotirosina. Além disso, a coloração nos tecidos de animais normais e tratados se estendeu para sítios subendoteliais e endoteliais. Isto demonstra independentemente que os inositóis atuam protegendo a sinalização do NO nos tecidos.



**Figura 20:** Imunohistoquímica para nitrosotióis e nitrotirosina de anéis de aorta de ratos diabéticos por aloxana; ACEG – coloração para nitrosotióis; BDFH – coloração para nitrotirosina; A e B – controle euglicêmico; C e D – diabético + vaículo; E e F – diabético + db-DCI; G e H – diabético + mio-INS

## Discussão

---

## 5. DISCUSSÃO

A diabetes é uma doença vascular crônica na qual a alteração da homeostase da glicose promove a disfunção de muitos órgãos (Cooper et al., 2001). O presente trabalho corrobora com dados previamente descritos que indicam uma disfunção endotelial (Cooper & Johnston, 2000; Ginsberg e Huang, 2000; Wei et al., 1998; Cohen, 1993), desbalanço metabólico (Zimmet, 1999), aumento da pressão arterial (Hansson et al., 1998) e alteração no estado redox celular (Beckman et al., 2001; Nishikawa et al., 2000) presentes com o desenvolvimento da diabetes.

O combate aos fatores de risco, como a hiperglicemia e hipertrigliciridemia, pode reduzir o estresse oxidativo que promove o sequestro de NO e redução da resposta à formação de óxido nítrico, tanto endógena como exógena. A hiperglicemia é o principal fator desencadeador das complicações microvasculares da diabetes. Estudos demonstram que o controle intensivo da glicemia pode reduzir a progressão da neuropatia e nefropatia em pessoas com diabetes tipo I (Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993) e tipo II (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998). O tratamento com dibutiril-D-quiuroinositol (db-DCI) produziu uma redução significativa de 30% na glicemia dos animais diabéticos (Tabela 2). Um possível mecanismo para explicar este efeito seria a atuação deste inositol como mediador da insulina, atuando na membrana das células e iniciando a cascata de sinalização da tirosina quinase o que culminaria com uma maior incorporação da glicose pelas células.

Estudos demonstram que os mediadores putativos da insulina têm ação hipoglicêmica e glicogênica *in vivo* similares as da insulina em ratos diabéticos. Além disso, estes mediadores atuam, de maneira concentração dependente como a insulina, aumentando a incorporação de glicose para formar glicogênio (Fonteles et al., 2000; Huang et al., 1993). Além disso, Huang e colaboradores (1993) demonstraram que o análogo do db-DCI o d-quiuroinositol (DCI) reduz agudamente os níveis glicêmicos de animais diabéticos por estrptozotocina.

O tratamento com db-DCI reduziu também significativamente a 48,1% o nível de triglicérides dos animais diabéticos tratados (Tabela 2). Lundman e colaboradores (1997 e 2001), demonstram que a hipertrigliceridemia (HTG) está associada com disfunção endotelial e aumento da concentração plasmática de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da óxido nítrico sintetase. Essa dislipidemia é mantida também por radicais livres (RL), pois estes promovem a redução da ação de lipases no endotélio de capilares contribuindo para a manutenção deste perfil dislipidêmico, além de diminuir o nível de HDL nos receptores de insulina na diabetes tipo II e favorecer à formação de produtos de lipoperoxidação (Laight et al., 2000; Pinkney et al., 1997). Desde que a HTG passou a ser considerada como fator de risco individual para a disfunção endotelial, principalmente quando associada a hiperglicemia, a redução significativa na HTG, demonstrada no grupo tratado com db-DCI teria efeitos benéficos na preservação da função endotelial. Vale salientar ainda que o tratamento com db-DCI promoveu um leve incremento nos níveis de HDL (Tabela 2), demonstrando mais uma ação benéfica deste composto no que diz respeito à dislipidemia.

O aumento dos fatores de risco, hipertrigliceridemia e hiperglicemia, pode ser o responsável pelo leve incremento pressórico observado, em nosso estudo, nos animais diabéticos tratados com salina. Outros estudos mostram que o aumento na formação de RL por estes fatores de risco promove o bloqueio da via NO-GMPc, que pode também ser acompanhado na diabetes por síntese reduzida de prostaciclina, bloqueando assim dois dos principais responsáveis pela manutenção do tônus vasorelaxante (Sobrevia & Mann, 1997; Ono et al., 1988). Este efeito está associado ainda, a uma manutenção ou mesmo aumento da formação de agentes vasoconstritores (Teschfariam, 1993), justificando assim o aumento da pressão na diabetes.

O tratamento com db-DCI bloqueou este incremento na pressão arterial, após um mês de indução da diabetes (Tabela 2). A explicação para este efeito pode estar relacionada a dois mecanismos distintos: à correção parcial da disfunção metabólica

diabética ou uma ação direta dos inositóis sob o estresse oxidativo desencadeado pelos fatores de risco.

O bloqueio do relaxamento endotélio-dependente em tecidos de animais diabéticos já foi demonstrado tanto em vasos de condutância como de resistência (Nascimento et al., 2003; Forti e Fonteles, 1998; Rodriguez-Mañas et al., 1998; Hattori et al., 1991; Kamata et al., 1989). Os dados obtidos em nosso laboratório confirmam essa atenuação nos anéis de aorta (vasos de condutância) (Figuras 11, 14 e 15) e nos leitos arteriolares mesentérico e renal (vasos de resistência) (Figuras 10, 12 e 13). Em contraste, o relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio, um agonista endotélio-independente, produziu um relaxamento sustentado em ambos os controles, normoglicêmico e diabético, assim como nos animais tratados (Tabelas 3-8), o que corrobora com achados anteriores que relatam que a resposta relaxante a vasodilatadores endotélio-dependentes está especificamente alterada em vasos diabéticos (Hattori et al., 1991).

Por outro lado, resultados obtidos com o tratamento de ratos diabéticos por aloxana com db-DCI durante 4 semanas, mostram uma maior sensibilidade ao vasodilatador endotélio-dependente e uma maior queda na pressão de perfusão nos LAM (Figura 10), assim como uma resposta máxima endotélio-dependente mais acentuada em anéis de aorta de ratos hiperglicêmicos tratados com db-DCI, quando comparados ao grupo de ratos hiperglicêmicos tratados com salina ou mioinositol (Figura 11). Estes dados demonstram a capacidade preventiva dos inositóis em reduzir a agressividade da vasculopatia diabética.

Similarmente, os testes *in vitro* realizados para se avaliar a função endotelial, mostram a recuperação do relaxamento endotélio-dependente em todos os tecidos testados, induzida pela incubação do db-DCI (Figuras 12-15). Este estudo denota a habilidade curativa desta molécula em reverter parcialmente a disfunção endotelial associada à diabetes.

Provavelmente esta sensibilidade maior do db-DCI se deva ao grupamento butiril do composto que proporciona maior lipossolubilidade e conseqüentemente uma maior disponibilidade do mediador insulínico no espaço intracelular. O mecanismo pelo qual estes mediadores aumentam a capacidade vasorelaxante relacionada à integridade do endotélio, ainda não está elucidado. No entanto, pode estar associado a uma melhor utilização da glicose, uma vez que estes compostos atuam como um mediador da ação da insulina e operam em conjunto com a cascata da tirosina quinase (Larner et al., 1990). Este mecanismo diminuiria os efeitos deletérios da hiperglicemia como aumento do estresse oxidativo, da formação de prostanóides vasoconstritores, ativação de Proteína quinase C, incremento da via dos polióis, produção de AGEs, entre outros (Brownlee, 2001; Tesfamarim et al., 1990 e 1992; Gupta et al., 1992).

