



Ruy Roberto Porto Ascenso Rosa

**Impacto do diabetes precoce sobre a função vascular da musculatura esquelética**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Áurea Elizabeth Linder

Florianópolis  
2021

“O orientador participou diretamente na origem do projeto e na organização de protocolos, além de ter contribuído para a estrutura e o desenvolvimento do projeto; porém, não contribuiu para a elaboração e correção deste documento escrito, que ficou sob a responsabilidade da coorientadora.”

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ascenso Rosa, Ruy Roberto Porto

Impacto do diabetes precoce sobre a função vascular da musculatura esquelética / Ruy Roberto Porto Ascenso Rosa ; orientador, José Eduardo da Silva Santos, coorientadora, Áurea Elizabeth Linder, 2021.

142 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Diabetes Mellitus. 3. Complicações do Diabetes. 4. Músculo Esquelético. 5. Doenças Vasculares Periféricas. I. Santos, José Eduardo da Silva. II. Linder, Áurea Elizabeth. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Ruy Roberto Porto Ascenso Rosa

**Impacto do diabetes precoce sobre a função vascular da musculatura esquelética**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Jamil Assreuy Filho  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Wagner Luis Reis  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa  
Universidade Federal do Amazonas

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

---

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger  
Coordenador do Programa

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Áurea Elizabeth Linder  
Coorientadora

Florianópolis, 06 de setembro de 2021.



Este trabalho é dedicado ao meu salvador, o SENHOR **Jesus Cristo** e aos meus amados pais, familiares e amigos.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter entregado o seu filho unigênito Jesus Cristo por amor à humanidade e nos ter dado o dom do Espírito Santo. Obrigado SENHOR por ter sido força e fortaleza frente a tantas dificuldades vividas esses anos.

Aos meus pais, Rui Ascenso Rosa e Aldenia Porto Ascenso Rosa, por mais uma vez me apoiarem e por sempre o fazer em todo o tempo, amo vocês. E aos meus irmãos, Amauri e Raul, obrigado por todos os momentos de ensino e aprendizagem, vocês são os melhores.

À professora Beth, por ter me acolhido tão bem desde que cheguei a Florianópolis em 2015. Obrigado por ter sido força e ânimo nos momentos difíceis, me estimulando a permanecer firme. Obrigado por ter aceitado realizar a minha coorientação e por ter transformado esse momento em um momento único e saudável. E por mesmo antes disso, sempre estar me apoiando e incentivando, os estágios em docência com a senhora sempre eram os melhores!

À professora Thereza e ao professor Anicleto, sempre serei grato por terem aberto as portas do programa para mim, foram tão solícitos quando entrei em contato e durante todo o percurso da pós-graduação.

Aos meus amigos. Angélica, Eduardo “Pós-doc”, Elaine, Guilherme, Leonardo, Lívia, Merita, Nariana, Natália, Stefane, Stherfanni, Thaine e Thiago, por todos os momentos alegres e tristes vividos, foi muito importante contar com o apoio de vocês. À Flora, Jaqueline e Ana Claudia, agradeço a sincera amizade. À Família Natatorium, Luís, Fábio, Marcos, Josi, Maria, Nicole, Leandro, Leonardo, Viviane, Nito, Ivo, Luciano, Sérgio, Ju, Cauê, Zélia, André, Édipo, Jéssica, Ana Gabriela, Bruna, Mariana e toda a equipe do grupo de corrida, vocês proporcionaram momentos inesquecíveis.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Farmacologia que tive o prazer de conhecer e de conviver um pouco mais de perto, são muitos e gostaria de citar todos, mas sintam-se inclusos aqui e recebam os meus sinceros agradecimentos. Agradeço também pelos ótimos momentos vividos com vocês durante as organizações e realizações do nosso tão amado Curso de Inverno de Farmacologia da UFSC (2015-2019). Não poderia me esquecer de agradecer a confiança depositada pelo professor Rui Prediger durante as organizações, o que possibilitou a condução de cursos que mantiveram o sucesso das edições anteriores e permitiram um ótimo ambiente de integração entre os discentes.

À mestra Jessica Alexandra Monteiro Santos, ao Professor (Emeritus) Jaime Wisniak, PhD e ao mestre Alan Dantas dos Santos Felisberto, meu muito obrigado pela gentileza com a qual me prestaram auxílio, ao disponibilizarem algumas referências que eu não conseguia acesso para subsidiar a parte histórica da descoberta do Diabetes.

Ao professor José Eduardo o meu reconhecimento por toda a contribuição e dedicação à realização desse trabalho. Aos professores do departamento o meu muito obrigado por todos esses anos de convivência e de ensino. Obrigado a todos pela confiança, ensinamentos repassados e as agradáveis experiências que vivenciei com cada um.

Aos membros da banca professores Dr. Jamil Assreuy Filho, Dr. Wagner Luis Reis, Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa, Dr. Romulo Leite, Dr. Carlos Rogerio Tonussi e Dr. Fabiano Elias Xavier que gentilmente aceitaram avaliar o conteúdo desse trabalho e fazer contribuições valiosas tanto a este trabalho como à minha vida acadêmica. E a todos os meus professores que, em cada fase de minha vida, souberam contribuir de forma significativa na minha formação, gostaria mais uma vez de destacar os professores da fase da graduação Ma. Sarah Jane de Araújo Barros, Dra. Alessandra Camillo da Silveira Castelo Branco e Dr. Tonny Kerley de Alencar Rodrigues.

A todos os amigos que trabalham no departamento, em especial ao Kleyton Steinbach, à Scheila Delfino, ao Sérgio, à Andréia, à Luciana, ao Pedro, ao Tiago e demais funcionários do biotério da farmacologia. Também agradeço aos funcionários do RU e aos vigilantes do CCB.

A todos os irmãos da Primeira Igreja Batista em Alto Parnaíba e da Segunda Igreja Batista na Ilha de Florianópolis.

Ao Edmilson e a Elisabete. E a todos que contribuíram de forma significativa para a execução deste trabalho, muito obrigado!

As instituições que deram suporte financeiro a esta pesquisa: CAPES e CNPq.

Aos animais meu respeito.



## RESUMO

Pacientes diabéticos apresentam concentrações plasmáticas elevadas de glicose. O controle glicêmico é fundamental para a prevenção e redução das complicações micro e macrovasculares do diabetes, sendo que no tipo 2 também é necessário prevenir os demais fatores de risco associados. Contudo, estima-se que metade dos portadores do diabetes desconhece a sua condição, sendo o diagnóstico necessário para que o tratamento adequado possa ser iniciado no intuito de alcançar o controle glicêmico. Além disso, estudos demonstram que, mesmo entre os casos diagnosticados, é grande a ocorrência do diabetes descompensado, o que favorece o surgimento das complicações vasculares e amputação de membros relacionada à má perfusão tecidual. Com a hipótese de que a disfunção vascular nas fases iniciais do diabetes contribui para a má perfusão da musculatura esquelética mais tardiamente, desenvolvemos esse estudo que tem por objetivo caracterizar a função vascular no diabetes precoce e a sua contribuição para a perfusão da musculatura esquelética em ratas. Para alcançarmos nossos objetivos, utilizamos a estreptozotocina para induzir a hiperglicemia em ratas, realizamos medidas da pressão arterial e do fluxo de perfusão tecidual em animal anestesiado e padronizamos um novo método para a avaliação da perfusão em pernas isoladas, a fim de possibilitar a detecção das possíveis alterações presentes no leito vascular da musculatura esquelética. Comparando com ratas controle, nas ratas diabéticas nossos resultados demonstram: que a adrenalina e a fenilefrina foram menos eficazes em aumentar e a isoprenalina foi menos eficaz em diminuir a pressão arterial; que a adrenalina foi mais eficaz e a isoprenalina foi menos eficaz em elevar a frequência cardíaca, enquanto que a fenilefrina e a acetilcolina foram menos eficazes em diminuí-la; que a adrenalina, fenilefrina, isoprenalina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio foram menos eficazes em reduzir o fluxo sanguíneo renal; que a adrenalina e a fenilefrina foram menos eficazes em aumentar o fluxo sanguíneo muscular e a isoprenalina foi mais eficaz em aumentá-lo. Avaliando os mesmos agentes nas preparações de pernas isoladas de ratas controle e diabéticas de 4 semanas, observamos no grupo das diabéticas que os efeitos da isoprenalina em reduzir a pressão de perfusão foi mais duradouro e que a adrenalina foi menos eficaz em elevar a pressão de perfusão. Nessas preparações de ratas diabéticas, não observamos elevação da pressão de perfusão quando o meio contendo cálcio foi substituído por meio zero cálcio e que o aumento da pressão de perfusão induzido por influxo de cálcio extracelular estimulado por fenilefrina foi menor. Esses resultados demonstram que as alterações vasculares sistêmicas precedem aos prejuízos do leito vascular periférico. E ainda que as alterações iniciais que precedem a disfunção vascular no leito da musculatura esquelética estão relacionadas com a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos e a movimentação de cálcio. Frente a esses resultados, demonstramos que uma disfunção vascular no diabetes precoce parece contribuir para uma má perfusão da musculatura esquelética em ratas.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus. Diabetes Mellitus Experimental. Complicações do Diabetes. Músculo Esquelético. Doenças Vasculares Periféricas. Pé Diabético.



## ABSTRACT

Diabetic patients have elevated plasma glucose concentrations. Glycemic control is essential for the prevention and reduction of micro and macrovascular complications of diabetes, although in Type 2 diabetes it is also necessary to prevent other associated risk factors. It is estimated that half of people with diabetes are unaware of their condition making the diagnosis necessary for the appropriate treatment to be initiated in order to achieve glycemic control. Furthermore, studies show that, even among diagnosed cases, the occurrence of decompensated diabetes is high, which provides the emergence of vascular complications and limb amputation related to poor tissue perfusion. With the hypothesis that vascular dysfunction in the early stages of diabetes contributes to late skeletal muscle tissues poor perfusion, we developed this study that aims to characterize vascular function in early stages of diabetes and its contribution to skeletal muscle perfusion in female rats. For this, we used streptozotocin to induce hyperglycemia in female rats, measured blood pressure and tissue perfusion flow in anesthetized animals, and standardized a new method to evaluate perfusion in isolated legs, in order to detect possible alterations in the vascular bed of the skeletal musculature. Comparing with control rats, the results obtained in diabetic rats showed: that adrenaline and phenylephrine were less effective in increasing and isoprenalina was less effective in decreasing blood pressure; adrenaline was more effective and isoprenalina was less effective in raising heart rate while phenylephrine and acetylcholine were less effective in lowering it; adrenaline, phenylephrine, isoprenalina, acetylcholine, and sodium nitroprusside were less effective in reducing renal blood flow; adrenaline and phenylephrine were less effective in increasing muscle blood flow and isoprenalina was more effective in increasing it. Assessing the same agents in the isolated leg preparations of control and 4-week diabetic rats, we observed in the diabetic group that the effects of isoprenalina in reducing perfusion pressure were longer lasting and that adrenaline was less effective in raising perfusion pressure. In these preparations from diabetic rats, we did observe an increase in perfusion pressure when the calcium-containing medium was replaced by zero-calcium medium and that the increase in perfusion pressure induced by extracellular calcium influx stimulated by phenylephrine was smaller. Our results demonstrate that systemic vascular changes precede to peripheral vascular bed damage. Furthermore, the initial changes that precede vascular dysfunction in the skeletal muscle bed are related to the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors and calcium ion movement. Based on these results, we demonstrate that vascular dysfunction in early diabetes seems to contribute to poor skeletal muscle perfusion in female rats.

**Keywords:** Diabetes Mellitus. Experimental Diabetes Mellitus. Diabetes Complications. Skeletal Muscle. Peripheral Vascular Diseases. Diabetic Foot.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação fisiológica da liberação de insulina nas células $\beta$ -pancreáticas pelo aumento na concentração de glicose plasmática e outros fatores.....	30
Figura 2 – Estrutura química e fórmula molecular da 2-Deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ) e da 2-Deoxy-D-glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> ) .....	35
Figura 3 – Fatores que previnem e que desencadeiam as complicações microvasculares e macrovasculares no diabetes mellitus tipo 1 e no diabetes mellitus tipo 2 .....	39
Figura 4 – Ação da glicose-6-fosfato desidrogenase na redução celular de fatores oxidantes, ação da aldose redutase inativando aldeídos tóxicos e a influência do contexto hiperglicêmico sobre a via dos polióis, onde é demonstrada a competição da aldose redutase com a glutational redutase pelo NADPH .....	45
Figura 5 – Síntese das principais alterações encontradas em vasos de condutância e vasos de resistência obtidos de animais diabéticos .....	58
Figura 6 – Perfusão da musculatura esquelética do quadrante posterior esquerdo de <i>Rattus norvegicus</i> utilizando o sistema de perfusão de órgãos isolados.....	70
Figura 7 – Fatores avaliados antes e após a administração de estreptozotocina ou veículo em ratas.....	73
Figura 8 – Peso corpóreo de ratas antes e após administração de estreptozotocina ou veículo .....	77
Figura 9 – Glicemia capilar de ratas após administração de estreptozotocina ou veículo .....	78
Figura 10 – Ingesta alimentar (A) e hídrica (B) de ratas após administração de estreptozotocina ou veículo .....	79
Figura 11 – Diurese de ratas antes e após administração de estreptozotocina ou veículo .....	80
Figura 12 – Valores pressóricos e de fluxo sanguíneo basais de ratas controle e diabéticas anestesiadas após 1 semana da administração de estreptozotocina e veículo .....	82
Figura 13 – Valores pressóricos e de fluxo sanguíneo basais de ratas controle e diabéticas anestesiadas após 4 semana da administração de estreptozotocina e veículo .....	83
Figura 14 – Variação da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina .....	85
Figura 15 – Área sob a curva da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina .....	86
Figura 16 – Frequência cardíaca de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina .....	87
Figura 17 – Fluxo sanguíneo renal de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina .....	88
Figura 18 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina.....	89
Figura 19 – Variação da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina .....	90
Figura 20 – Área sob a curva da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina .....	91
Figura 21 – Frequência cardíaca de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina .....	92
Figura 22 – Fluxo sanguíneo renal de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina .....	93
Figura 23 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina.....	94
Figura 24 – Variação da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina.....	96

Figura 25 – Área sob a curva da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina .....	97
Figura 26 – Frequência cardíaca de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina .....	98
Figura 27 – Fluxo sanguíneo renal de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina .....	99
Figura 28 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina .....	100
Figura 29 – Variação da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina .....	102
Figura 30 – Área sob a curva da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina .....	103
Figura 31 – Frequência cardíaca de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina .....	104
Figura 32 – Fluxo sanguíneo renal de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina .....	105
Figura 33 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina .....	106
Figura 34 – Variação da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio .....	108
Figura 35 – Área sob a curva da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio .....	109
Figura 36 – Frequência cardíaca de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio .....	110
Figura 37 – Fluxo sanguíneo renal de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio .....	111
Figura 38 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio .....	112
Figura 39 – Valores pressóricos basais da pressão de perfusão de preparações de pernas isoladas de ratas controle e diabéticas após 4 semana da administração de estreptozotocina ou veículo .....	113
Figura 40 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para fenilefrina (A) e adrenalina (B) .....	114
Figura 41 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para acetilcolina (A) e nitroprussiato de sódio (B) .....	116
Figura 42 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para isoprenalina .....	117
Figura 43 – Efeito da remoção de cálcio da solução de perfusão no tônus basal do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) .....	119
Figura 44 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) à fenilefrina (3 $\mu$ M) em meio zero cálcio .....	120
Figura 45 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para o cálcio .....	120
Figura 46 – Efeito da apocinina sobre as respostas da fenilefrina (A) e da adrenalina (B) na perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas e controle .....	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Testes utilizados para o diagnóstico do diabetes e valores de referência adotados em cada caso.....	28
Tabela 2 – Critérios para o rastreamento do DM em adultos assintomáticos .....	29
Tabela 3 – Transportadores de glicose e suas respectivas capacidades de transporte para a glicose.....	53





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
bpm	batimentos por minuto
COX	ciclooxigenase
DAG	diacilglicerol
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
DMSO	dimetilsulfóxido
EDRF	fator relaxante derivado do endotélio, do inglês <i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	sintase do óxido nítrico endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
FLC $\beta$	fosfolipase C
GLUT	transportador de glicose
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona dissulfeto
GTP	guanosina 5'-trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteínas de alta densidade, do inglês <i>high density lipoproteins</i>
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R	receptores de IP <sub>3</sub>
K <sub>ATP</sub>	canais de potássio sensíveis ao ATP
MLCK	cinase de cadeia leve da miosina, do inglês <i>myosin light chain kinase</i>
MLCP	fosfatase de cadeia leve da miosina, do inglês <i>myosin light chain phosphatase</i>
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF- $\kappa$ B	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide</i>
NOS	sintase do óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide synthase</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	radical ânion superóxido
PAD	pressão arterial diastólica
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PBS	tampão fosfato de sódio, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPases do retículo sarcoplasmático/endoplasmático
SOD	enzima superóxido dismutase
STZ	estreptozotocina
SUR-1	receptor de sulfonilureia
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade, do inglês <i>very low density lipoprotein</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
1.1 Uma enigmática doença antiga	23
1.2 Diabetes mellitus	26
1.2.1 Diagnóstico do diabetes mellitus	27
1.2.2 Mecanismos fisiopatológicos do diabetes mellitus	29
1.3 Diabetes experimental utilizando estreptozotocina	35
1.4 Complicações do Diabetes mellitus	37
1.5 Prejuízos cardiovasculares no diabetes mellitus	40
1.5.1 Via do polióis (sorbitol)	44
1.5.2 Produtos finais de glicosilação avançada	46
1.5.3 Ativação de PKC	47
1.5.4 Via da hexosamina	49
1.5.5 Estresse oxidativo	50
1.5.6 Oxidação de ácidos graxos	51
1.5.7 Disfunção endotelial	52
1.6 Disfunção vascular no diabetes mellitus	54
1.7 Um cátion, múltiplas funções	58
1.8 Um olhar para o periférico	61
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
2.1 Objetivo geral	63
2.2. Objetivos específicos	63
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>65</b>
3.1 Animais	65
3.2 Drogas e reagentes	65
3.3 Procedimentos experimentais	66
3.3.1 Indução do diabetes químico	66
3.3.2 Medida direta da pressão arterial em animal anestesiado	67
3.3.3 Perfusão do leito vascular da musculatura esquelética	69
3.4 Protocolos experimentais	71
3.4.1 Caracterização do diabetes químico	71
3.4.2 Avaliação da função vascular sistêmica	73
3.4.3 Avaliação do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas	74
3.5 Análise estatística	75
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>77</b>
4.1 Caracterização do diabetes químico em ratas	77
4.1.1 STZ proporciona perda no ganho de peso corpóreo	77
4.1.2 STZ induz um estado hiperglicêmico crônico em ratas	77
4.1.3 STZ provoca polifagia e polidipsia em ratas	78
4.1.4 STZ ocasiona poliúria em ratas	79
4.2 Prejuízos vasculares sistêmicos decorrentes do diabetes	80
4.2.1 Diabetes ocasiona hiporresponsividade vascular aos agentes vasoconstritores	84
4.2.2 Diabetes ocasiona hiporresponsividade vascular via receptores $\beta$ -adrenérgicos	95
4.2.3 Diabetes induz prejuízo vascular dependente do endotélio	101
4.2.4 Diabetes induz prejuízo vascular independente do endotélio	107
4.3 Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas controle e diabéticas	112
4.3.1 Reatividade aos agentes vasoconstritores	113
4.3.2 Reatividade aos agentes vasodilatadores	115
4.3.3 Mobilização e captação de cálcio no leito vascular da musculatura esquelética	118

4.3.4 Participação das EROs na resposta do leito vascular da musculatura esquelética aos agentes vasopressores frente ao contexto hiperglicêmico.....	121
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>123</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>141</b>
6.1 Sumário de resultados .....	141
6.2 Conclusão.....	142
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>143</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>171</b>
APÊNDICE A – Padronização da Perfusão da Perna Isolada .....	173
APÊNDICE B – Registro de experimentos e seus respectivos protocolos experimentais .....	193
APÊNDICE C – Avaliação de possível interferência do DMSO no efeito obtido com a perfusão com apocinina nas preparações de pernas isoladas .....	197

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Uma enigmática doença antiga

A primeira referência ao diabetes é atribuída ao Papiro de Ebers, confeccionado em torno de 1500 a.C. (EBBELL, 1937, p. 62). E, enquanto no oriente essa doença foi denominada de *madhumeha*, devido à urina doce de seus portadores que era capaz de atrair formigas e moscas (LAKHTAKIA, 2013), no ocidente ela recebeu o nome de diabetes, fazendo referência ao copioso volume de urina expelido, termo atribuído por Apolônio de Memphis em 250 a.C. (DAS; SHAH, 2011).

Entre 400 e 500 a.C., na Índia, Sushruta e Charaka já haviam notado a existência de duas variantes da doença que tornava doce a urina de seus acometidos. Uma variante era comumente observada durante a infância ou adolescência, enquanto a outra somente aparecia em adultos (LAKHTAKIA, 2013). Em todos dois casos, com o total desconhecimento da causa da doença o que deixava a medicina sem nenhuma opção de tratamento, os pacientes não resistiam e logo morriam. Aqueles que a apresentavam durante a infância vinham a óbito tão logo os sintomas apareciam, e os que eram acometidos somente na fase adulta tinham uma sobrevivência maior, porém morriam em decorrência das diversas complicações que surgiam devido à doença (MACCRACKEN; HOEL, 1997).

A primeira descrição da doença foi realizada por Areteu da Capadócia (150 d.C.) e trazia seus principais sintomas. Na época chegou-se a um consenso de que a carne dos acometidos pela doença “derretia” e era eliminada através da urina, que não cessava sua produção, o que conferia a perda de peso excessiva apresentada pelos pacientes. E uma vez que o “derretimento” não cessava, observado pela alta produção de urina, a morte era iminente. Frente ao que se acreditava à época, em 164 d.C. na Grécia Antiga, Galeno atribuiu a causa da doença ao rim denominando-a de “diarreia da urina” (ANTHONY, 2002; KING; RUBIN, 2003).

Por séculos o diabetes permaneceu como uma doença renal devido ao enorme prestígio de Galeno na área da medicina. Todavia, com o passar do tempo, diversas perguntas que ficaram sem a devida resposta e novas observações da doença, passaram a reacender o questionamento da origem do diabetes, uma vez que as informações disponíveis não permitiam a obtenção de um tratamento eficaz para a doença, muito menos a cura. Assim, na Pérsia por volta de 1020 d.C., Avicena (Ibn Sina) em sua enciclopédia “*The Canon of Medicine*” já trazia relatos de diabéticos que embora apresentassem copioso volume urinário,

não atraía formigas como era costume ocorrer. Além disso, ele também observava, entre os diabéticos, gangrenas e até mesmo impotência sexual, o que fez com que ele afirmasse que o diabetes era uma doença independente que apenas teria conexão com os rins; assim como, também teria conexão com o fígado e a certa poluição dos líquidos corpóreos internos. Todavia, tudo isso apenas no campo teórico (KARAMANOU et al., 2016; SHAROFOVA et al., 2017).

O primeiro a se distanciar dos pensamentos galênicos no campo experimental foi Paracelsus atribuindo um papel secundário ao rim. Isso porque em seus experimentos, ao evaporar a urina de um paciente diabético, passou a obter um sólido de cor branca, o qual ele interpretou como sendo sal e considerou que este se acumulava no rim (SCHADEWALDT, 1989, p. 201). Dessa forma, o rim passava de órgão central para órgão secundário que era prejudicado por uma doença generalizada (KING; RUBIN, 2003).

Com esses achados de Paracelsus, as pesquisas sobre o diabetes ganharam um novo fôlego. Por exemplo, em 1674, Thomas Willis repetiu os experimentos de Paracelsus e ao provar o sólido branco encontrado descobriu que o mesmo tinha um gosto doce, descrevendo da seguinte maneira: “*Quasi melle aut saccharo imbuta*”, isto é, quase como se a urina tivesse sido permeada por mel ou por açúcar. Thomas Willis passou então a afirmar que o problema do diabetes estaria no sangue, acreditava que o quilo não era totalmente digerido e assim se acumularia no sangue dos diabéticos, o foco deveria sair do rim e ser considerado o percurso estômago-trato gastrointestinal-sangue (EKNOYAN; NAGY, 2005).

Baseado nas afirmações de Willis, em 1769, William Cullen adicionou o termo *mellitus* ao diabetes, como forma de distinguir de uma variante onde ele observou que a urina dos diabéticos era insípida ao paladar (EKNOYAN, 2010; WILLIS, 1680). Matthew Dobson descobriu que o soro do sangue dos diabéticos também possuía um gosto doce, assim como já era sabido para a urina, descrevendo a hiperglicemia e comprovando a glicosúria desses pacientes (DOBSON, 1776). John Rollo já passou a atribuir o problema do diabetes ao estômago por observar que, dependendo da alimentação, a quantidade de açúcar expelida na urina variava (ROLLO, 1797; ROLLO, 1798).

Michel Eugène Chevreul, em 1815, achou similaridade dos cristais obtidos com a evaporação da urina dos diabéticos aos encontrados com a evaporação de xarope de uva (CHEVREUL, 1815), cristais estes que em 1838 foram identificados por Eugène-Melchior Peligot, comprovando assim que o açúcar presente na urina era a glicose (PELIGOT, 1838).

Naquela época não se admitia que mamíferos pudessem ter açúcar presente no sangue em condições fisiológicas: “...*on admettait que le règne végétal avait seul le pouvoir de créer*

*les principes immédiats que le règne animal doit détruire.*” (BERNARD, 1865, p. 230). Todavia, Claude Bernard conseguiu, em uma série de experimentos, provar que em condições fisiológicas o fígado era capaz de formar açúcar e distribuí-lo aos tecidos por meio do sangue, descobrindo e isolando o glicogênio. Passou a afirmar que o açúcar proveniente do fígado seria o mesmo encontrado no paciente diabético em concentrações superiores às fisiológicas, trazendo o fígado como possível órgão sede do diabetes (BERNARD, 1848; BERNARD, 1855; BERNARD, 1857).

Contudo, a descoberta do órgão-sede do diabetes só ocorreu com a junção de vários achados, que vão desde:

1) Bouchardat (1875), discorda do papel central do fígado no diabetes, uma vez que a anatomia patológica de fígados provenientes de diabéticos derrubava “*la théorie hépatique du diabete*”. Notou que a prática forçada de exercícios, associada à dieta restritiva, melhorava a glicosúria e também atribuiu uma origem pancreática à forma mais grave do diabetes;

2) Cawley (1788, p. 289), já havia relatado alguns casos de pâncreas atrofiado e fibrótico em autópsias de diabéticos e Lancereaux (1880a), também encontrava tais achados patológicos ao realizar autópsias em pâncreas de diabéticos. Lancereaux (1880b), então introduziu os termos *diabète gras* e *diabète maigre*; e, a este último, passou a atribuir uma causa pancreática;

3) Mering e Minkowski (1890) discordavam do papel das enzimas pancreáticas na digestão da gordura e resolveram realizar experimentos utilizando cães pancreatectomizados, foi quando verificaram que estes passavam a apresentar sintomas típicos do diabetes: poliúria e polidipsia. Cabe ressaltar que anteriormente Brunner (1683) já havia feito o mesmo, porém não havia associado os sintomas ao diabetes como Mering e Minkowski o fizeram;

4) Minkowski (1893), passou então a estudar tal descoberta e conseguiu demonstrar que o pâncreas também atuava como glândula de secreção interna. Laguesse (1893), conseguiu associar a recente descoberta de Minkowski com os achados de Langerhans (1869), e atribuiu essa função de secreção às ilhotas pancreáticas descobertas por Langerhans; e

5) Meyer (1909, p. 96), atribuiu o nome de insulina ao produto da secreção interna do pâncreas e Sharpey-Schäfer (1916, p. 128), também atribuiu o mesmo nome ao hormônio, ambos teoricamente. Contudo, após vários pesquisadores conduzirem experimentos que utilizavam diversas formas de extrato pancreático para reverter o diabetes, e até mesmo o coma diabético (para breve revisão ver: BANTING et al., 1922a), foi somente em 1922 que Banting e Best descobriram de fato a insulina, sob a orientação de MacLeod. E com o auxílio de Collip conseguiram purificá-la (BANTING et al., 1922b). Sendo então entregue o Prêmio

Nobel de Fisiologia e Medicina de 1923 a Banting e MacLeod pela descoberta da insulina (THE NOBEL PRIZE, 1925).

Restando comprovado o pâncreas como órgão sede do diabetes mellitus tipo 1 e o papel central da insulina no seu tratamento, as pesquisas começaram a focar mais nos mecanismos envolvidos, o que nos possibilitou todo o vasto conhecimento que temos atualmente acerca dos diferentes tipos de diabetes e as suas complicações decorrentes<sup>1</sup>, conforme veremos um pouco mais nos próximos tópicos.

## 1.2 Diabetes mellitus

Atualmente, o termo diabetes é utilizado para descrever um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados e identificados pela presença de hiperglicemia na ausência de tratamento. É uma síndrome de etiologia múltipla, mas sua etiopatologia heterogênea inclui defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ainda ambas, e distúrbios do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (WHO, 2019).