Bailey (2000) relata que agentes que proporcionam uma maior sensibilidade à insulina ou mimetizam a ação deste hormônio podem ser bastante eficazes, especialmente no que diz respeito à resistência insulínica da diabetes tipo II. Podemos citar como exemplo deste efeito a ação da metformina que promove uma maior sensibilidade à insulina e melhora a função endotelial por inibir a atividade da tirosina fosfatase para estimular o receptor de insulina tirosina quinase (Holland et al., 2004; Katakam et al., 2000).

No entanto, a redução dos fatores de risco, hiperglicemia e hipertrigliceridemia, promovida pelo tratamento com os inositóis foi apenas de caráter parcial. Esta redução não foi suficiente para bloquear o surgimento da disfunção endotelial, quando comparado com animais diabéticos ou normoglicêmicos. Assim, o efeito dos inositóis pode estar relacionado a uma ação antioxidante direta, o que reduziria o dano endotelial, exercido por espécies de radicais livres (RL). O dano oxidativo é um determinante no desenvolvimento das complicações diabéticas (Brownlee, 2001; Nishikawa et al., 2000; Giugliano et al., 1996; Tesfamarin, 1994; Baynes, 1991; Wohaleb e Godin, 1987; Wolff, 1987).

Evidências recentes comprovam o papel dos radicais livres (RL) na atenuação da vasodilatação endotélio-dependente observada na diabetes (Laight et al., 2000). Além de outros fatores esta disfunção do endotélio associada à formação de ERO é proveniente da diminuição na liberação, produção e da biodisponibilidade reduzida do NO, resultantes de sua rápida inativação pelo radical superóxido (Van Etten et al., 2002; Darley-Usmar & White, 1997; Pieper, 1997; Gryglewski et al., 1986). O NO *per se* tem importantes atividades antioxidantes na parede vascular, incluindo “scavenger” do ânion superóxido e a inibição da lipoperoxidação (Laight et al., 2000). Qualquer distúrbio na via de sinalização do NO tem implicações patológicas importantes para a progressão da doença macroangiopática na diabetes, resultando de uma desregulação do tônus vascular, proliferação, agregação plaquetária, coagulação, fibrinólise, adesão de leucócitos, permeabilidade vascular e oxidação lipoprotéica (Laight 1999). Muitas desses efeitos pro-aterogênicos podem ser desencadeadas pela hiperglicemia, que por diversos mecanismos promove a inativação do NO e estresse oxidativo endotelial (Laight 1999; Taniguchi et al., 1996; Stehouwer et al., 1997), acompanhados ainda da diminuição da atividade do sistema antioxidante celular o que desbalanceia ainda mais o status redox celular (Gil-del Valle et al., 2005; Diplock, 1994).

A biodisponibilidade do NO para estimular GMPc depende do rendimento de sua produção pela eNOS assim como da atuação “scavenger” de NO realizada pelo superóxido. Os efeitos da diabetes na expressão de eNOS e produção de NO são controversos. Estudos anteriores relatam uma expressão aumentada (Cai et al., 2005; Cosentino et al., 2003; Zou et al., 2002), diminuída (Brownlee., 2001; Ding et al., 2000; Meininger et al., 2000) e inalterada (Mancusi et al., 1996) da proteína eNOS *in vitro*, em cultura de células endoteliais expostas agudamente a uma alta concentração de glicose. No entanto, dados prévios concordam que é o desacoplamento da eNOS, isto é, a disfunção desta, que pode contribuir para uma produção reduzida de NO e produção aumentada de RL (Stuehr & Griffith, 1992). Cai e colaboradores (2005) demonstram que a hiperglicemia promove uma disfunção da eNOS e deficiência de BH<sub>4</sub>. A perda de BH<sub>4</sub> parece ser um fator no desacoplamento de eNOS (Katusic, 2001), devido a uma transferência de elétrons do domínio redutase para o domínio

oxigenase da enzima, que são desviados para espécies de oxigênio moleculares em lugar da L-arginina (Vasquez-Vivar et al., 1998; Xia et al., 1998). Este processo promove uma produção preferencial de ERO em detrimento da produção de NO.

O aumento de RL não somente sequestra e desativa NO, como forma peroxinitrito (Zou et al., 2002). O NO reage com o superóxido em uma rápida reação de difusão para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Nanobashvili et al., 2004). A formação de peroxinitrito, um poderoso oxidante, tem duas importantes consequências para os sistemas biológicos: a perda da bioatividade do NO e a oxidação de uma larga variedade de moléculas biológicas (Kosak et al., 2005). O peroxinitrito pode também reagir com NO para formar o radical dióxido de nitrogênio, nitritos, e oxidar a BH<sub>4</sub> a BH<sub>3</sub> e subsequentemente a BH<sub>2</sub> (Laursen et al., 2001). BH<sub>2</sub> pode ainda competir com a L-arginina pela eNOS, resultando em dano acelerado ainda maior à bioatividade da eNOS (Vasquez-Vivar et al., 2002) e consequente dano endotelial.

Esta relação entre RL e DE pode ser comprovada ainda por estudos que demonstram uma diminuição da expressão de SOD, enzima antioxidante associada à eliminação do ânion superóxido, em aortas de animais diabéticos (Kobayashi & Kamata, 1999) e que a expressão aumentada de SOD pode restaurar a função de vasos diabéticos (Zanetti et al., 2001). A SOD reverte também a disfunção endotelial em arteríolas renais e o tempol, um similar da SOD, também melhora a resposta endotélio-dependente à ACh em arteríolas aferentes renais de coelhos diabéticos (Ohishi & Carmines, 1995).

A atividade da eNOS, foi investigada em nosso trabalho, com o auxílio do L-NAME, um inibidor desta enzima, em anéis de aorta. O L-NAME ao bloquear a liberação de NO pela eNOS promove um incremento no tônus contrátil do vaso. A adição de L-NAME promoveu uma contração expressivamente reduzida em anéis de aorta de animais diabéticos quando comparados à resposta de anéis de animais euglicêmicos. A incubação dos inositóis restaurou parcialmente a contração induzida por L-NAME (Figura 16), demonstrando uma atividade de eNOS aumentada. No

entanto, o mecanismo deste processo ainda não está esclarecido, porém pode estar relacionado a ação direta destes inositóis no combate à produção de RL como discutiremos posteriormente.

A ação do NO foi então investigada em anéis de aorta. O relaxamento promovido pela adição de  $1\mu\text{M}$  de NO foi severamente reduzido em anéis de aorta de animais diabéticos (Figura 17), indicando a existência de um mecanismo de inativação do NO, como o estresse oxidativo, ou uma diminuição da atividade da guanilato ciclase.

Vários estudos demonstram que a SOD melhora o relaxamento endotélio-dependente mediado por NO em vasos de animais diabéticos (Rodriguez-Mañas et al., 1998; Diederich et al., 1994; Hattori et al., 1991). A utilização da SOD como controle positivo em nosso trabalho confirma estes achados prévios, ou seja, com a incubação de SOD houve um incremento no relaxamento induzido por NO exógeno, mostrando que a desativação do superóxido está diretamente relacionada ao aumento da bioatividade do NO. Com a incubação dos inositóis testados, o relaxamento induzido por NO também foi restaurado sendo que a adição de db-DCI ( $10\mu\text{M}$ ) restaurou a resposta vasorelaxante ao NO para nível normal (Figura 17). Demonstrando que os inositóis também podem aumentar a bioatividade do NO, por um provável mecanismo antioxidante.