Na classificação atualmente adotada para o diabetes estão incorporados os estágios clínicos dessa enfermidade, os quais transitam da normalidade, pela tolerância à glicose diminuída, até chegar ao diabetes mellitus de fato. Segundo a *American Diabetes Association* (2020), o diabetes pode ser classificado em quatro categorias gerais: 1) Diabetes mellitus tipo 1, ocorre devido à destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas, o que geralmente conduz à uma deficiência quase absoluta de insulina; 2) Diabetes mellitus tipo 2, ocorre devido à perda progressiva da adequada secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, que acontece frequentemente no contexto da resistência à ação da insulina; 3) Diabetes mellitus gestacional, ocorre quando o diabetes é diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, não tendo sido evidenciado antes da gestação; e 4) Tipos específicos de diabetes devido a outras causas, como por exemplo, formas monogênicas do diabetes, doenças do pâncreas exócrino e diabetes induzido por drogas ou produtos químicos.

O diabetes faz parte do grupo de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), figurando como a sexta causa de morte no mundo quando analisado somente as DCNT, e sétima causa de morte no geral. Em 2016 foi responsável pela morte de 1,6 milhões de

---

<sup>1</sup> Autores afirmam que, com o advento da insulina no tratamento do diabetes mellitus tipo 1, os portadores, que antes faleciam aos oito anos, poderiam ter expectativa de vida de 30 anos; porém isso seria o suficiente apenas para desenvolver cegueira, insuficiência renal e doença coronariana (BROWNLEE, 2005). Por isso, os estudos na área continuam sendo importantes, no sentido de cada vez mais conhecer os mecanismos por trás da doença e das suas complicações decorrentes.



peessoas (WHO, 2018). Estimativas apontaram que em 2017, nos Estados Unidos, o custo anual com os casos de diabetes diagnosticado (~7,6% da população e 9,7% da população adulta) foi em torno de 327 bilhões de dólares (ADA, 2018).

Atualmente, há cerca de 463 milhões de adultos (entre 20 e 79 anos) vivendo com diabetes, o que corresponde a 9,3% da população mundial para a faixa etária considerada. Estudos sugerem que esse número aumente para 578 milhões em 2030 e para 700 milhões em 2045, representando um incremento no número de acometidos de 10,2% e 10,9%, respectivamente. Também é notório que, atualmente, a maior parte dos acometidos vive em países de baixa e média renda, algo em torno de 80% (IDF, 2019).

O estudo realizado por Marinho et al. (2018), utilizando os resultados do *Global Burden of Disease Study 2016* (GBD 2016) referentes ao Brasil, demonstrou que, dentre as 25 principais causas gerais de anos de vida perdidos e de anos vividos com incapacidade, o diabetes passou da 15ª posição nas duas categorias, em 1990, para a 7ª causa geral de anos de vida perdidos e 11ª causa de anos vividos com incapacidade em 2016 na população brasileira.

O Brasil ocupou a quinta posição entre os países com o maior número de adultos com diabetes em 2019 com 16,8 milhões (IC95% 15,0-18,7) de diabéticos, devendo permanecer na mesma posição até 2045 com 26 milhões (IC95% 23,2-28,7) de diabéticos. Com relação às pessoas com mais de 65 anos, o Brasil também ocupa a quinta posição em número de casos (6,1 milhões; IC95% 5,5-6,9), porém deve subir para a quarta posição (14,9 milhões; IC95% 13,4-17,0) em 2045 (IDF, 2019).

Dados divulgados pelo Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Vigilância em Saúde e da Coordenação Geral de Informações e Análises Epidemiológicas, através do Sistema de Informações sobre Mortalidade, revelam que dos 1.316.719 óbitos registrados no Brasil no ano de 2018, 65.113 (4,9% do total) tiveram como causa CID-BR-10 o diabetes mellitus. Sendo que, para esta causa de morte, as mais acometidas no ano foram as mulheres com 53,8% (BRASIL, 2020). O estudo de Malta et al. (2019), também aponta uma maior prevalência do diabetes entre o sexo feminino no Brasil.

### 1.2.1 Diagnóstico do diabetes mellitus

A suspeita de diabetes pode ocorrer sempre que detectada a presença dos sinais e sintomas característicos, que incluem a poliúria, a polidipsia, a polifagia e uma inexplicável perda de peso (WHO, 2019), mas também podem ser constatados sintomas mais vagos, tais como fadiga, letargia, prurido vulvar ou cutâneo, balanopostite e visão turva. A tríade clássica

e a perda de peso são comuns e bastante frequentes no diabetes mellitus tipo 1, mas não raramente também podem ser observados no diabetes mellitus tipo 2. Isso ocorre porque no diabetes do tipo 2 a maioria dos acometidos não apresentam sintomas e a suspeita só ocorre quando detectada alguma complicação tardia, tais como proteinúria, neuropatia periférica, infecções de repetição e retinopatia (BRASIL, 2013).

Por sua vez, o diagnóstico é baseado na detecção de níveis elevados de glicose na corrente sanguínea dos pacientes. Dessa forma, o critério adotado para o diagnóstico do diabetes, segundo a ADA (2020), pode ser um dos seguintes: 1) uma glicose plasmática em jejum  $\geq 126$  mg/dL (7 mmol/L), mensurada após um período de jejum em que não houve nenhuma ingesta calórica por pelo menos 8 h; 2) uma glicemia depois de duas horas  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) durante um Teste oral de tolerância à glicose com a ingesta de uma carga de glicose anidra (75 g) dissolvida em água; 3) uma hemoglobina glicada (A1C)  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol); e 4) uma glicose plasmática aleatória  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica.

A Tabela 1 contém um resumo dos testes que podem ser utilizados para o diagnóstico do diabetes, de acordo com o contexto diagnóstico.

**Tabela 1 – Testes utilizados para o diagnóstico do diabetes e valores de referência adotados em cada caso.**

Teste utilizado para diagnóstico do diabetes	Valores encontrados
Teste de glicemia em jejum	$\geq 126$ mg/dL
Teste oral de tolerância à glicose	$\geq 200$ mg/dL
Teste de hemoglobina glicada (A1C)	$\geq 6,5\%$
Teste de glicemia aleatória quando na presença de sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica	$\geq 200$ mg/dL

Fonte: Associação Americana de Diabetes, 2020.

Ressalta-se que na ausência de uma inequívoca hiperglicemia, o diagnóstico para diabetes irá requerer dois resultados anormais de testes separados, podendo ser da mesma amostra ou então em duas amostras distintas (ADA, 2020).

Como o diabetes mellitus pode permanecer assintomático por muito tempo, é de suma importância a pesquisa da presença de fatores de risco, tais como a obesidade, sedentarismo e uma dieta pouco saudável, para que haja um diagnóstico o mais breve possível, sendo assim, recomendado o rastreio populacional (BRASIL, 2013), a fim de detectar tanto aqueles portadores que ainda não foram diagnosticados (ADA, 2020; BRASIL, 2013; HERMAN et al., 2015), quanto aqueles que apresentam uma tolerância à glicose diminuída (ADA, 2020; GONG et al., 2019), que é uma condição pré-diabetes mellitus do tipo 2, onde o indivíduo

apresenta valores glicêmicos entre 100-125 mg/dL num teste de glicemia em jejum, ou 140-199 mg/dL num teste oral de tolerância à glicose, ou ainda 5,7-6,4 % num teste de hemoglobina glicada (ADA, 2020; ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

Os principais critérios utilizados para a realização do rastreamento do diabetes mellitus entre adultos assintomáticos incluem o excesso de peso ( $IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$ ) associado a um ou mais fatores de risco, um diagnóstico anterior de pré-diabetes ou diabetes gestacional e idade igual ou superior a 45 anos, conforme pode ser observado na Tabela 2, onde são apresentados os principais critérios para a realização do rastreamento do diabetes mellitus em adultos assintomáticos (ADA, 2020).

**Tabela 2 – Critérios para o rastreamento do DM em adultos assintomáticos.**

**1. Independentemente da idade, aqueles que apresentem excesso de peso ( $IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$ ) e um ou mais fatores de risco, a seguir apresentados:**

- História de pai ou mãe com diabetes;
- Alto risco racial ou étnico (afro-americano, latino, nativo americano, asiático-americano, etc.);
- História de doença cardiovascular;
- Hipertensão arterial ( $\geq 140/90 \text{ mmHg}$  ou em uso de anti-hipertensivos);
- História de diabetes gestacional ou de recém-nascido com mais de 4 Kg;
- Dislipidemia: hipertrigliceridemia ( $> 250 \text{ mg/dL}$ ) ou HDL-C baixo ( $< 35 \text{ mg/dL}$ );
- Exame prévio de HbA1c  $\geq 5,7\%$ , tolerância diminuída à glicose ou glicemia de jejum alterada;
- Mulheres com síndrome de ovários policísticos;
- Inatividade física; e
- Outras condições clínicas associadas com a diminuição da sensibilidade à insulina (obesidade severa, *acanthosis nigricans*).

**2. Pacientes com pré-diabetes devem ser testados anualmente.**

**3. Mulheres que foram diagnosticadas com diabetes mellitus gestacional devem fazer o teste ao longo da vida pelo menos a cada 3 anos.**

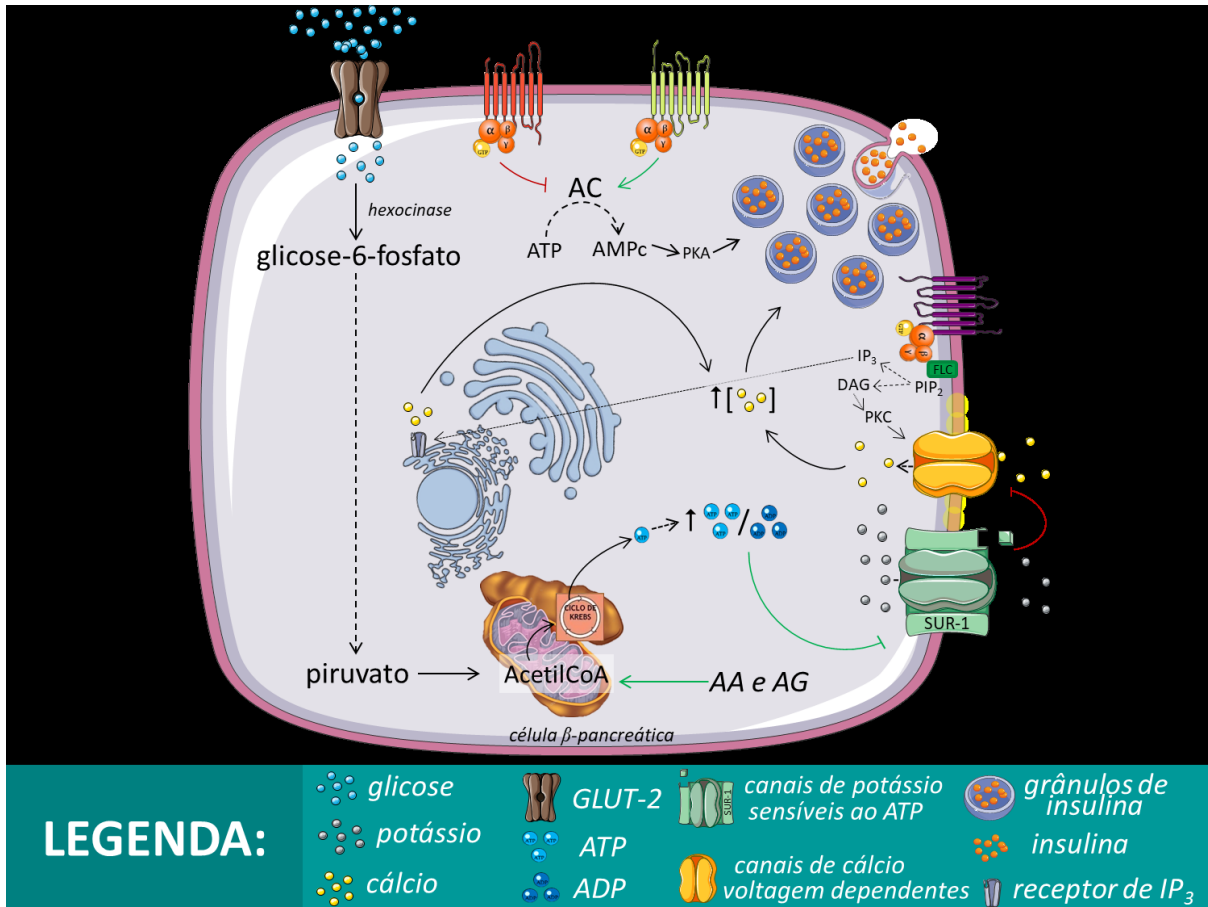
**4. Para todos os demais adultos, o rastreamento deve começar a ser feito a partir dos 45 anos.**

**5. Se os resultados forem normais, o teste deve ser repetido em intervalos mínimos de 3 anos, considerando que uma menor frequência de testes pode ser requerida dependendo dos resultados obtidos e do nível de risco apresentado.**

Fonte: Associação Americana de Diabetes (2020) e BRASIL (2013).

### 1.2.2 Mecanismos fisiopatológicos do diabetes mellitus

Fisiologicamente, o aumento da concentração plasmática de glicose estimula, no pâncreas, as células  $\beta$ -pancreáticas a secretarem os seus grânulos de insulina e também a promoverem a síntese do hormônio, conforme Figura 1. Há ainda uma secreção basal de insulina em resposta à glicose proveniente do fígado, dessa forma a insulina mantém a glicemia dentro de uma faixa considerada normal, com valores entre aproximadamente 80 a 90 mg/dL, por processos que favorecem a interiorização da glicose nas células musculares gerando energia através da glicólise, além de diversos outros efeitos desempenhados pelo hormônio (NISWENDER, 2011).



**Figura 1 – Regulação fisiológica da liberação de insulina nas células  $\beta$ -pancreáticas pelo aumento na concentração de glicose plasmática e outros fatores.**

O aumento na concentração plasmática de glicose é percebido pelas células  $\beta$ -pancreáticas, que a internalizam através do transportador de glicose (GLUT-2). Uma vez dentro da célula, a glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) sofre o processo de glicólise dando origem a duas moléculas de piruvato ( $C_3H_4O_3$ ). O piruvato segue para a mitocôndria onde é transformado no grupo acetil que posteriormente se une à coenzima A, originando a AcetilCoA. A AcetilCoA segue para o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa gerando ATP como produto da reação. O aumento na concentração de ATP, faz com que haja um aumento na proporção ATP/ADP e isso faz com que os canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) sejam ativados. Uma vez ativados, os canais de  $K_{ATP}$  se fecham, impedindo o efluxo dos íons potássio e ocasionando a despolarização da membrana celular. A despolarização da membrana ocasionada ativa os canais de cálcio dependentes voltagem promovendo o influxo e, conseqüente, aumento na concentração intracelular de cálcio. A elevação nos níveis intracelulares de cálcio promove a excitação dos grânulos de insulina, promovendo a liberação do hormônio para a corrente sanguínea. Aminoácidos (AA) e ácidos graxos (AG) também podem favorecer a liberação de insulina nas células  $\beta$ -pancreáticas, atuando via ciclo de Krebs. De modo semelhante, a ativação parassimpática também favorece a secreção de insulina; nesta, a acetilcolina interage com seus receptores muscarínicos ( $M_3$ ) ativando-os. A subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_q$ , agora ligada a uma molécula de GTP, ativa a enzima fosfolipase C ( $FLC\beta$ ), a qual hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) dando origem ao diacilglicerol (DAG) e ao inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ). O  $IP_3$  irá se ligar aos receptores de  $IP_3$  no retículo endoplasmático, culminando na liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Tanto o aumento intracelular de cálcio quanto o DAG amplificam o sinal ativando a proteína cinase C (PKC), esta, por sua vez, passará a fosforilar canais de cálcio dependentes voltagem, favorecendo mais entrada de cálcio, e o aumento na concentração intracelular de cálcio favorece a liberação e a síntese da insulina. A PKC também pode ativar a adenilato ciclase (AC; evento não apresentado na imagem) desencadeando toda a via a jusante. A estimulação das células endócrinas presentes no intestino delgado pela glicose presente na alimentação é capaz de promover a secreção de incretinas, dentre essas temos o GLP-1 (peptídeo semelhante a glucagon 1) que no pâncreas se liga aos seus receptores (GLP-1r), que são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G. A subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_s$  ligada a uma molécula de GTP ativa a enzima AC que catalisa a conversão de ATP em AMP cíclico (AMPc). O aumento na concentração intracelular de AMP ativa a proteína cinase dependente de AMP (PKA), esta por sua vez irá fosforilar canais de cálcio promovendo o aumento do cálcio intracelular (evento não mostrado) favorecendo a secreção e síntese de insulina. Também, sabe-se que o GLP-1 ao atingir a circulação

porta hepática pode estimular aferências vagais presentes no órgão aumentando a atividade eferente vagal no pâncreas. Por fim, a ativação simpática consegue inibir a liberação e síntese de insulina ao estimular os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha_{A2}$ ) presentes nas células  $\beta$ -pancreáticas. Esses também são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G. A subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_i$  ligada a uma molécula de GTP inibe a enzima AC impedindo que ela catalise a conversão de ATP em AMPc, interrompendo a via a jusante. Imagens: Google Imagens<sup>®</sup> e *Servier Medical Art*. Fonte: O autor.

Quando em excesso, a glicose passa a ser estocada através do processo de glicogênese nos músculos e no fígado, dando origem ao glicogênio (NISWENDER, 2011). Ainda podemos observar o processo de lipogênese, que ocorre, por exemplo, quando temos uma dieta rica em carboidratos, onde o excesso é transformado em ácidos graxos utilizando a Acetil-CoA, proveniente do piruvato gerado na glicólise que entrou no ciclo de Krebs. Devido ao aumento nos níveis de ATP, o ciclo de Krebs é interrompido e a Acetil-CoA é condensada com o oxaloacetato dando origem ao citrato. A partir do citrato, fora da mitocôndria, o fígado passa a sintetizar ácidos graxos e a liberar lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*) na corrente sanguínea, as quais serão estocadas em forma de triacilglicerol no tecido adiposo branco (HAN et al., 2016).

A insulina desempenha seu papel ao se ligar aos receptores de insulina, que são receptores transmembrana do tipo tirosina cinase, presentes em diversos tecidos e órgãos, como por exemplo, nas células da musculatura esquelética e nos adipócitos, o que culmina numa cascata intracelular de segundos mensageiros que ao final favorecem a captação de glicose. Assim, no músculo esquelético a insulina estimula a translocação de GLUT-4 para a membrana celular, o que favorece a entrada da molécula de glicose para o interior dessas células para ser oxidada no processo de glicólise e formação de ATP (JENSEN; MEYTS, 2009; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006; THEVIS; THOMAS; SCHÄNZER, 2010).

A ocorrência do diabetes do tipo 1 é associada com processos autoimunes, onde o próprio sistema imunológico do paciente passa a destruir suas próprias células  $\beta$ -pancreáticas, prejudicando assim a produção e consequente liberação de insulina, o que resulta em hiperglicemia. Representa 5 a 10% dos casos de diabetes e sua ocorrência é principalmente entre crianças e adolescentes, mas podendo ocorrer também entre adultos, embora nesta última fase não seja muito comum (ADA, 2020; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2018). Uma liberação aumentada de glucagon, hormônio contrarregulador, pelas células  $\alpha$ -pancreáticas devido a falta do efeito inibitório exercido pela insulina também contribui para a manutenção da hiperglicemia

observada, tanto devido ao processo de gliconeogênese como ao processo de glicogenólise, estimulados pelo glucagon no fígado (KULINA; RAYFIELD, 2016).

Embora seja aceito que o diabetes tipo 1 seja uma condição autoimune, outras hipóteses também são consideradas para a ocorrência do diabetes tipo 1 e estudos tem buscado compreender melhor a associação delas com a ocorrência da doença. Dentre essas hipóteses podemos citar as infecções virais por enterovírus (DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2018) e defeitos funcionais no sistema imunológico, nas células  $\beta$ -pancreáticas, na medula óssea e no timo que, de forma coletiva, podem contribuir para o surgimento da doença (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Por sua vez, o diabetes tipo 2 é um dos mais comuns distúrbios metabólicos, onde, diferentemente do tipo 1, o pâncreas ainda é capaz de secretar insulina; contudo, observa-se uma diminuição de sensibilidade das células-alvo ao hormônio secretado, prejudicando assim a captação da glicose pelas células e uma constante hiperglicemia pode ser observada. Além disso, essa diminuição da sensibilidade à insulina e a hiperglicemia resultante conduzem a uma inadequada secreção de insulina compensatória (GALICIA-GARCIA et al., 2020).

Fatores ambientais e genéticos estão implicados no surgimento do diabetes tipo 2, muito embora os fatores genéticos não sejam tão determinantes, uma vez que só exercem tal função quando os fatores ambientais estão presentes. Como, por exemplo, a exposição a um ambiente obesogênico, isto é, quando o indivíduo apresenta comportamento sedentário aliado ao consumo excessivo de açúcar e gordura, os fatores genéticos possuem maiores efeitos (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017). E, esse ambiente obesogênico não é muito difícil de ocorrer nos dias atuais onde o avanço tecnológico favoreceu o sedentarismo na sociedade, impulsionando o aumento em novos casos de doenças crônicas, como o diabetes (BULL; BAUMAN, 2011; ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

Dessa forma, o diabetes tipo 2 está mais associado ao estilo de vida (sedentarismo e obesidade abdominal), apresentando assim fatores de risco modificáveis (obesidade, baixa atividade física e uma dieta pouco saudável). Representa cerca de 90 a 95% dos casos e ocorre mais comumente em adultos (ADA, 2020; GALICIA-GARCIA et al., 2020). Geralmente, quando diagnosticado os pacientes já apresentam uma perda de até 50% das células  $\beta$ -pancreáticas. Contudo, quando esse tipo de diabetes ocorre em pacientes jovens (entre 10 a 17 anos de idade) a perda das células  $\beta$ -pancreáticas observada é mais rápida (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017).

As principais características do diabetes tipo 2 incluem diminuição da sensibilidade à ação da insulina, hiperinsulinemia e falência gradual das células  $\beta$ -pancreáticas

(CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017). Tudo isso é explicado pelo fato de que, nesse contexto de hiperglicemia instaurado, as células  $\beta$ -pancreáticas não só continuam a secretar insulina, como propende a aumentar a secreção do hormônio para tentar obter e manter uma normoglicemia, uma vez que os níveis circulantes de glicose continuam altos, o que propicia um ambiente hiperinsulinêmico (REAVEN, 1988).

Nesse contexto, frente à alta concentração de glicose na corrente sanguínea, que estimula o fator de transcrição ChREBP (proteína de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos), e também à hiperinsulinemia que se instaura, estimulando o fator de transcrição SREBP-1c (proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol), o processo de lipogênese é super estimulado no fígado, aumentando a produção de ácidos graxos livres. Ocorre também acúmulo de triglicerídeos hepáticos, uma vez que a obesidade e a diminuição da sensibilidade à ação da insulina pelos adipócitos resultam em um aumento da liberação de ácidos graxos livres (BROWNING; HORTON, 2004).

Além disso, com o passar do tempo (anos) e com a evolução natural da doença, a supereficiência evocada nas células  $\beta$ -pancreáticas pode ocasionar uma diminuição da massa dessas células. Quando as células  $\beta$ -pancreáticas entram em processos de apoptose, e até mesmo perda de seu fenótipo diferenciado, o paciente, além de apresentar a diminuição à ação da insulina já relatada anteriormente, passa a apresentar também um prejuízo na secreção da insulina (BENSELLAM; JONAS; LAYBUTT, 2018; CHRISTENSEN; GANNON, 2019; GALICIA-GARCIA et al., 2020; REMEDI; EMFINGER, 2016). Nessa situação o uso de insulina exógena é aconselhado para obtenção do adequado controle da hiperglicemia (BRASIL, 2013; ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

Aliado a isso, muito mais possivelmente devido à uma perda da inibição da insulina sobre as células  $\alpha$ -pancreáticas do que a falta da produção de insulina impossibilitando seu efeito inibitório nessas células, evento este que só ocorre em fases mais avançadas da doença, no diabetes tipo 2 observa-se um quadro de hiper glucagonemia, concomitante à hiperglicemia. Esse quadro é observado tanto em períodos de jejum como no pós-prandial, contribuindo para o contexto hiperglicêmico observado no diabetes, uma vez que o glucagon induz a produção hepática de glicose (HÆDERSDAL et al., 2018; KULINA; RAYFIELD, 2016).

Além do pâncreas, no desenvolvimento do diabetes tipo 2 diversos outros órgãos e tecidos também estão envolvidos, como fígado (PETERSEN et al., 2005), músculo esquelético (PETERSEN et al., 2007), tecido adiposo (PIYA; MCTERNAN; KUMAR, 2013) e o intestino delgado (PURANDARE; PHALGUNE; SHAH, 2019; RUBINO et al., 2006).

Também o efeito das incretinas, as alterações no cólon, a desregulação imunológica, os processos inflamatórios e as alterações da microbiota intestinal vêm se mostrando importantes na fisiopatologia e são estudados como potenciais alvos terapêuticos (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017).

A insulina em altas concentrações plasmáticas em portadores do diabetes também atua no núcleo arqueado do hipotálamo aumentando a ativação do sistema nervoso simpático, conseqüentemente, ativação de processos que culminarão em aumento da retenção de sódio e água elevando a pressão arterial desses pacientes. Por ser uma ativação de forma crônica, favorece o desenvolvimento da hipertensão arterial (SALVETTI et al., 1993; SILVA et al., 2020). E também contribui para a ocorrência da hipertensão o enrijecimento dos vasos sanguíneos, decorrente do efeito anabólico da insulina sobre o espessamento da parede dos vasos, o que dificulta os processos de vasorrelaxamento e vasoconstrição (CERNES; ZIMLICHMAN; SHARGORODSKY, 2008; STEHOUWER; HENRY; FERREIRA, 2008; WESTERBACKA; YKI-JÄRVINEN, 2002).

Por fim, a diminuição da sensibilidade à insulina está presente na obesidade. Na década de 80, Reaven (1988), observou que ela era o vínculo existente entre a obesidade e as outras doenças associadas à obesidade. Assim, a presença da obesidade juntamente com a diminuição da ação da insulina, intolerância à glicose, aumento na pressão sanguínea, hiperglicemia, hiperinsulinemia, aumento plasmático de VLDL e diminuição de lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoproteins*) caracterizava a presença da Síndrome X e significava um aumento no risco para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares.

Atualmente, a Síndrome X é conhecida como Síndrome metabólica e a sua presença, além dos riscos cardiovasculares, também aumenta o risco para o desenvolvimento do diabetes e da aterosclerose, sendo constatada quando três ou mais critérios são atingidos: 1) obesidade abdominal, verificada pela circunferência da cintura, nos homens > 102 cm e nas mulheres > 88 cm; 2) hipertrigliceridemia, valores  $\geq 150$  mg/dL; 3) colesterol HDL, valores < 40 mg/dL (em homens) e < 50 mg/dL (em mulheres); 4) hipertensão, valores pressóricos  $\geq 130/85$  mmHg; e 5) glicemia em jejum alterada, valores  $\geq 100$  mg/dL (HUANG, 2009; SWARUP et al., 2021).



### 1.3 Diabetes experimental utilizando estreptozotocina

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico extraído e purificado a partir de *Streptomyces achromogenes*, uma bactéria gram-positiva, que também possui ação como agente antineoplásico alquilante (HERR; JAHNKE; ARGOUEDELIS, 1967; JUNOD et al., 1967). Em 1963, Rakieten, Rakieten e Nadkarni relataram a capacidade diabetogênica da STZ ao realizarem sua administração por via intravenosa em cães e ratos. Essa capacidade é explicada pela ação citotóxica específica, rápida e irreversível que a STZ apresenta sobre as células  $\beta$ -pancreáticas (JUNOD et al., 1967). Isso a tornou um dos principais compostos utilizados para a indução de diabetes experimental em roedores (SZKUDELSKI, 2001).

STZ é uma glicosamina-nitrosureia que possui estrutura química semelhante à glicose (SZKUDELSKI, 2001), que teve a sua estrutura química elucidada por Herr, Jahnke e Argoudelis, (1967). Conforme pode ser observado na Figura 2, há uma substituição do C2 da molécula 2-deoxy-D-glucose por um grupamento N-methyl-N-nitrosourea (BOLZÁN; BIANCHI, 2002). Devido a essa semelhança com a molécula de glicose, a STZ consegue facilmente ser captada pelas células  $\beta$ -pancreáticas através de GLUT-2 expressos nessas células (SZKUDELSKI, 2001).