Na tentativa de avaliar a fundo este mecanismo, nós investigamos o possível efeito dos inositóis adicionados a um meio com alta concentração de RL formados em um sistema “in vitro” por oxidação de xantina com xantina oxidase, que representa uma fonte de produção de ânion superóxido (Benov & Fridovich, 2002). Para se avaliar o nível de superóxido utilizamos o nitro-substituto aromático, azul de nitrotetrazólio (NBT), que pode ser reduzido pelo superóxido via reações de transferência de um elétron e formar diformazan (Tarpey & Fridovich, 2001).

A adição de salina ao meio com alta concentração de superóxido, não proporcionou mudanças na redução de NBT, indicando nenhuma alteração no nível de superóxido gerado pelo sistema oxidante. Com adição de SOD ao meio, a reação de redução de NBT foi completamente reduzida ao nível basal, demonstrando uma completa eliminação de ânion superóxido. Similarmente, a adição dos inositóis em concentrações de caráter submicromolar também resultaram na eliminação de superóxido (Figura 18). Novamente, o db-DCI foi mais efetivo que o mio-INS. Este achado também sugere, porém não prova ainda, que os inositóis agem como antioxidantes.

O nosso próximo passo foi avaliar este possível efeito antioxidante dos inositóis em cultura de células endoteliais. Neste estudo utilizamos o DCI e o db-DCI. Investigamos o efeito dos inositóis em células endoteliais incubadas em alta concentração de glicose, a qual é responsável por promover elevados níveis de RL. Ao se transferir células endoteliais de bovino de um meio com concentração de glicose normal (5mM) e incubá-las em um meio com alta concentração de glicose (25mM), a concentração de RL aumentou 2-3 vezes. A adição de DCI e db-DCI em concentração de 1,5 a 10 mM reduziu o nível de RL para o basal de forma dose-dependente, com o db-DCI sendo mais efetivo que o DCI (Figura 19). Este achado demonstra que os inositóis são “scavengers” de ROS e sugere, porém não prova, sua atuação como antioxidantes. Claramente os inositóis são efetivos tanto na cultura de células como *in vitro*, em reduzir o incremento na produção de RL de maneira dose-dependente.

Além disso, nós investigamos a ação dos inositóis na possível proteção dos sistemas de sinalização do NO. Anéis de aorta de ratos controle, diabéticos tratados com salina e diabéticos tratados com inositóis por um mês foram examinados por meio de imunohistoquímica para avaliar a produção de nitrotióis e nitrotirosina, produtos finais da sinalização do NO em proteínas. Os achados obtidos demonstram que a coloração vista no endotélio de anéis de aorta foi marcadamente reduzida nos animais diabéticos não tratados. A administração oral dos inositóis protegeu a via de sinalização do NO como demonstrado pelo aumento da coloração vista em anéis de

animais tratados, nos quais esta foi essencialmente restaurada ao nível normal (Figura 20). Vale salientar que a coloração subendotelial vista no grupo controle euglicêmico foi também observada no grupo tratado. Achado semelhante já foi relatado previamente por Gow e colaboradores (2002). Assim, os inositóis atuam cronicamente para preservar a sinalização do NO mediada pela manutenção da produção de nitrosotióis e nitrotirosina.

A terapia antioxidante baseada na suplementação com preparações farmacêuticas de antioxidantes nutrientes e não-nutrientes, pode conferir benefícios cardiovasculares e metabólicos na diabetes (Timimi et al., 1998; Ting et al., 1996; Keegan et al., 1995). Este tema tem sido bastante discutido em virtude do conhecimento dos fatores que cercam o estresse oxidativo, além de estar ancorado à evidência da redução da defesa antioxidante na diabetes. Achados experimentais afirmam que antioxidantes melhoram a vasodilatação endotélio-dependente e a sensibilidade à insulina (Nascimento et al., 2003; Mattia et al., 2003). Dados epidemiológicos expressam ainda uma forte associação entre a dieta com nutrientes antioxidantes e a proteção contra a doença cardiovascular. Experimentos utilizando antioxidantes naturalmente produzidos incluindo vitamina E, vitamina C, beta-caroteno e selênio, mostraram benefícios cardiovasculares, onde se apresentavam como potenciais nutracêuticos (Laight et al., 2001).

De acordo com o nosso estudo, o benefício do db-DCI na disfunção endotelial presente na diabetes parece ser decorrente de uma ação hipoglicemiante associada a uma ação antioxidante direta removendo radicais livres ou até mesmo pode estar regulando a atividade da eNOS aumentando a disponibilidade de cofatores. Estudos demonstram que a glicazida, um agente hipoglicemiante oral, apresenta propriedades antioxidantes e reverte a disfunção endotelial ocorrente na diabetes (Mattia et al., 2003). Outros dados mostram que a insulina pode induzir o vasorelaxamento dependente de NO e aumentar a expressão de eNOS em cultura de células por ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3) (Kuboki et al., 2000; Steimber & Boron, 1999). Os mecanismos relacionados a este efeito da insulina sob a via da eNOS – guanilato

ciclase solúvel pode incluir a formação reduzida de RL e ativação diminuída de proteína quinase C, assim como o incremento no metabolismo de lipoproteínas (Zanetti et al., 2005).

O nosso estudo apresentou importantes implicações para estratégias terapêuticas tanto com relação à prevenção como à redução de complicações associadas a diabetes. A provável atuação do db-DCI como “scavenger” de radicais livres, reduzindo a inativação de NO, conseqüentemente aumentando sua biodisponibilidade, sugere este composto como um útil adjuvante na prevenção e no combate a uma exposição crônica a RL na diabetes. A confirmação deste efeito em estudos clínicos, como também na obtenção de valores de TRAP (*total radical trapping antioxidant parameter*) após o tratamento com db-DCI, poderá fornecer uma indicação adicional para o tratamento da diabetes mellitus.

*Conclusão*

---

## 6. Conclusões

- Os animais diabéticos por aloxana que não foram tratados apresentaram uma disfunção endotelial nos vasos de resistência e condutância com um percentual de mais de 50%;
- O tratamento oral com db-DCI reduz o incremento pressórico presente nos controles diabéticos;
- O tratamento com db-DCI reduz parcialmente o desbalanço metabólico ocorrente na diabetes;
- O db-DCI previne parcialmente a disfunção endotelial em ratos diabéticos;
- O db-DCI reverte agudamente de forma parcial a disfunção endotelial em ratos diabéticos;
- O db-DCI incrementa o relaxamento induzida pelo óxido nítrico de maneira dose dependente;
- O db-DCI atua como “scavenger” de RL tanto em ambiente rico em glicose como oriundos do sistema enzimático XA/XO;
- O db-DCI atua melhorando a sinalização do NO, aumentando os produtos finais de sua ativação.
- Dessa forma podemos sugerir que a reversão da disfunção endotelial em animais diabéticos, proporcionada pelo tratamento com 3,4-dibutiril-D-quirositol, seja derivada de uma redução dos parâmetros metabólicos associada a uma ação antioxidante direta.