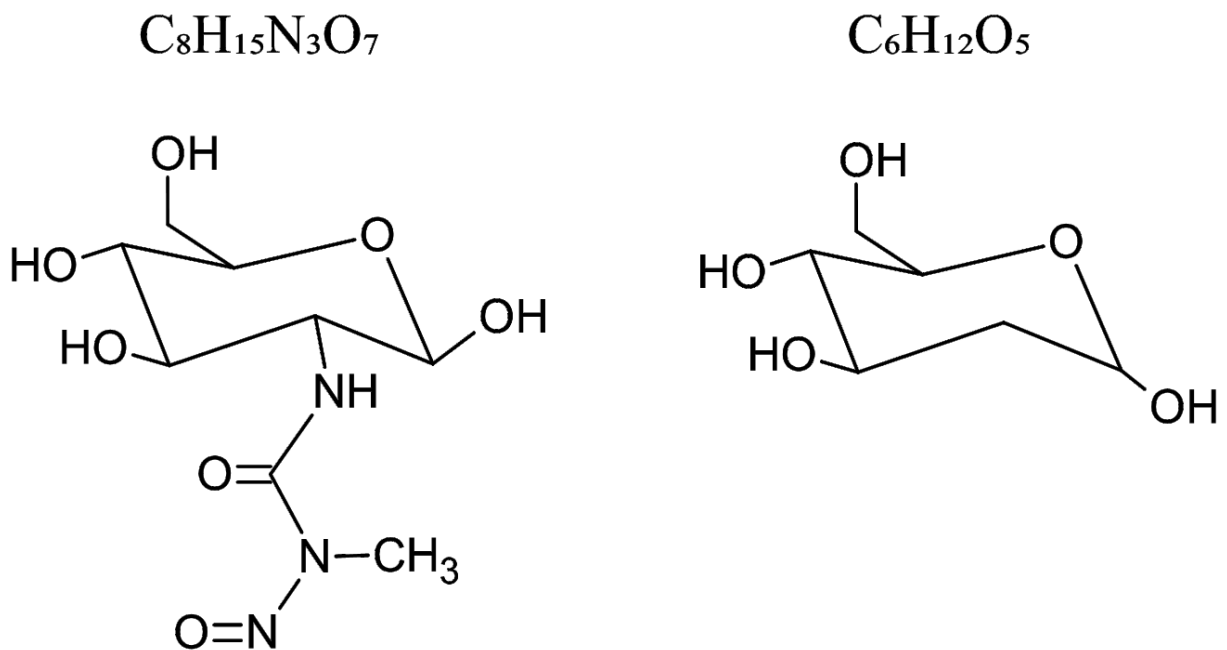


Figura 2 – Estrutura química e fórmula molecular da 2-Deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose ( $C_8H_{15}N_3O_7$ ) e da 2-Deoxy-D-glucose ( $C_6H_{12}O_5$ ). Fonte: O autor, a partir de dados disponíveis em <https://www.merckmillipore.com/>, Merck KGaA<sup>®</sup> (2021).

Uma vez dentro das células  $\beta$ -pancreáticas a STZ exerce sua ação citotóxica, além da geração de radicais livres, por promover a alquilação do DNA celular juntamente com a ativação da enzima nuclear Poli (ADP-ribose) polimerase, essas ações são responsáveis por depletar o NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) nessas células, isso ocasiona a redução dos níveis de ATP e, finalmente, acaba por inibir tanto a síntese como a secreção de insulina (BENNETT; PEGG, 1981; BOLZÁN; BIANCHI, 2002).

A severidade do diabetes induzido pela STZ é melhor observada através da análise do conteúdo de insulina pancreática por técnicas de radioimunoensaio, contudo, por ser de mais fácil acesso e mais econômico, é comum utilizar os valores glicêmicos para constatar a indução do diabetes nos animais após a administração de STZ. É possível observar hipoglicemia e hiperinsulinemia nos animais 7 h após a administração da STZ. Somente 24h após a administração os valores glicêmicos se elevam consideravelmente, momento em que se observa uma irreversível redução do conteúdo de insulina pancreática (perda de mais de 95%), a qual não retorna mais aos valores basais, pré-administração de STZ. Por sua vez, quando comparado com a hiperglicemia observada 24 h após a administração de STZ, observa-se uma leve flutuação nos valores glicêmicos, sem contudo os animais deixarem de ser hiperglicêmicos, há uma leve queda 7 dias após o tratamento, mas no 28º dia retorna a valores próximos aos observados no tempo 24 h (JUNOD et al., 1967).

Além da obtenção de um diabetes semelhante ao diabetes mellitus do tipo 1 (JUNOD et al., 1967), a administração de STZ também pode ser utilizada para mimetizar um estado semelhante ao que ocorre no diabetes mellitus do tipo 2, seja pela administração de STZ em ratos neonatos (ver BAIG; PANCHAL, 2020), seja pela sua administração múltipla em roedores em baixas doses, associado à dieta rica em gorduras (ANSARI; GOPALAKRISHNAN; KURIAN, 2019; NATH; GHOSH; CHOUDHURY, 2017).

Ainda diversos outros meios podem ser utilizados para a obtenção de um diabetes experimental, tais como a utilização da aloxana, que também é um análogo tóxico da glicose, e que teve em 1943 reportada pela primeira vez a sua capacidade diabetogênica (DUNN; MCLETTCHIE, 1943); sendo comumente utilizada para a obtenção de um diabetes semelhante ao diabetes mellitus do tipo 2 (ALTAN et al., 1994; SRINIVAS, 2014). Há ainda alguns autores que demonstraram que a administração intraperitoneal de glutamato monossódico em ratos da linhagem SHR neonatos também é capaz de desenvolver nestes, quando na fase adulta, um estado de diabetes semelhante ao diabetes mellitus do tipo 2 associado com a manifestação de síndrome metabólica (IWASE et al., 1998).

Também podem ser utilizados modelos animais de diabetes experimental baseados na programação fetal, onde intervenções durante a gestação induz nos fetos o desenvolvimento de sintomas similares ao diabetes, quando estes alcançam a fase adulta (SIMMONS; TEMPLETON; GERTZ, 2001). Outros meios de obtenção de diabetes experimental em animais incluem o uso de modelos genéticos, que podem mimetizar tanto o diabetes mellitus do tipo 1 quanto do tipo 2 (AL-AWAR et al., 2016), ou mesmo modelos que se baseiam na dieta utilizada, isto é, oferecendo aos animais dietas com elevados teores de carboidratos e/ou gorduras, que mimetizam hábitos alimentares não saudáveis (HEYDEMANN, 2016).

#### **1.4 Complicações do Diabetes mellitus**

Os sintomas característicos do diabetes incluem a poliúria, a polidipsia, a polifagia e a perda de peso. Como manifestações clínicas agudas mais graves estão a cetoacidose diabética e o estado hiperglicêmico hiperosmolar, que podem levar à desidratação, ao coma e, quando não adotada as medidas de tratamento adequadas, à morte (WHO, 2019). A outra complicação aguda do diabetes é a hipoglicemia (glicose sanguínea < 60 mg/dL), a qual pode chegar a um quadro de hipoglicemia severa (glicose sanguínea < 40 mg/dL). O quadro de hipoglicemia é decorrente do tratamento contínuo da hiperglicemia e está associado a um aumento de duas a três vezes na mortalidade. A hipoglicemia ocorre aproximadamente em 30 a 40% dos pacientes com diabetes tipo 1 e em aproximadamente 10 a 30% dos pacientes com diabetes tipo 2 que utilizam insulina exógena para o tratamento do diabetes (FRIER, 2014; UMPIERREZ; KORYTKOWSKI, 2016; WEXLER et al., 2007).

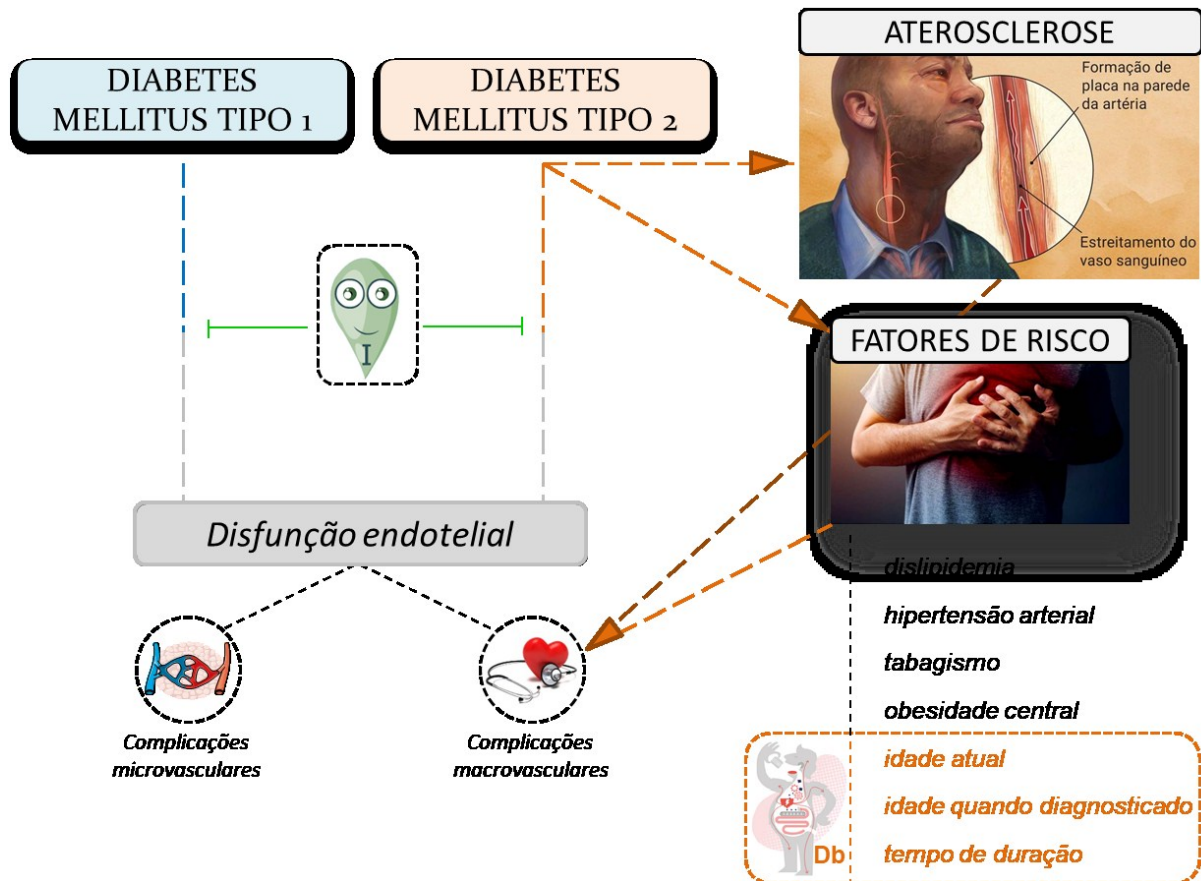
Todavia, assim como são preocupantes os quadros agudos de hipoglicemia, também chamam atenção a instauração crônica de um estado hiperglicêmico não controlado e seus prejuízos decorrentes, uma vez que os níveis de glicose não controlados estão associados a um aumento da mortalidade e da carga de doenças cardiovasculares (NAVARRO-PÉREZ et al., 2018). Não obstante, a adesão a um tratamento apropriado que controle os níveis glicêmicos também é capaz de prevenir essas complicações crônicas, isto é, tanto as doenças microvasculares (DCCT RESEARCH GROUP, 1993, 1994) como as doenças macrovasculares (NATHAN et al., 2003, 2005), mas isso apenas em pacientes com diabetes tipo 1. Entre os pacientes com diabetes tipo 2, o controle glicêmico é capaz de diminuir apenas o risco de complicações microvasculares, mas não das macrovasculares (UKPDS, 1998).

Conforme esquematizado na Figura 3, a explicação para essa aparente dualidade é que muitas vias moleculares que levam ao aumento do estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial são influenciadas pela hiperglicemia (ver FORBES; COOPER, 2013). E se examinarmos um pouco mais, perceberemos que a disfunção endotelial<sup>2</sup> é encontrada no início tanto dos prejuízos microvasculares quanto dos macrovasculares (SHI; VANHOUTTE, 2017); porém, enquanto figura como um dano obrigatório no desenvolvimento das complicações microvasculares, atua apenas como um dano introdutório para as macrovasculares, uma vez que outros fatores de risco, tais como dislipidemia e hipertensão arterial (YAMAZAKI; HITOMI; NISHIYAMA, 2018), assim como a idade atual do portador, a idade quando foi diagnosticado e o tempo de duração do diabetes (ZOUNGAS et al., 2014), também desempenham importante papel na progressão das complicações macrovasculares (FORBES; COOPER, 2013).

O diabetes consegue ainda influenciar negativamente demais fatores de risco cardiovasculares. Em suma, o tabagismo, a obesidade central, a hipertensão, a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia são exemplos de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares que são agravados pelo diabetes (KHAMAISI et al., 2003), uma vez que elementos presentes no diabetes aceleram o dano ocasionado pelos fatores de risco citados. Exemplos desses elementos são: a inflamação crônica (proteína C reativa e interleucina-6) (PRADHAN et al., 2001), a disfunção endotelial (SHI; VANHOUTTE, 2017), a susceptibilidade genética (KHAMAISI et al., 2003), os produtos finais de glicosilação avançada – PGAs (SINGH et al., 2014), e a elevação dos níveis do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 – PAI-1 (LYON; HSUEH, 2003) e do fibrinogênio (BEMBDE, 2012).

---

<sup>2</sup> Uma melhor descrição do endotélio e da disfunção endotelial decorrente do estado de hiperglicemia será apresentada no tópico 1.5.7 Disfunção endotelial, p. 52.



**Figura 3 – Fatores que previnem e que desencadeiam as complicações microvasculares e macrovasculares no diabetes mellitus tipo 1 e no diabetes mellitus tipo 2.** Devido à hiperglicemia, tanto no diabetes mellitus tipo 1 quanto no diabetes mellitus tipo 2, observa-se a disfunção endotelial como precursora das complicações microvasculares e macrovasculares. O tratamento com insulina exógena é capaz de prevenir a disfunção endotelial, conseqüentemente previne o aparecimento das complicações microvasculares e macrovasculares oriundas da disfunção endotelial. Todavia, diferentemente do que é observado para o diabetes mellitus do tipo 1 onde a disfunção endotelial aparece como principal fator para a ocorrência das disfunções vasculares, no diabetes mellitus tipo 2 percebe-se a presença concomitante de outros fatores de risco que podem gerar complicações macrovasculares, como a dislipidemia, a hipertensão arterial, o tabagismo e a obesidade central, os quais também são agravados pelo próprio diabetes. Aliado a esses fatores de risco, tem-se também as próprias especificidades do diabetes, como a idade atual do portador, a idade quando foi diagnosticado e o tempo de duração do diabetes. A aterosclerose por si só já funciona como um processo patológico primário que predispõe a ocorrência de complicações macrovasculares, sendo que na presença do diabetes mellitus essa predisposição torna-se ainda maior. Dessa forma, apenas o tratamento com insulina no diabetes mellitus tipo 2, não é capaz de prevenir as complicações macrovasculares, sendo necessária também a atuação também nos demais fatores de risco presentes. Db – diabetes mellitus tipo 2; e I – tratamento com insulina exógena. Imagens: Hospital Israelita A. Einstein<sup>®</sup>, Google Imagens<sup>®</sup> e Servier Medical Art. Fonte: O autor.

Estudos afirmam que anualmente adultos com diabetes apresentam o dobro da taxa de morte quando comparados com adultos não diabéticos, consolidando o fato de que o diabetes, independentemente do tipo, aumenta o risco relativo de morbidade. Por exemplo, esse aumento é de 40 vezes para amputações, 20 vezes para cegueira, 25 vezes para doença renal crônica em estágio final, 2 a 5 vezes para infarto agudo do miocárdio e 2 a 3 vezes para acidente vascular cerebral (DONNELLY et al., 2000).

Dados recentes demonstram que metade das pessoas que possuem diabetes (50,1%) ainda não foram diagnosticadas, ou seja, os portadores desconhecem sua condição (IDF, 2019, p. 43), e estando estes mais sujeitos aos riscos e complicações decorrentes do diabetes descontrolado (ASMELASH et al., 2018). Porém, a falta de diagnóstico não é tão recente assim, estudos já demonstram que há muito tempo isso é recorrente (BEAGLEY et al., 2014; HOME, 2003; KING; REWERS, 1993), além do que, também se soma a esse grupo de risco os casos diagnosticados que são mal controlados (CREVEL; VIJVER; MOORE, 2017).

Estudos demonstram altas taxas de inadequado controle do diabetes (MIRZAEI et al., 2020), isto é, hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq 7\%$  para adultos (ADA, 2020, p. S71), e que os portadores de diabetes descontrolado apresentam maiores prejuízos decorrentes do diabetes do que aqueles que conseguem atingir as metas glicêmicas (ADVANCE, 2008; CARVALHO et al., 2021; GÆDE et al., 2003; HADAEGH et al., 2008). Além do controle glicêmico por medidas farmacológicas, a associação com intervenções não-farmacológicas, como adoção de uma dieta balanceada, a prática orientada de exercícios físicos e o abandono do tabagismo, contribui para a redução do risco de doenças cardiovasculares e complicações microvasculares em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (GÆDE et al., 2003; HUANG et al., 2017).

Em suma, a incapacidade de produzir a insulina, ou de utilizá-la, faz com que a concentração de glicose se mantenha elevada na corrente sanguínea. Em longo prazo, tal descontrole pode causar lesões em órgãos-alvos (IDF, 2019), como os olhos (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010), os nervos (CALLAGHAN et al., 2020), a pele (QUONDAMATTEO, 2013), os rins (SELBY; TAAL, 2020) e os pés (MISHRA et al., 2017). Essas lesões implicam no desenvolvimento de incapacitações e complicações potencialmente mortais, tais como: doença cardiovascular, neuropatia, retinopatia e nefropatia (IDF, 2019). Além disso, o diabetes também pode desencadear disfunções sexuais (BARGIOTA et al., 2011; VÁRKONYI; KEMPLER, 2014) e doença periodontal (KOCHER et al., 2018), dentre várias outras complicações.

### **1.5 Prejuízos cardiovasculares no diabetes mellitus**

O primeiro estudo que demonstrou a contribuição do diabetes para a ocorrência de doenças cardiovasculares data de 1979 (antes havia apenas relatos) e utilizou os dados coletados pelo *Framingham Study* (KANNEL; MCGEE, 1979), desde então muito já foi descoberto. Hoje sabemos que as complicações crônicas do diabetes envolvem tanto as

doenças microvasculares (DCCT RESEARCH GROUP, 1993, 1994) como as doenças macrovasculares (NATHAN et al., 2003, 2005).

As doenças microvasculares são específicas do diabetes e incluem a neuropatia diabética, a retinopatia diabética e a nefropatia diabética (CALLAGHAN et al., 2020; CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010; DONNELLY et al., 2000; SELBY; TAAL, 2020). Por sua vez, as doenças macrovasculares não são específicas do diabetes, apenas sendo agravadas quando na presença deste, e são as que mais contribuem para a morbimortalidade ocasionada pelo diabetes. São exemplos de complicações macrovasculares do diabetes: a doença arterial coronariana, o acidente vascular cerebral, a disfunção erétil e a doença arterial periférica (DONNELLY et al., 2000; HUANG et al., 2017; SARWAR et al., 2010; VÁRKONYI; KEMPLER, 2014). E sabe-se que a aterosclerose é o processo patológico primário associado a todas essas complicações citadas (KATTOOR et al., 2017), sendo que o diabetes propicia fatores capazes de acelerar a própria aterosclerose (LUNDER; JANIĆ; ŠABOVIČ, 2019).

Por vezes, também pode ocorrer das complicações microvasculares se somarem às complicações macrovasculares e desencadear outros agravos. Como exemplo, podemos citar as úlceras no pé e a amputação deste, condições estas que podem ser resultantes tanto de uma neuropatia diabética, como de uma doença arterial periférica, ou ainda de ambas. Destaca-se que as duas complicações citadas (úlceras e amputação) são bastante comuns nos pacientes diabéticos e figuram como importantes causas de morbimortalidade entre os acometidos (ADA, 2020; FORBES; COOPER, 2013).

Mas quais mecanismos estão por trás dessas complicações micro e macrovasculares ocasionadas pela exposição prolongada às altas concentrações de glicose? De modo geral, a literatura demonstra que são diversos mecanismos moleculares que estão por trás da ocorrência dessas complicações (BROWNLEE, 2005), mecanismos estes que influenciados por determinantes genéticos da suscetibilidade individual são capazes de determinar a extensão do dano ocasionado ao tecido diabético (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

Em suma, o questionamento realizado acima possui diferentes respostas, uma vez que diferentes mecanismos estão envolvidos na gênese das complicações micro e macrovasculares. A via dos polióis, os produtos finais de glicosilação avançada, a ativação da proteína cinase C, a via da hexosamina e o estresse oxidativo podem contribuir de forma importante nos mecanismos fisiopatológicos das complicações microvasculares (BROWNLEE, 2005; LUNDER; JANIĆ; ŠABOVIČ, 2019), sendo que a produção do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é tida como a base

desses diferentes mecanismos patogênicos que a hiperglicemia induz (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

Já no que se refere às complicações macrovasculares, parece que quem desempenha o papel principal para a ocorrência delas é o aumento da oxidação dos ácidos graxos (GIACCO; BROWNLEE, 2010), uma vez que a própria resistência à insulina per se já aumenta o risco de doença cardiovascular em indivíduos com tolerância normal à glicose (YIP; FACCHINI; REAVEN, 1998).

Estudos evidenciam que mesmo na ausência da hiperglicemia, a resistência à insulina já é capaz de promover aterogênese, pois faz com que os adipócitos aumentem a liberação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea a partir dos triglicerídeos armazenados. Experimentos demonstram que nas células endoteliais da artéria aorta, sem a presença de insulina e expostas a concentrações de ácidos graxos semelhantes às encontradas no contexto de resistência à insulina, há aumento na oxidação dos ácidos graxos, que conseqüentemente induz aumento na produção de superóxido. O superóxido, por sua vez, é capaz de ativar sinais pró-inflamatórios, os quais também são ativados num contexto de hiperglicemia, e inativar a sintase da prostaglandina I<sub>2</sub> (ciclooxigenase; COX) e a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), ambas, além de envolvidas no processo de relaxamento vascular, são enzimas antiaterogênicas (DU et al., 2006).

A disfunção endotelial associada ao diabetes está diretamente envolvida com a gênese das complicações vasculares diabéticas (SHI; VANHOUTTE, 2017), sendo que diversos estudos em humanos já demonstraram sua presença entre os diabéticos. Podemos citar o estudo de Waring et al. (2006), que buscava avaliar se a administração de ácido úrico (agente antioxidante) seria capaz de melhorar a disfunção endotelial presente em pacientes com diabetes tipo 1 e em fumantes, por ambos fazerem parte de grupos que têm aumento do estresse oxidativo, conseqüentemente excesso de atividade de radicais livres. Nesse estudo, os autores conseguiram demonstrar melhoras na função endotelial com a utilização do ácido úrico. Contudo, para além desse resultado encontrado, também é perceptível no estudo que tanto os pacientes diabéticos como o grupo fumante possuíam acentuada disfunção endotelial, caracterizada pela avaliação do fluxo sanguíneo após administração de doses crescentes de acetilcolina. Ambos os grupos ainda apresentaram respostas semelhantes ao grupo controle quando utilizado o nitroprussiato de sódio, demonstrando a presença apenas do prejuízo endotelial e não na maquinaria contrátil da musculatura lisa vascular.

No que se refere aos pacientes com diabetes tipo 2, podemos citar o estudo conduzido por McVeigh et al. (1992), que buscou investigar as respostas vasculares dependentes e



independentes do endotélio nesses pacientes. Os autores demonstraram, através da avaliação do fluxo sanguíneo, tanto a disfunção endotelial, quando administrada doses crescentes de acetilcolina, como também prejuízos na musculatura lisa vascular, quando administrada doses crescentes de trinitrato de glicerina.

A disfunção endotelial já é tão bem estabelecida entre os diabéticos que serve de base para estudos que procuram demonstrar o efeito benéfico de determinadas intervenções farmacológicas na melhoria desse prejuízo. Como exemplo, podemos citar o estudo de Mather, Verma e Anderson (2001), que buscou demonstrar o efeito benéfico da metformina, atualmente fármaco de escolha para o tratamento do diabetes tipo 2, sobre a disfunção endotelial de pacientes diabéticos. Nesse estudo a utilização de metformina durante três meses foi capaz de melhorar a resposta vascular dependente do endotélio quando comparado com o uso do placebo em pacientes também diabéticos, avaliado pelo fluxo sanguíneo após a administração de doses crescentes de acetilcolina.

Por fim, cabe ressaltar que parece haver diferença entre sexos na ocorrência das complicações micro e macrovasculares, enquanto os homens tendem a apresentar maior risco para a ocorrência de complicações microvasculares associadas ao diabetes, as mulheres diabéticas sofrem maiores consequências das complicações macrovasculares. Fato interessante este, posto que, durante grande parte de suas vidas, as mulheres possuem risco muito menor para doenças micro e macrovasculares quando comparado com os homens, sendo essa proteção comumente atribuída à presença dos hormônios sexuais. De certa forma, possuir diabetes parece ser mais prejudicial às mulheres, já que confere maior risco de complicações vasculares nestas (para revisão ver MARIC-BILKAN, 2017).

Por sua vez, no que se refere às doenças cardiovasculares e aos eventos cardiovasculares agudos<sup>3</sup>, para as suas ocorrências os fatores de risco comportamentais figuram como os principais. E sabe-se que os efeitos desses fatores comportamentais de risco se manifestam através do aumento na pressão arterial, de hiperlipidemia, do ganho de peso excessivo e da elevação dos valores glicêmicos. Dessa forma, podemos perceber que o diabetes também figura como um dos principais fatores de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares e dos eventos cardiovasculares agudos, sendo assim de suma importância o seu correto

---

<sup>3</sup> Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (2021), as doenças cardiovasculares configuram como um grupo de doenças que acometem o coração e/ou os vasos sanguíneos, tais como: doença coronariana, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Por sua vez, os ataques cardíacos e os acidentes vasculares cerebrais são caracterizados apenas como eventos agudos e que comumente estão ocasionados à presença de placas de atheroma que impedem o fluxo sanguíneo para o coração e o cérebro, respectivamente.

tratamento do diabetes para a redução do risco cardiovascular e prevenção de ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais (OPAS, 2021).

Uma vez que já é sabida a associação existente entre o diabetes e as doenças cardiovasculares e seus eventos agudos, no próximo tópico discorreremos um pouco mais sobre o comprometimento dos vasos sanguíneos devido à sua exposição ao contexto hiperglicêmico. Contudo, antes de iniciarmos o próximo tópico, detalharemos algumas das bases fisiopatológicas das complicações microvasculares e macrovasculares observadas no diabetes mellitus.

### 1.5.1 Via do polióis (sorbitol)

Uma das vias alternativas para a glicose livre, principalmente em contextos hiperglicêmicos, é a via do poliol que, ao final do processo, a transforma em frutose. Duas enzimas são determinantes nesse processo: a aldose redutase, que catalisa a conversão enzimática da glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) no poliálcool sorbitol ( $C_6H_{14}O_6$ ) com oxidação do NADPH a  $NADP^+$ , e a sorbitol desidrogenase, que oxida o sorbitol convertendo-o em frutose ( $C_6H_{12}O_6$ ) e reduzindo o  $NAD^+$  a NADH (OATES, 2002).

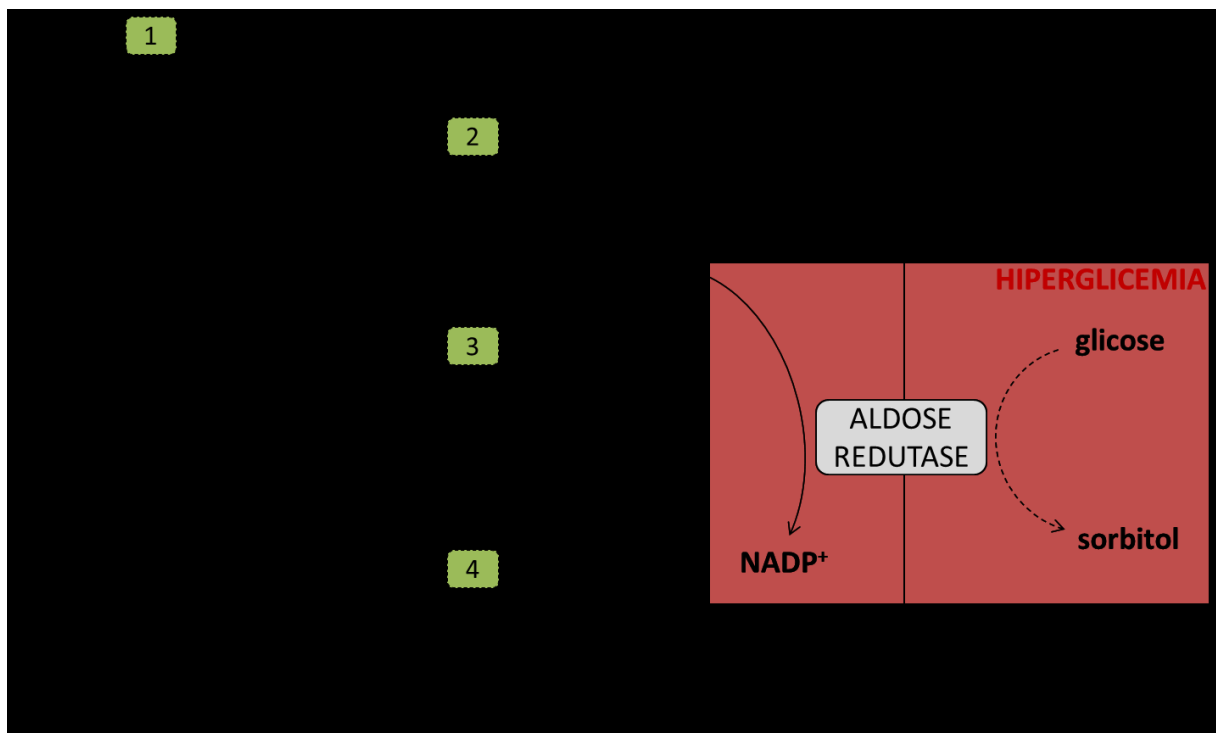
A enzima aldose redutase pode ser encontrada em determinados tecidos, onde está amplamente localizada em células específicas destes. Por exemplo, ela pode ser encontrada no epitélio do cristalino, nas células de Schwann presentes nos neurônios no sistema nervoso periférico, nas papilas renais e nas ilhotas pancreáticas (GABBAY, 1973).