## *Referências Bibliográficas*

---

## 7. Referências Bibliográficas

ABEL, E.D.; PERONI, O.; KIM, J.K.; KIM, Y.B.; BOSS, O.; HADRO, E.; MINNEMANN, T.; SHULMAN, G.I.; KAHN, B.B. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature.*, v.409, n. 6821, p. 729-33, 2001.

ABEL, E.D.; PERONI, O.; KIM, J.K.; KIM, Y.B.; BOSS, O.; HADRO, E.; MINNEMANN, T.; SHULMAN, G.I.; KAHN, B.B. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature.*, v.409, n. 6821, p. 729-33, 2001.

AHMED N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diab. Res. Clin. Pract.* 67; 2005; 3-21

AIELLO LP, BURSELL SE, CLERMONT A, DUH E, ISHII H, TAKAGI C, MORI F, CIULLA TA, WAYS K, JIROUSEK M, SMITH LE, KING GL. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes.* 1997 Sep;46(9):1473-80.

ALBERT AGMM., ZIMMET PZ. For the WHO Consultation, Definition, diagnosis and classifications of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Type II diabetes in children and adolescents – consensus statement. *Diabetes Care.* 2000, 23: 381-9

AMOS, A.F.; MCCARTY, D.J.; ZIMMET, P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med.*, v.14, n.5, p.81-85, 1997.

ASPLIN I, GALASKO G, LARNER J. chiro-inositol deficiency and insulin resistance: a comparison of the chiro-inositol- and the myo-inositol-containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 1;90(13):5924-8.

ATKINSON MA, MACLAREN NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1994 Nov 24;331(21):1428-36. Review

BAILEY CJ. Potential new treatments for type 2 diabetes. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Jul;21(7):259-65. Review

BAYNES JW. The Maillard hypothesis on aging: time to focus on DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Apr;959:360-7. Review

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, v.40, p.405-412, 1991.

- BECKMAN JA, GOLDFINE AB, GORDON MB, CREAGER MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation*. 2001 Mar 27;103(12):1618-23
- BENOV L, FRIDOVICH I. Is reduction of the sulfonated tetrazolium 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2-tetrazolium 5-carboxanilide a reliable measure of intracellular superoxide production? *Anal Biochem*. 2002 Nov 15;310(2):186-90.
- BOHLEN HG, NASE GP. Arteriolar nitric oxide concentration is decreased during hyperglycemia-induced betaII PKC activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Feb;280(2):H621-7.
- BROWNLEE M.; VLASSARA H.; CERAMI A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, v.101, p.527-537, 1984.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v.414, n.6865, p.:813-820, 2001.
- BRUNING, J.C.; MICHAEL, M.D.; WINNAY, J.N.; HAYASHI, T.; HORSCH, D.; ACCILI, D.; GOODYEAR, L.J.; KAHN, C.R. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, v.2, n.5, p.559-569, 1998.
- BRUNO R., GROSS., Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3,6 year follow up study. *J. Diabetes Complications*. 2000
- CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000 Nov 10;87(10):840-4. Review
- CAI S, KHOO J, CHANNON KM. Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2005 Mar 1;65(4):823-31
- CALVER, A, COLLIER, J, VALLANCE, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.*, v.90, p.2548-2554, 1992.
- CAMERON NE, COTTER MA. Neurovascular dysfunction in diabetic rats. Potential contribution of autoxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):1159-63
- CAMERON, NE; COTTER, MA; ARCHIBALD, V; DINES, KC; MAXFIELD, EK. Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. , v.37, n.5, p.449-459, 1994.
- CERAMI C, FOUNDS H, NICHOLL I, MITSUHASHI T, GIORDANO D, VANPATTEN S, LEE A, AL-ABED Y, VLASSARA H, BUCALA R, CERAMI A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13915-20

- CERIELLO A, BORTOLOTTI N, MOTZ E, CRESCENTINI A, LIZZIO S, RUSSO A, TONUTTI L, TABOGA C Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**. 1998 Sep;21(9):1529-33
- CHIBBER R, MOLINATTI PA, KOHNER EM Intracellular protein glycation in cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells exposed to high-glucose concentration. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 1999 Feb;45(1):47-57
- CLARK CM Jr, LEE DA: Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. **N. Engl J Med** 1995; 332:1210-1217
- CLEMENTS RS JR. Pathogenesis of diabetic neuropathy. **N Y State J Med**. 1982 May;82(6):864-71.
- COHEN, RA. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes Mellitus. **Circulation**, v.87, n.v, p.67-68, 1993.
- COOPER ME, JOHNSTON CI. Optimizing treatment of hypertension in patients with diabetes. **JAMA**. 2000 Jun 28;283(24):3177-9.
- COOPER ME., GILBERT RE., EPSTEIN m: Pathophysiology of diabetic nephropathy. **Metabolism** 1998; 47: 3-6
- COOPER ME., JOHNSTON CI: Optimizing treatment of hypertension in patients with diabetes. **JAMA** 2000: 283; 3177-3179
- COOPER, M.E. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v.44, n.11, 1p.957-972, 2001.
- COSENTINO F, ETO M, DE PAOLIS P, VAN DER LOO B, BACHSCHMID M, ULLRICH V, KOUROEDOV A, DELLI GATTI C, JOCH H, VOLPE M, LUSCHER TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. **Circulation**. 2003 Feb 25;107(7):1017-23
- COSTA E FORTI, A.; FONTELES, M.C. Decreased endothelium dependent relaxation (nitric oxide) in diabetic kidneys. **Horm Metab Res**, v.30, p.55-7., 1998.
- DARLEY-USMAR V, WHITE R. Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for cardiovascular disease. **Exp Physiol**. 1997 Mar;82(2):305-16. Review.
- DAVIES MJ., RAYMOND NT, DAY JL., HALES CN., BURDEN AC. Diabetic Medicine 2000, 17: 433-40
- DE MATTIA G, LAURENTI O, FAVA D. Diabetic endothelial dysfunction: effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients. **J Diabetes Complications**. 2003 Mar-Apr;17(2 Suppl):30-5.

DEFRONZO RA. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med.* 1997 May;50(5):191-7. Review.

DEVARAJ S, HIRANY SV, BURK RF, JIALAL I. Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F(2)-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes. *Clin Chem.* 2001 Nov;47(11):1974-9. Erratum in: *Clin Chem* 2002 Jan;48(1):213.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of longterm complications in insulin-dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 977-986

DIEDERICH D, SKOPEC J, DIEDERICH A, DAI FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension.* 1994 Jun;23(6 Pt 2):957-61

DIEDERICH D, SKOPEC J, DIEDERICH A, DAI FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol.* 1994 Mar;266(3 Pt 2):H1153-61

DINCER, Y., AKCAY, T., ALADEMIR, Z., ILKOVA, H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.*, v.51, p.1360-1362, 2002.

DING Y, VAZIRI ND, COULSON R, KAMANNA VS, ROH DD Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jul;279(1):E11-7

DIPLOCK AT. Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med.* 1994;15(4):293-376. Review

ENGERMAN, R.L.; KERN, T.S.; LARSON, M.E. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia*, v.37, n.2, p.141-144, 1994.

FEENER EP., KING GL., : Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 1997; 350 (suppl 1): S19-SI3

FONTELES, M.C.; ALMEIDA, M.Q.; LARNER, J. Antihyperglycemic effects of 3-O-methyl-D-chiro-inositol and D-chiro-inositol associated with manganese in streptozotocin diabetic rats. *Horm Metab Res.*, v.32, n.4, p.129-132, 2000.

FONTELES, M.C.; HUANG, L.C.; LARNER, J. Infusion of pH 2.0 D-chiro-inositol glycan insulin putative mediator normalizes plasma glucose in streptozotocin diabetic rats at a dose equivalent to insulin without inducing hypoglycaemia. *Diabetologia*, v.39, n.6, p.731-734, 1996.

GARCIA MJ, MCNAMARA PM, GORDON T, KANNEL WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. **Diabetes**. 1974 Feb;23(2):105-11.

GIARDINO I, EDELSTEIN D, BROWNLEE M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. **J Clin Invest**. 1994 Jul;94(1):110-7.

GIL-DEL VALLE L, MILIAN LDE L, TOLEDO A, VILARO N, TAPANES R, OTERO MA. Altered redox status in patients with Diabetes Mellitus type I. **Pharmacol Res**. 2005 Apr;51(4):375-80

GINSBERG, H.N.; HUANG, L.S. The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. **J. Cardiovasc.**, v.7, p.325-331, 2000.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v.19, p.257-267, 1996.

GOPAUL NK, ANGGARD EE, MALLET AI, BETTERIDGE DJ, WOLFF SP, NOUROOZ-ZADEH J. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. **FEBS Lett**. 1995 Jul 17;368(2):225-9

GREENE DA, AREZZO JC, BROWN MB. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group. **Neurology**. 1999 Aug 11;53(3):580-91. Erratum in: **Neurology** 2001 Apr 24;56(8):1124.

GROOP LC. The molecular genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Intern Med**. 1997 Feb;241(2):95-101. Review.

GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v.320, p.454-456, 1986.

GUPTA S, SUSSMAN I, MCARTHUR CS, TORNHEIM K, COHEN RA, RUDERMAN NB. Endothelium-dependent inhibition of Na(+)-K+ ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia. Possible role of endothelium-derived nitric oxide. **J Clin Invest**. 1992 Sep;90(3):727-32

HAMMES HP, MARTIN S, FEDERLIN K, GEISEN K, BROWNLEE M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1991 Dec 15;88(24):11555-8.

HANSSON L, ZANCHETTI A, CARRUTHERS SG, DAHLOF B, ELMFELDT D, JULIUS S, MENARD J, RAHN KH, WEDEL H, WESTERLING S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. **HOT Study Group. Lancet**. 1998 Jun 13;351(9118):1755-62

HARRISON LC, HONEYMAN MC. Cow's milk and type 1 diabetes: the real debate is about mucosal immune function. **Diabetes**. 1999 Aug;48(8):1501-7. Review

HATTORI, Y.; KAWASAKI, H.; ABE, K.; KANNO, M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am. J. Physiol.**, v.261, n.30, p.H1086-H1094, 1991.

HAYDEN JM, REAVEN PD. Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. **Curr Opin Lipidol**. 2000 Oct;11(5):519-28. Review

HOLLAND W. THOMAS M. CGANG Y. WIERNSPERGER N. STITH B. Metformin (Glucophage) inhibits tyrosine phosphatase activity to stimulate the insulin receptor tyrosine kinase. **Biochemical Pharmacology**. 67. 2004; 2081-2091

HOSODA A, NOMURA E, MURAKAMI A, KOSHIMIZU K, OHIGASHI H, MIZUNO K, TANIGUCHI H. Synthesis of feruloyl-myo-inositols and their inhibitory effects on superoxide generation. **Bioorg Med Chem Lett**. 2000 Jul 3;10(13):1439-42.

HSUEH, W.A.; LAW, R.E. Diabetes is a vascular disease. **J Investig Med.**, v.46, n.8, p.387-90, 1998.

HUANG, L.C.; FONTELES, M.C.; HOUSTON, D.B.; LARNER J. Chiroinositol deficiency and insulin resistance. III. Acute and hypoglycemic effects of two inositol phosphoglycan insulin mediators in normal and streptozotocin-diabetic rats in vivo. **Endocrinology**, v.132, n.2, p.652-657, 1993.

HUANG, L.C.; HEIMARK D.; LINKO J.; NOLAN, R.; LARNER, J. A model phosphatase 2C phosphatase 1 activation cascade via dual control of inhibitor-1 (INH-1) and DARPP-32 dephosphorylation by two inositol glycan putative insulin mediators from beef liver. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.255, n.1, p.150-156, 1999.

INOBUCHI T, BATTAN R, HANDLER E, SPORTSMAN JR, HEATH W, KING GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1992 Nov 15;89(22):11059-63

ISHII H, KOYA D, KING GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. **J Mol Med**. 1998 Jan;76(1):21-31. Review.

JACHEC W; TOMASIK A; TARNAWSKI R; CHWALINSKA E. Evidence of oxidative stress in the renal cortex of diabetic rats: favourable effect of vitamin E. **Scand J Clin Lab Invest.**, v.62, n.1, p.81-88, 2002;.

JANSSON, J.H.; NILSSON, T.K.; JOHNSON, O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. **Br Heart J.**, v.66, p.351-355, 1991

JARRETT RJ. Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev.** 1989 Nov;5(7):547-58. Review

JENNINGS PE, CHIRICO S, JONES AF, LUNEC J, BARNETT AH. Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. **Diabetes Res.** 1987 Nov;6(3):151-4.

JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, S.J.; SCALES K.M.; CUSCO, J.A.; LEE, B.K.; CREAGER, M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation.**, v. 88, p.2510-2516, 1993.

KAMATA, K.; MIYATA, N.; KASUYA, Y. Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.97, p.614-618, 1989.

KAMATA, K.; MIYATA, N.; KASUYA, Y. Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.97, p.614-618, 1989.

KARPEN CW, CATALAND S, O'DORISIO TM, PANGANAMALA RV. Production of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and vitamin E status in platelets from type I human diabetic subjects. **Diabetes.** 1985 Jun;34(6):526-31

KATUSIC ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2001 Sep;281(3):H981-6. Review

KEEGAN A, WALBANK H, COTTER MA, CAMERON NE. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Diabetologia.** 1995 Dec;38(12):1475-8

KENNINGTON, A.S.; HILL, C.R.; CRAIG, J.; BOGARDUS, C.; RAZ, I.; ORTMAYER, H.K.; HANSEN, B.C.; ROMERO, G.; LARNER, J. Low urinary chiro-inositol excretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med.**, v.323, n.6, p.373-378, 1990.

KLIP, A.; PAQUET, M.R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. **Diabetes Care**, v.13, n.3, p.228-243, 1990.

KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Relationship among cholesterol, superoxide anion and endothelium-dependent relaxation in diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v.367, p.213-22, 1999.

KORSHUNOV SS, SKULACHEV VP, STARKOV AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett.** 1997 Oct 13;416(1):15-8.

KOSAK AJ, LIU F, FUNOVICS P, JACOBY A, KUBANT R, MALINSKI T. Role of peroxynitrite in the process of vascular tone regulation by nitric oxide and prostanoids – a non-technological approach. **Prost. Leuk. And Essent. Fatty Acids** 72. 2005; 105-113

KOWLURU RA, ENGERMAN RL, CASE GL, KERN TS Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants. *Neurochem Int.* 2001 Apr;38(5):385-90.