A aldose redutase funciona como a enzima citosólica que controla a taxa da reação enzimática na via do poliol (HE et al., 2019), estando a sua expressão aumentada nos tecidos quando temos um diabetes descompensado. Isso ocasiona maior produção de sorbitol, tanto pelo aumento da quantidade de enzimas disponíveis como pelo aumento do próprio substrato, a glicose (BURG; KADOR, 1988), além de gerar diminuição nos níveis de NADPH (SRIVASTAVA et al., 1986).

E, além disso, o fator agravante é que, nos diabéticos, há maior disponibilidade de glicose, uma vez que estudos demonstram que a hexocinase, enzima que fosforila a glicose, tem sua atividade reduzida no diabetes experimental (BROH-KAHN; MIRSKY, 1947; YALCIN; WINEGRAD, 1963) e, em humanos, isso também é observado pela própria falta da ação da insulina que é a responsável por aumentar a atividade da hexocinase (DIMITRIADIS et al., 2011), sendo inclusive benéfica uma futura utilização de ativadores enzimáticos

seletivos para a hexocinase IV, a fim de se obter a redução da liberação hepática de glicose (TOULIS et al., 2020).

O NADPH é necessário para promover a regeneração da glutatona reduzida (GSH) e, uma vez que, para que ocorra o processo de redução da glicose em sorbitol, há consumo de NADPH, o contexto hiperglicêmico intensifica esse consumo e assim favorece o aumento do estresse oxidativo intracelular (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006), conforme demonstrado na Figura 4.



**Figura 4 – Ação da glicose-6-fosfato desidrogenase na redução celular de fatores oxidantes, ação da aldose redutase inativando aldeídos tóxicos e a influência do contexto hiperglicêmico sobre a via dos polióis, onde é demonstrada a competição da aldose redutase com a glutatona redutase pelo NADPH.** A enzima hexocinase (1) catalisa a conversão da glicose em glicose-6-fosfato, a qual é oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (2) a 6-fosfogluconolactona, processo onde ocorre a redução de NADP<sup>+</sup> a NADPH. A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase torna a célula mais vulnerável aos agentes oxidantes provenientes do estresse oxidativo. A enzima glutatona redutase (3) reduz a glutatona dissulfeto (GSSG) para a sua forma sulfidril (GSH), processo este que requer nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a qual durante o processo é convertida à sua forma oxidada (NADP<sup>+</sup>). Por sua vez, a enzima glutatona peroxidase (4) catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uma espécie reativa de oxigênio moderadamente reativa, em água (H<sub>2</sub>O); e para que esse processo ocorra, há concomitante oxidação da glutatona reduzida (GSH) à glutatona dissulfeto (GSSH). As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem proporcionar a formação de aldeídos tóxicos que serão inativados ao serem convertidos em poliálcoois inativos pela via do polioliol, processo este onde a NADPH é oxidada a NADP<sup>+</sup>. Ocorre que, num contexto hiperglicêmico, o excesso de glicose passa a ser desviado para a via dos polióis onde é convertida enzimaticamente ao polioliol sorbitol. E, como essa reação ocasiona a redução do NADPH em NADP<sup>+</sup>, essa maior demanda da via do polioliol propiciada pela hiperglicemia ocasiona a diminuição da disponibilidade de NADPH, o qual é necessário para que ocorra a regeneração da GSH a partir da GSSH. Dessa forma, o aumento do consumo de NADPH para converter glicose, disponível em altos níveis, a sorbitol pode induzir e/ou exacerbar o estresse oxidativo intracelular. Enzimas: 1 – hexocinase, 2 – glicose-6-fosfato desidrogenase, 3 – glutatona redutase e 4 – glutatona peroxidase. Fonte: O autor, a partir de Brownlee (2005) e Srivastava et al. (1986).

Em condições fisiológicas os solutos orgânicos osmoticamente ativos, dos quais faz parte o sorbitol, através dos seus efeitos osmóticos auxiliam na manutenção do volume celular, quando este é desafiado pelo meio extracelular, como por exemplo, um desafio por uma alta concentração extracelular de sódio (BURG; KADOR, 1988). Por sua vez, em estados hiperglicêmicos, como nos observados com o diabetes, o acúmulo de sorbitol nas células perturba os processos de osmorregulação delas e ocasiona danos, como os observados na neuropatia periférica (AKAMINE et al., 2018), retinopatia (BURG; KADOR, 1988) e nefropatia (GREWAL et al., 2016; HE et al., 2019).

Tais danos ocorrem porque nessa perturbação osmótica, além de se observar níveis elevados de sorbitol e o estresse osmótico celular, ocorre também a depleção do mioinositol (HE et al., 2019), o qual tem importante participação na homeostase metabólica e resposta ao estresse, dentre diversas outras (ver BIZZARRI et al., 2016), sendo inclusive benéfico tanto à prevenção como ao tratamento do diabetes (ÖZTURAN et al., 2019). A depleção do mioinositol pode ser explicada, pelo menos em partes, pela elevada excreção urinária de inositol e sorbitol em pacientes diabéticos que se correlacionam diretamente com a excreção urinária de glicose (HEAP; GALTON, 1975).

### 1.5.2 Produtos finais de glicosilação avançada

Um dos mecanismos pelo qual a hiperglicemia ocasiona dano celular é através do aumento na formação dos produtos finais de glicosilação avançada (SINGH et al., 2014). Inicialmente, Maillard (1912), descreveu a obtenção de uma substância de cor marrom através de uma reação não enzimática entre açúcares redutores e aminoácidos. Em seguida, Monnier e Cerami (1981), conseguiram demonstrar que a reação de Maillard, ou glicosilação não enzimática, também ocorria no organismo humano contribuindo para o processo de envelhecimento, uma vez que essas proteínas glicosiladas, denominadas de produtos finais de glicosilação avançada, depositam-se em tecidos insulino-dependentes. Dessa forma, Monnier e Cerami conseguiram relacionar que, no diabetes, a reação de Maillard atua como um fator importante para a ocorrência de aterosclerose e o surgimento precoce de cataratas, devido à exposição desses tecidos às altas concentrações de glicose.

Em suma, os açúcares redutores, como por exemplo, a glicose, reagem com um aminoácido numa reação não enzimática, reação de Maillard, que, após sofrer o processo de desidratação dará origem à base de Schiff, que, por ser instável, sofre rearranjo de Amadori, originando um composto mais estável (SAKURAI et al., 2003), sendo que um dos produtos

de Amadori mais conhecido é a hemoglobina glicada (JAKUŠ; RIETBROCK, 2004) que é comumente utilizada como parâmetro clínico para avaliar os níveis glicêmicos retrospectivos nos pacientes diabéticos (HELLWIG; HENLE, 2014).

Ocorre que esses produtos de Amadori originados ainda podem também sofrer diversas reações que, ao final, culminarão na formação de produtos finais de glicosilação avançada (SAKURAI et al., 2003). Os produtos finais de glicosilação avançada, por sua vez, ao se ligarem em seus receptores de membrana desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que induz a ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B). E sabe-se que a maior parte dos estressores celulares atuam aumentando a formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) e a ativação transitória de NF- $\kappa$ B, o que é observado para os produtos finais de glicosilação avançada (BIERHAUS et al., 2005).

O diabetes acelera a formação de produtos finais de glicosilação avançada e isso implica em prejuízos celulares, uma vez que até mesmo células que fisiologicamente não expressam significativamente receptores para produtos finais de glicosilação avançada, tais como monócitos/macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa, células neuronais e células endoteliais, podem aumentar a sua expressão em situações onde há alta concentração de ligantes ou há elevação de ativação de fatores de transcrição regulados pelos receptores de produtos finais de glicosilação avançada. Além disso, a ativação dos receptores de produtos finais de glicosilação avançada ocasiona a supressão da GSH e do ácido ascórbico, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo intracelular (BIERHAUS et al., 2005).

Estudos ainda propõem que há um aumento na razão NADH/NAD<sup>+</sup> citosólica devido à oxidação do sorbitol pelo NAD<sup>+</sup>, aumento este que inibe a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese. A inibição dessa enzima ocasiona o aumento das concentrações de triose fosfato, que aumentam a formação de metilglioxal, que é precursor para produtos finais de glicosilação avançada e diacilglicerol (BROWNLEE, 2001).

### 1.5.3 Ativação de PKC

Conforme relatado anteriormente, há um aumento na produção de diacilglicerol, estimulado pelo próprio contexto hiperglicêmico (BROWNLEE, 2001). Isso ocorre porque a hiperglicemia inibe a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase o que ocasiona o acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato, nessa situação é gerado um isômero triose dessa molécula dando origem à diidroxiacetona-3-fosfato. Na sequência, a diidroxiacetona-3-fosfato é reduzida a

glicerol-3-fosfato, que é capaz de se combinar com ácido graxos na síntese “de novo” de diacilglicerol, pela ação da 1-acilglicerol-3-P aciltransferase e fosfatidato fosfohidrolase (IGHODARO, 2018).

Esse aumento na disponibilidade de diacilglicerol favorece não somente maior ativação das isoformas  $\beta$  e  $\delta$  da PKC, mas também de outras isoformas dessa enzima. Além do que, os próprios produtos finais de glicosilação avançada, originados com a hiperglicemia, ao se ligarem em seus receptores podem ativar indiretamente as isoformas da PKC (BROWNLEE, 2001; IGHODARO, 2018). Em suma, tanto o diacilglicerol quanto a PKC funcionam como moléculas de sinalização intracelular, cruciais às funções vasculares, regulando diversos processos, tais como a permeabilidade, a liberação de moléculas vasoconstritoras, a ativação endotelial e a sinalização dos fatores de crescimento (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006). Por exemplo, a ativação de PKC $\beta$  induzida pela hiperglicemia intermedia anormalidades do fluxo sanguíneo na retina e nos rins (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006) e é capaz de reduzir a disponibilidade do óxido nítrico produzido pelas células endoteliais, ao antagonizar a ativação da sintase do óxido nítrico mediada pela enzima fosfatidilinositol-3-cinase (BECKMAN et al., 2002).

Para o surgimento das doenças metabólicas é sugerido que defeitos na captação de glicose pelo musculo mediada pelas PKB/Akt e PKCs atípicas independentes de cálcio e diacilglicerol sejam um importante fator, demonstrando assim a importância também das PKC atípicas nesse processo. Isso porque a sinalização mediada pela PKB/Akt já é conhecida por desempenhar um efeito pleiotrópico para a ocorrência dessas doenças, uma vez que essa proteína está diretamente envolvida na captação de glicose mediada pela via IR/IRS/PI3K/Akt, via ativada pela insulina que promove a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, além de outros efeitos (COPPS; WHITE, 2012).

Por exemplo, a ativação excessiva de PKCs atípicas no fígado pode ocorrer tanto pela ativação por lipídios provenientes da dieta, como pela própria insulina quando instaurada a hiperglicemia. Essa maior ativação de PKCs atípicas hepáticas aumenta a expressão de fatores gliconeogênicos, lipogênicos e também pró-inflamatórios, ambos envolvidos no desenvolvimento da intolerância à glicose, diminuição da sensibilidade à insulina, hiperlipidemia e obesidade (FARESE; LEE; SAJAN, 2014).

Por fim, o aumento da atividade da PKC, evocado pela hiperglicemia, ocasiona o aumento na atividade da fosfolipase A2 citosólica promovendo maior produção de ácido araquidônico e prostaglandina E2, os quais atuam como inibidores da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase, a qual é crucial para a manutenção do equilíbrio celular (GREENE et al., 1987; TRIPATHI;

SRIVASTAVA, 2006). Ainda nessas condições de aumento na atividade da PKC, enzimas geradoras de EROs são estimuladas, tais como as NADPH oxidase e as lipoxigenases, que conjuntamente cooperam para uma exacerbação do ambiente oxidativo celular (IGHODARO, 2018).

#### 1.5.4 Via da hexosamina

Fisiologicamente, uma pequena parcela da frutose-6-fosfato proveniente da glicólise entra na via da hexosamina. A enzima glucosamina-frutose amidotransferase funciona como limitante da taxa e da reação que converte a frutose-6-fosfato a glucosamina 6-fosfato, a qual é convertida em uridina difosfato N-acetilglucosamina pela ação da enzima uridina difosfato N-acetilglucosamina sintase. Contudo, em condições hiperglicêmicas a frutose-6-fosfato é canalizada para a via da hexosamina de forma excessiva e a atividade da enzima glucosamina-frutose amidotransferase também é aumentada conduzindo à elevação dos níveis do produto final da via (IGHODARO, 2018). Essa via tem importante participação na ocorrência da diminuição da sensibilidade à ação da insulina pelas células, tanto induzida pela hiperglicemia como por gordura (DU et al., 2000).

A uridina difosfato N-acetilglucosamina pode modificar proteínas e alterar a expressão gênica ocasionando dano tecidual, uma vez que ela também pode ser utilizada como substrato da enzima O-GlcNAc (do inglês, *O-linked β-N-acetylglucosamine*) transferase que promove a transferência do grupamento N-acetilglucosamina para resíduos de serina e treonina de proteínas (VERY et al., 2018). Como exemplo dessas proteínas que recebem o grupamento N-acetilglucosamina temos o fator de transcrição Sp1 que, quando recebe a transferência da N-acetilglucosamina, ocasiona um aumento na produção de PAI-1 (DU et al., 2000), comumente envolvido nos distúrbios trombóticos (ASO, 2007). Também podemos citar o fator de transformação do crescimento TGF-β1, fator importante para a proliferação e diferenciação celular, associado à retinopatia diabética (KOLM-LITTY et al., 1998) e à nefropatia (IGHODARO, 2018; SUN et al., 2018).

Recorda-se que a hiperglicemia crônica atua como provedora de um fluxo constante de substrato para a via da hexosamina, o que contribui para o aumento do estresse oxidativo, uma vez que, com essa via ativada, também ocorre a inibição da produção celular do antioxidante glutathiona reduzida (HORAL et al., 2004), contribuindo ainda mais para aumentar o risco de desenvolvimento das complicações observadas no diabetes (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006).