KOYA D, HANEDA M, NAKAGAWA H, ISSHIKI K, SATO H, MAEDA S, SUGIMOTO T, YASUDA H, KASHIWAGI A, WAYS DK, KING GL, KIKKAWA R. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J.* 2000 Mar;14(3):439-47.

KOYA D, JIROUSEK MR, LIN YW, ISHII H, KUBOKI K, KING GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):115-26

KUBOKI K, JIANG ZY, TAKAHARA N, HA SW, IGARASHI M, YAMAUCHI T, FEENER EP, HERBERT TP, RHODES CJ, KING GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation.* 2000 Feb 15;101(6):676-81.

KUBOKI K, JIANG ZY, TAKAHARA N, HA SW, IGARASHI M, YAMAUCHI T, FEENER EP, HERBERT TP, RHODES CJ, KING GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation.* 2000 Feb 15;101(6):676-81.

KULKARNI, R.N.; BRUNING, J.C.; WINNAY, J.N.; POSTIC, C.; MAGNUSON, M.A.; KAHN, C.R. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell.*, v.96, n.3, p.329-339, 1999a.

KULKARNI, R.N.; WINNAY, J.N.; DANIELS, M.; BRUNING, J.C.; FLIER, S.N.; HANAHAN, D.; KAHN, C.R. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest.*, v.104, n.12, p.R69-75, 1999b.

LAIGHT DW, CARRIER MJ, ANGGARD EE. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):457-64. Review.

LAIGHT DW, CARRIER MJ, ANGGARD EE. Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999 Jul-Aug;15(4):274-82. Review

LARNER J Insulin and glycogen synthase. *Diabetes.* 1972;21(2 Suppl):428-38.

LARNER J, CRAIG JW. Urinary myo-inositol-to-chiro-inositol ratios and insulin resistance. *Diabetes Care.* 1996 Jan;19(1):76-8.

LARNER J, JACKSON WT, GRAVES DJ, STAMER JR. Inositol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. *Arch Biochem Biophys.* 1956 Feb;60(2):352-63.

- LARNER J, ROACH PJ, HUANG LC, BROOKER G, MURAD F, HAZEN R. Hormonal control of glycogen metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 1979;111:103-23. Review.
- LARNER, J. D-chiro-inositol in insulin action and insulin resistance-old-fashioned biochemistry still at work. *IUBMB Life*, v.51, n.3, p.139-148, 2001.
- LARNER, J. D-chiro-inositol- Its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance *Int. Jnl. Experimental Diab. Res.*, v.3, p.47-60, 2002.
- LARNER, J.; ALLAN, G.; KESSLER, C.; REAMER, P.; GUNN, R.; HUANG, L.C. Phosphoinositol glycan derived mediators and insulin resistance. Prospects for diagnosis and therapy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, v.9, n.2-4, p.127-137,1998.
- LARNER, J.; HUANG, L.C. Identification of a novel inositol glycan signaling pathway with significant therapeutic relevance to insulin resistance: an insulin signaling model using both tyrosine kinase and G-proteins. *Diabetes Review*, v.3, p.217-229, 1999.
- LARNER, J.; HUANG, L.C.; SCHWARTZ, C.F.; OSWALD, A.S.; SHEN, T.Y.; KINTER, M.; TANG, G.Z.; ZELLER, K. Rat liver insulin mediator which stimulates pyruvate dehydrogenase phosphate contains galactosamine and D-chiroinositol. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.151, n.3, p1416-1426, 1988.
- LARNER, J.; PRICE, J.D.; HEIMARK, D.; SMITH, L.; RULE, G.; PICCARIELLO, T.; FONTELES, M.C.; PONTES, C.; VALE, D.; HUANG, L. Isolation; structure; synthesis; and bioactivity of a novel putative insulin mediator. A galactosamine chiro-inositol pseudo-disaccharide Mn<sup>2+</sup> chelate with insulin-like activity. *J Med Chem.*, v.46, n.15, p.3283-3291, 2003.
- LARNER, J.; ROMERO, G.; KENNINGTON, A.S.; LILLEY, K.; KILGOUR, E.; ZHANG, C.; HEIMARK, D.; GAMEZ, G.; HOUSTON, D.B.; HUANG, L.C. Duality in the mechanism of action of insulin. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, v.24, p.290-294, 1990.
- LARNER, J.; ROMERO, G.; KENNINGTON, A.S.; LILLEY, K.; KILGOUR, E.; ZHANG, C.; HEIMARK, D.; GAMEZ, G.; HOUSTON, D.B.; HUANG, L.C. Duality in the mechanism of action of insulin. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, v.24, p.290-294, 1990.
- LAURSEN JB, SOMERS M, KURZ S, MCCANN L, WARNHOLTZ A, FREEMAN BA, TARPEY M, FUKAI T, HARRISON DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1282-8
- LESLIE RD, BEYAN H, SAWTELL P, BOEHM BO, SPECTOR TD, SNIEDER H. Level of an advanced glycated end product is genetically determined: a study of normal twins. *Diabetes*. 2003 Sep;52(9):2441-4.

- LOW MG, SALTIEL AR. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science*. 1988 Jan 15;239(4837):268-75. Review.
- LUNDMAN, P.; ERIKSSON M.J.; SCHENK-GUSTAFSSON K.; KARPE F.; TORNWALL, P. Transient trygliceridemia decreases vascular reactivity in young, health men without risk factors for coronary heart disease. *Circulation*, v.96, p.3266-3268, 1997.
- LUNDMAN, P.; ERIKSSON, M.J.; STÜHLINGER, COOKE, J.P.; HAMSTEN, A.; TORNVALL, P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentration of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol*, v.38, p.111-116, 2001.
- MANCUSI G, HUTTER C, BAUMGARTNER-PARZER S, SCHMIDT K, SCHUTZ W, SEXL V. High-glucose incubation of human umbilical-vein endothelial cells does not alter expression and function either of G-protein alpha-subunits or of endothelial NO synthase. *Biochem J*. 1996 Apr 1;315 ( Pt 1):281-7
- MATO, J.M.; KELLY, K.L.; ABLER, A.; JARETT, L. Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells. *J Biol Chem.*, v.262, n.5, p.2131-2137, 1987.
- MEININGER CJ, MARINOS RS, HATAKEYAMA K, MARTINEZ-ZAGUILAN R, ROJAS JD, KELLY KA, WU G. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J*. 2000 Jul 1;349(Pt 1):353-6
- MEININGER CJ, MARINOS RS, HATAKEYAMA K, MARTINEZ-ZAGUILAN R, ROJAS JD, KELLY KA, WU G. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J*. 2000 Jul 1;349(Pt 1):353-6
- MONNIER VM, KOHN RR, CERAMI A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jan;81(2):583-7
- MULLER G, GREY S, JUNG C, BANDLOW W. Insulin-like signaling in yeast: modulation of protein phosphatase 2A, protein kinase A, cAMP-specific phosphodiesterase, and glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities. *Biochemistry*. 2000 Feb 15;39(6):1475-88.
- NAGAMATSU, M.; NICKANDER, K.K.; SCHMELZER, J.D.; RAYA, A.; WITTRICK, D.A.; TRITSCHLER, H.; LOW, P.A. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, v.18, p.1160-1167, 1995.
- NAGPALA PG, MALIK AB, VUONG PT, LUM H. Protein kinase C beta 1 overexpression augments phorbol ester-induced increase in endothelial permeability. *J Cell Physiol*. 1996 Feb;166(2):249-55

NAKAMURA I, SAITO M, FUKUMOTO Y, YOSHIDA M, NISHI K, WEISS RM, LATIFPOUR J. Experimental diabetes upregulates the expression of ureteral endothelin receptors. **Peptides**. 1997;18(7):1091-3

NANOBASHVILI J, NEUMAYER C, FUEGL A, PUNZ A, BLUMER R, MITTLBOCK M, PRAGER M, POLTERAUER P, DOBRUCKI LW, HUK I, MALINSKI T. Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. **J Vasc Surg**. 2004 Apr;39(4):868-77.

NASCIMENTO NR, COSTA-E-FORTI A, PETER AA, FONTELES MC Free radical scavengers improve the impaired endothelium-dependent responses in aorta and kidneys of diabetic rabbits. **Diabetes Res Clin Pract**. 2003 Sep;61(3):145-53.

NESTLER, J.E.; JAKUBOWICZ, D.J.; REAMER, P.; GUNN, R.D.; ALLAN, G. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.1314-1320, 1999.

NISHIKAWA T; EDELSTEIN D; DU XL; YAMAGISHI S; MATSUMURA T; KANEDA Y; YOREK MA; BEEBE D; OATES PJ; HAMMES HP; GIARDINO I; BROWNLEE M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v.404, n.6779, p.787-790, 2000.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney Int Suppl.**, v.77, p.S26-S30, 2000.

NISHIZUKA Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science**. 1992 Oct 23;258(5082):607-14. Review.

NIWA, T.; YAMAMOTO, N.; MAEDA, K.; YAMADA, K.; OHKI, T.; MORI, M. Gas chromatographic--mass spectrometric analysis of polyols in urine and serum of uremic patients. Identification of new deoxyalditols and inositol isomers. **J Chromatogr.**, v.277, p.25-39, 1983.

NONAKA A, KIRYU J, TSUJIKAWA A, YAMASHIRO K, MIYAMOTO K, NISHIWAKI H, HONDA Y, OGURA Y. PKC-beta inhibitor (LY333531) attenuates leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2000 Aug;41(9):2702-6

OHISHI, K.; CARMINES, P.K. Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. **J Am Soc Nephrol.**, v.5, n.8, 1559-1566, 1995.

OMLAND, T.; LIE, RT.; AAKVAAG, A.; AARSLAND, T.; DICKSTEIN, K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. **Circulation**, v.89, p.1573-1579, 1994.

ONO H, UMEDA F, INOBUCHI T, IBAYASHI H. Glucose inhibits prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. **Thromb Haemost**. 1988 Oct 31;60(2):174-7.

ORTMEYER, H.K.; BODKIN, N.L.; LILLEY K.; LARNER, J.; HANSEN, B.C. Chiroinositol deficiency and insulin resistance. I. Urinary excretion rate of chiroinositol is directly associated with insulin resistance in spontaneously diabetic monkeys. **Endocrinology**, v.132, n.2, p.640-5, 1993.

ORTMEYER, H.K.; LARNER, J.; HANSEN, B.C. Effects of D-chiroinositol added to a meal on plasma glucose and insulin in hyperinsulinemic monkeys. **Obes Res.**, v.3, n.4, p.605S-608S, 1995.

PANZRAM G. Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**. 1987 Mar;30(3):123-31. Review

PATTI ME, KAHN CR. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**. 1998;9(2-4):89-109. Review.

PETERSON TE, POPPA V, UEBA H, WU A, YAN C, BERK BC. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. **Circ Res**. 1999 Jul 9;85(1):29-37.

PHILLIPPY BQ, GRAF E Antioxidant functions of inositol 1,2,3-trisphosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate. **Free Radic Biol Med**. 1997;22(6):939-46

PIEPER, G.M. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.29, n.1, p.8-15, 1997.

PIEPER, G.M.; GROSS, G. Oxygen-derived free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p.H825-H833; 1988.

PIEPER, G.M.; MEI, D.A.; LANGENSTROER, P.; O'ROUKE, S.T. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. **Am. J. Physiol.**, v.263, p.H676-H680, 1992.

PINKNEY AE, LOGAN DT, WILSON HT. Mercury concentrations in pond fish in relation to a coal-fired power plant. **Arch Environ Contam Toxicol**. 1997 Aug;33(2):222-9.

POLONSKY KS, STURIS J, BELL GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. **N Engl J Med**. 1996 Mar 21;334(12):777-83. Review..

RAJAGOPALAN S, KURZ S, MUNZEL T, TARPEY M, FREEMAN BA, GRIENDLING KK, HARRISON DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest**. 1996 Apr 15;97(8):1916-23.

RAMAKRISHNAN S, SULOCHANA KN, PUNITHAM R. Two new functions of inositol in the eye lens: antioxidation and antiglycation and possible mechanisms. *Indian J Biochem Biophys.* 1999 Apr;36(2):129-33

REAVEN P. Dietary and pharmacologic regimens to reduce lipid peroxidation in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 1995 Dec;62(6 Suppl):1483S-1489S

REENE, D.A.; AREZZO, J.C.; BROWN, M.B. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group. *Neurology.* v.53, n.3, p.580-591, 1999.

RIDKER, P.M.; VAUGHAN, D.E.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.H. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet*, v.341, p.1165-1168, 1993.

RODRIGUEZ-MANAS L, ANGULO J, PEIRO C, LLERGO JL, SANCHEZ-FERRER A, LOPEZ-DORIGA P, SANCHEZ-FERRER CF. Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1998 Apr;123(8):1495-502

RODRÍGUEZ-MAÑAS, L.; ANGULO, J.; PEIRÓ, C.; LIERGO, J.L.; SANCHEZ-FERRER, A.; LOPEZ-DORIGA, P.; SANCHEZ-FERRER, C.F. Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol*, v. 123, p.1495-1502, 1998.

ROMERO, G.; LUTTRELL, L.; ROGOL, A.; ZELLER, K.; HEWLETT, E.; LARNER, J. Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins: potential precursors of insulin mediators. *Science*, v.240, n.4851, p.509-511, 1988.

ROSEN P, BALLHAUSEN T, BLOCH W, ADDICKS K. Endothelial relaxation is disturbed by oxidative stress in the diabetic rat heart: influence of tocopherol as antioxidant. *Diabetologia.* 1995 Oct;38(10):1157-68.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, v.414, p.799-806, 2001.

SARASHINA G, YAMAKOSHI M, NORITAKE M, TAKAHASHI M, KURE M, KATSURA Y, SHIOMI H, TSUBOI I, KAWAZU S, YAMAGATA F, TOMINAGA M, MATSUOKA T. A study of urinary myo-inositol as a sensitive marker of glucose intolerance. *Clin Chim Acta.* 2004 Jun;344(1-2):181-8

SCHIFFRIN EL, TOUYZ RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 Suppl 3:S2-13. Review

SHIBA T, INOGUCHI T, SPORTSMAN JR, HEATH WF, BURSELL S, KING GL. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol.* 1993 Nov;265(5 Pt 1):E783-93.

SILVESTRE JA. Hospitalizações SUS 1997. Coordenadoria da Atenção à Saúde do Idoso, **Ministério da Saúde**.

SOBREVIA L, MANN GE Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. **Exp Physiol**. 1997 May;82(3):423-52. Review

SOBREVIA L, MANN GE. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. **Exp Physiol**. 1997 May;82(3):423-52. Review.

SONGER TJ. The economic costs of NIDDM. **Diabetes Metab Rev**. 1992 Dec;8(4):389-404. Review.

SORBINIL RETINOPATHY TRIAL RESEARCH GROUP; A randomized trial of sorbinil; an aldose reductase inhibitor; in diabetic retinopathy. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. **Arch Ophthalmol**., v.108, n.9, p.1234-1244, 1990.

SPICHLER ERS., SPICHLER D., MARTINS CSF. Diabetic lower extremities amputation. Rio de Janeiro, BR. **Diabetologia** 1998; 41(A 279); 90-6

STEHOUWER, C.D.; DONKER, A.J.. Clinical usefulness of measurement of urinary albumin excretion in diabetes mellitus. **Neth J Med**., v.42, n.5-6, p.175-86, 1993.

STEHOUWER, C.D.; LAMBERT, J.; DONKER, A.J.; VAN HINSBERGH, V.W. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. **Cardiovasc Res**., v.34, n.1, p.55-68., 1997.

STUEHR DJ, GRIFFITH OW. Mammalian nitric oxide synthases. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**. 1992;65:287-346. Review

SUN, T.; HEIMARK, D.B.; NGUYGEN, T.; NADLER, J.L. LARNER, J. Myo-inositol to chiro-inositol epimerase activities and chiro-inositol to myo-inositol ratios are decreased in tissues of GK type 2 diabetic rats compared to Wistar controls. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.293, p.1092-1098; 2002.

SUZUKI, S.; KAWASAKI, H.; SATOH, Y.; OHTOMO, M.; HIRAI, M.; HIRAI, A.; HIRAI, S.; ONODA, M.; MATSUMOTO, M.; HINOKIO, Y. Urinary chiro-inositol excretion is an index marker of insulin sensitivity in Japanese type II diabetes. **Diabetes Care**, v.17, n.12, p.1465-1468, 1994.

SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L. Thiolic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. **Free Rad Res Comms**, v.15, p.255-263., 1991.

TANIGUCHI N, KANETO H, ASAHI M, TAKAHASHI M, WENYI C, HIGASHIYAMA S, FUJII J, SUZUKI K, KAYANOKI Y. Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. **Diabetes**. 1996 Jul;45 Suppl 3:S81-3

TESFAMARIAM B, PALACINO JJ, WEISBROD RM, COHEN RA. Aldose reductase inhibition restores endothelial cell function in diabetic rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993 Feb;21(2):205-11

TESFAMARIAM, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.*, v 16, n.3, p.383-391, 1994.

TESFAMARIAM, B.; COHEN, R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am. J. Physiol.*, v.263, p.H321-H326, 1992.

TESFAMARIAM, B.; COHEN, R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am. J. Physiol.*, v.263, p.H321-H326, 1992.

TESFAMARIAM; B.; BROWN, M. L.; DEYKIN, D.; COHEN, R.A. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J. Clin. Invest.*, v.85, p.929-932, 1990.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20; 1183

THOMPSON, S.G.; KIENAST, J.; PYKE, S.D.; HAVERKATE, F.; VAN DE LOO, J.C. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med*, v.332, p.635-641, 1995.

TIMIMI FK, TING HH, HALEY EA, RODDY MA, GANZ P, CREAGER MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Mar 1;31(3):552-7

TING HH, TIMIMI FK, BOLES KS, CREAGER SJ, GANZ P, CREAGER MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):22-8

TOMLINSON DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia*. 1999 Nov;42(11):1271-81. Review.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998; 352: 837-853.

VAN ETTEN RW, DE KONING EJ, VERHAAR MC, GAILLARD CA, RABELINK TJ. Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate. *Diabetologia*. 2002 Jul;45(7):1004-10. Epub 2002 Jun 06

VANE, J.R.; ANGGARD, E.E.; BOTTING, R.M. Mechanisms of disease: regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*, v.323, p.27-36, 1990.

VASQUEZ-VIVAR J, KALYANARAMAN B, MARTASEK P, HOGG N, MASTERS BS, KAROUI H, TORDO P, PRITCHARD KA JR. Superoxide generation

by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998 Aug 4;95(16):9220-5.

VASQUEZ-VIVAR J, MARTASEK P, WHITSETT J, JOSEPH J, KALYANARAMAN B. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. **Biochem J.** 2002 Mar 15;362(Pt 3):733-9.

VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B.; MARTASEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B.S.; KAROUI, H.; TORDO, P.; PRITCHARD JR., K.A. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.95, n.16, p.9220-9225, 1998.

VLASSARA H, PALACE MR Diabetes and advanced glycation endproducts. **J Intern Med.** 2002 Feb;251(2):87-101. Review.

VLASSARA H. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. **Ann Med.** 1996 Oct;28(5):419-26. Review

WEI M, GASKILL SP, HAFFNER SM, STERN MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. **Diabetes Care,** 21:1167-72, 1998.

WEI, Y.H. Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. **Proc Natl Sci Counc Repub China B.**, v.22, n.2, p.55-67, 1998.

WILLIAMS B, GALLACHER B, PATEL H, ORME C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. **Diabetes.** 1997 Sep;46(9):1497-503.

WILLIAMSON JR, CHANG K, FRANGOS M, HASAN KS, IDO Y, KAWAMURA T, NYENGAARD JR, VAN DEN ENDEN M, KILO C, TILTON RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes.** 1993 Jun;42(6):801-13. Review.

WILLIAMSON, J.R.; CHANG, K.; ROWOLD, E.; MARVEL, J.; TOMLINSON, M.; SHERMAN, W.R.; ACKERMANN, K.E.; KILO, C. Diabetes-induced increases in vascular permeability and changes in granulation tissue levels of sorbitol; myo-inositol; chiro-inositol; and scyllo-inositol are prevented by sorbinil. **Metabolism,** v.35, n.4, p.41-45, 1986.

WOHALEB AS, GODIN DV. Alterations in the free radical tissue-defense mechanisms in the streptozocin-induced diabetes in rats. **Diabetes** 36: 1114-1118, 1987.

WOLFF SP. The potential role of oxidative stress in diabetes and its complications; novel implications for theory and therapy. In diabetic complications; Scientific and clinical aspects. Scientific and clinical aspects Crabbe M.J.C. (Ed) **Churchill livingstone** 167-221, 1987.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of oxidative glycosylation in diabetes. *Biochem. J.*, v.245:243-250, 1987.

WOLIN MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1430-42. Review

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1999

XIA, Y.; ROMAN, L.J.; MASTERS, B.S.; ZWEIER, J.L. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem.*, v.273, n.35, p.22635-22639, 1998.

ZANETTI M, SATO J, KATUSIC ZS, O'BRIEN T Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase alters endothelium-dependent relaxations in aortas from diabetic rabbits. *Diabetologia.* 2000 Mar;43(3):340-7

ZANETTI M; ZWACKA R; ENGELHARDT J; KATUSIC Z; O'BRIEN T. Superoxide anions and endothelial cell proliferation in normoglycemia and hyperglycemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.21, n.2, p.195-200, 2001.

ZANETTI, M., SATO, J., KATUSIC, Z.S., O'BRIEN, T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol*, 280:H2516-23, 2001.

ZIMMET PZ, COLMAN PG, Welborn Problems with new criteria for diagnosis of diabetes mellitus. *Med J Aust.* 1999 Jul 19;171(2):108-9.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, v.414, p.782-7, 2001.

ZOU MH, SHI C, COHEN RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):817-26.