### 1.5.5 Estresse oxidativo

Por meio de processos enzimáticos e não enzimáticos, a hiperglicemia é capaz de aumentar o estresse oxidativo (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006), o qual desempenha importante papel tanto no início quanto na progressão das disfunções cardiovasculares associadas, dentre outras doenças, também ao diabetes (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003). E, conforme pode ser observado ao apresentarmos nos subtópicos da via dos polióis, dos produtos finais de glicosilação avançada, da ativação de PKC e da via da hexosamina, o estresse oxidativo está presente em todas as anormalidades ocasionadas pela hiperglicemia por meio desses processos.

O que ocorre é que a hiperglicemia, por ser capaz de diminuir a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ocasiona substantivo aumento de todos os intermediários glicolíticos a montante da enzima, isto é, do gliceraldeído-3-fosfato, envolvido na ativação da via da PKC e utilizado na via dos produtos finais de glicosilação avançada, da frutose-6-fosfato, que é desviada para a via da hexosamina, e da própria glicose, que segue para a via dos polióis (BROWNLEE, 2005).

O estresse oxidativo é um estado onde se observa um excesso de EROs de tal modo que sobrecarrega os sistemas antioxidantes endógenos. E dentre as diversas EROs que podem ocorrer no organismo, o superóxido desponta como uma das mais importantes EROs capaz de desempenhar efeitos vasculares prejudiciais, tanto sobre as células musculares lisas como sobre as células endoteliais, podendo chegar a ocasionar até mesmo apoptose (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003).

O superóxido possui tamanho impacto sobre a ocorrência das complicações cardiovasculares ocasionadas pelo diabetes que já foi demonstrado que a superexpressão da enzima superóxido dismutase (SOD), enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, foi capaz de prevenir a ocorrência dessas complicações (SHEN et al., 2006), uma vez que a normalização da produção mitocondrial de superóxido é eficiente para bloquear as principais vias envolvidas no danos ocasionados pela hiperglicemia (NISHIKAWA et al., 2000).

### 1.5.6 Oxidação de ácidos graxos

Na hiperglicemia observamos o aumento da produção de triglicerídeos pelo fígado (HAN et al., 2016), assim como a diminuição à ação da insulina que faz com que os



adipócitos liberem mais ácidos graxos na corrente sanguínea (BROWNING; HORTON, 2004; DU et al., 2006), eventos estes que contribuem para o aumento da oxidação dos ácidos graxos nas células endoteliais (DU et al., 2006; GIACCO; BROWNLEE, 2010). E já é bem estabelecido que os ácidos graxos atuam como fatores de risco para a ocorrência das doenças cardiovasculares e que estão intimamente relacionados aos eventos predisponentes da síndrome metabólica (EGAN; GREENE; GOODFRIEND, 2001).

O aumento da oxidação de ácidos graxos nas células endoteliais ocorre porque a insulina não consegue estimular a síntese de lipídeos, momento onde ocorre a produção de malonil CoA, molécula esta que, quando em níveis elevados, inibiria a proteína transportadora carnitina aciltransferase I, responsável por realizar o transporte dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria. Tal processo favorece a oxidação dos ácidos graxos que foram liberados e culmina também em uma maior produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, conduzindo a danos mitocondriais que precedem a ocorrência da aterosclerose. Esse aumento na produção do superóxido ativa os mesmos mecanismos que as EROs produzidas pela hiperglicemia ativam (GIACCO; BROWNLEE, 2010) e, conforme descrito em tópicos anteriores, também ativa sinais pró-inflamatórios e inibe as enzimas COX e eNOS, o que também favorece a ocorrência da aterosclerose (DU et al., 2006; GIACCO; BROWNLEE, 2010).

A hiperglicemia também promove o aumento da glicosilação de praticamente todas as proteínas corpóreas, o que inclui lipoproteínas, apolipoproteínas e fatores de coagulação. Por outro lado, o aumento na geração de produtos finais de glicosilação avançada pode induzir, na parede vascular, uma reticulação excessiva de colágeno e de outras proteínas da matriz que podem conduzir ao acúmulo de LDL nessas paredes (LAAKSO, 1999).

Essas ocorrências acima são agravadas pela modificação que os produtos finais de glicosilação avançada fazem sobre o LDL, prolongando a meia-vida destes e contribuindo para sua oxidação, assim como pelos próprios efeitos deletérios que os produtos finais de glicosilação avançada exercem sobre as células endoteliais quando ativam seus receptores. Todos esses eventos possuem relação com o desenvolvimento da aterosclerose (LAAKSO, 1999), um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das complicações macrovasculares do diabetes (KATTOOR et al., 2017).

Por exemplo, um estudo que buscou avaliar a capacidade mitocondrial de oxidação de carboidratos e ácidos graxos em amostras provenientes de biópsia de ventrículo de pacientes diabéticos detectou que, mesmo ausente insuficiência contrátil nesses pacientes, já era perceptível a diminuição da capacidade mitocondrial de realizar o processo de  $\beta$ -oxidação,

seguido por acúmulo intracelular de lipídeos e aumento do estresse do retículo endoplasmático e de apoptose (LJUBKOVIC et al., 2019).

### 1.5.7 Disfunção endotelial

Descrito inicialmente em 1847 (SCHWANN, 1847), o endotélio é uma camada única de células que reveste internamente todos os vasos sanguíneos. É capaz de desempenhar funções autócrinas, parácrinas e endócrinas e de afetar o sistema cardiovascular, explicando assim sua importância tanto como modulador de funções cardiovasculares, como também, mediador de doenças cardiovasculares (KHAZAEI; MOIEN-AFSHARI; LAHER, 2008).

O papel do endotélio na regulação do tônus vascular foi inicialmente descrito através dos achados de Furchgott e Zawadzki (1980), que descreveram sua essencial participação como mediador da ação vasodilatadora da acetilcolina em anéis de artéria aorta de coelhos ao liberar uma substância vasodilatadora, denominando inicialmente como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*), que mais tarde descobriram que se tratava do óxido nítrico (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987).

Mais tarde se descobriu que, além do óxido nítrico, o endotélio era capaz de liberar diversas outras substâncias vasodilatadoras (prostaciclina e fatores de hiperpolarização derivados do endotélio) e vasoconstritoras (prostaglandinas vasoconstritoras, EROs e endotelina). Dessa forma, quando ocorre uma disfunção endotelial há um desequilíbrio na produção desses mediadores, com consequentes prejuízos na regulação do tônus vascular e de outros processos regulados pelo endotélio, como agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise. Estando a disfunção endotelial presente no diabetes e em diversas outras doenças, por exemplo, em lesões ateroscleróticas avançadas a disfunção endotelial está tão presente que pode ser observada até uma completa supressão do processo de vasodilatação dependente do endotélio (HSUEH; QUIÑONES, 2003; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999).

Não obstante, dentre os transportadores de glicose existentes (Tabela 3), três podem ser encontrados nas células endoteliais: o GLUT-4, o GLUT-3 e o GLUT-1, sendo que este último é a isoforma mais abundante nessas células (AL-AHMAD, 2017; GALLEY; WEBSTER, 2004; MEIRELES et al., 2013). Acontece que, como o GLUT-1 é responsável pelo transporte constitutivo da glicose, isto é, ele realiza a captação basal por meio de difusão facilitada. Assim, as células endoteliais são incapazes de regular a concentração intracelular de glicose num contexto de hiperglicemia, o que as tornam susceptíveis aos danos induzidos

pelo diabetes (KAISER et al., 1993; SINGH et al., 2014). E quando se soma a um contexto hiperinsulinêmico, o qual pode induzir a translocação de GLUT-4 para a membrana celular, a captação de glicose pode se tornar ainda maior (GALANTE et al., 1994; JAMES et al., 1988; SIMPSON; CUSHMAN, 1986; SUZUKI; KONO, 1980), uma vez que o GLUT-4 apresenta uma afinidade à glicose semelhante ao GLUT-1 (AUGUSTIN, 2010).

**Tabela 3 – Transportadores de glicose e suas respectivas capacidades de transporte para a glicose.**

Transportador	Km (mM)	Transportador	Km (mM)
GLUT-1	~3	GLUT-8	~2
GLUT-2	~17	GLUT-9	0,6
GLUT-3	1,4	GLUT-10	0,3 <sup>o</sup>
GLUT-4	~5	GLUT-11	0,16
GLUT-5	6 <sup>#</sup>	GLUT-12	-
GLUT-6	≥5	GLUT-13	-
GLUT-7	0,3	GLUT-14	-

<sup>#</sup> Km para frutose. <sup>o</sup> Km para 2-deoxiglicose.

Fonte: Augustin (2010).

As EROs podem ser prejudiciais à função endotelial sempre que houver um desequilíbrio entre os processos oxidante e antioxidantes das células endoteliais que são os responsáveis por regular a quantidade de EROs gerada (KHAZAEI; MOIEN-AFSHARI; LAHER, 2008). Por exemplo, a hiperglicemia é capaz de desequilibrar os processos oxidante e antioxidante das células endoteliais promovendo a liberação de radicais livres. Um desses radicais livres é o ânion superóxido, que é capaz de interagir com o óxido nítrico inativando-o e produzido o peroxinitrito, o que contribui para a disfunção endotelial através do processo de peroxidação lipídica (BROWNE et al., 2003).

Por fim, a disfunção endotelial vascular aparece como um precursor fisiopatológico de doenças cardiovasculares, doenças estas que figuram como principais causas de morte entre os diabéticos. Os mecanismos que levam aos prejuízos endoteliais envolvem agravos decorrentes da hiperglicemia que aumentam o dano oxidativo (GHOSH et al., 2017; HOFFMAN, 2014; KNAPP; TU; WU, 2019), principalmente devido às oscilações da hiperglicemia que podem impedir o processo adaptativo das células frente ao contexto hiperglicêmico (HIRSCH; BROWNLEE, 2005).

Além disso, quando há um aumento na concentração de superóxido, como o que ocorre em processos inflamatórios, se o superóxido for formado nas proximidades do NO, eles se combinaram espontaneamente, requerendo concentrações iguais de ambos, para formar peroxinitrito. Assim, esse processo ocasiona a diminuição da biodisponibilidade de NO

(PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). E como já falamos anteriormente no diabetes percebe-se a presença de um contexto pró-inflamatório (GREENE et al., 1987; TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006).

### **1.6 Disfunção vascular no diabetes mellitus**

Conforme sua estrutura e função, os vasos sanguíneos podem ser divididos em artérias elásticas ou de condutância, artérias musculares, artérias de resistência, vasos de intercâmbio e vasos de capacitância (LEVICK, 1991). As artérias de resistência têm papel fundamental na regulação e manutenção da resistência ao fluxo sanguíneo proveniente de vasos de condutância, uma vez que são as responsáveis pela resistência vascular, exercendo grande influência tanto no fluxo sanguíneo como na pressão arterial (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001).

Essa influência sobre a pressão arterial ocorre porque os diversos mecanismos que favorecem a manutenção da pressão arterial em valores relativamente constantes culminam basicamente em dois determinantes básicos: o débito cardíaco e a resistência vascular periférica (GUYTON, 1981). Desse modo, através de sinais neurais e químicos, as arteríolas conseguem elevar ou diminuir o fluxo sanguíneo local (LEVICK, 1991).

Uma das anormalidades mais comuns nesse processo de controle da pressão arterial é a hipertensão arterial, onde se percebe que as anormalidades observadas nos vasos de resistência não figuram como evento primário para seu desenvolvimento, mas como adaptações secundárias.

Essas alterações que ocorrem nos vasos de resistência, frente ao contexto da hipertensão, podem ser observadas pelo aumento de sensibilidade no músculo liso vascular em modelos animais, caracterizando alterações funcionais. Enquanto que, em humanos, há um predomínio de alterações estruturais nos vasos de resistência (MULVANY, 1991).

Agora, quando olhamos para o contexto do diabetes, todas essas informações apresentadas nos fazem pensar em como esses vasos estão sendo afetados, uma vez que estudos demonstram que pacientes com diabetes tipo 1 também apresentam aumento significativo na pressão arterial (LUCINI et al., 2009), sendo que aproximadamente 30% dos pacientes que tem diabetes tipo 1 desenvolvem hipertensão. Já quando olhamos para o diabetes tipo 2 percebemos que a ocorrência de hipertensão é mais comum chegando a 50 a 80%. Entretanto, diferentemente do que ocorre no diabetes tipo 1, quando diagnosticado o diabetes tipo 2, a hipertensão já está presente na maioria dos casos (LANDSBERG;

MOLITCH, 2004). Essas divergências, com relação a qual momento estará presente a hipertensão associada ao diabetes, são facilmente explicadas pelas distintas etiologias dos dois tipos de diabetes citados, contudo o que é comum nos diferentes tipos de diabetes é o contexto hiperglicêmico instaurado que contribui para a ocorrência das disfunções vasculares observadas.

Adicionalmente, estudos ainda demonstram que enquanto na hipertensão essencial (primária) há um remodelamento eutrófico de pequenas artérias, na hipertensão secundária, nesta chamamos aqui a atenção para a hipertensão associada ao diabetes mellitus, há um remodelamento hipertrófico desses vasos (SCHIFFRIN, 2012; STRAIN; PALDÁNIUS, 2018). Assim, frente a todas essas informações, é bastante interessante verificarmos o que a literatura apresenta no que concerne à função vascular em contextos de hiperglicemia crônica.

Conforme já foi apresentado anteriormente, já está bem caracterizada a relação existente entre a hiperglicemia e o desenvolvimento e progressão de complicações microvasculares em humanos. Por sua vez, investigações que utilizaram animais também estabelecem claramente os prejuízos do diabetes sobre os diferentes tipos de vasos, isto é, tanto sobre os vasos de condutância como os vasos de resistência.

Com relação aos vasos de condutância de animais diabéticos, percebemos com experimentos realizados utilizando a artéria aorta desses animais que o contexto crônico de hiperglicemia é capaz de:

- 1) aumentar a resposta contrátil para fenilefrina (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006; TANG et al., 2011; XAVIER et al., 2003), estando esse aumento da resposta dependente de interleucina-6 (IL-6) nas menores concentrações de fenilefrina (TANG et al., 2011), maior sensibilidade das células do músculo liso vascular e/ou liberação aumentada de prostanoídes vasoconstritores derivados do endotélio, como prostaglandina H2 (PGH2) e tromboxano A2 (TxA2), e aumento do influxo de cálcio extracelular (XAVIER et al., 2003). Estudos também demonstram que essa hiperreatividade à fenilefrina em anéis de aorta de animais diabéticos é diminuída pelo tratamento desses animais com metformina (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006);
- 2) aumentar a resposta contrátil para noradrenalina (SHAMSALDEEN et al., 2019; SOTNÍKOVÁ et al., 1999) sem interferir na afinidade de ligação, possivelmente devido a alterações de sinalização a jusante que aumentam a eficácia da resposta (SHAMSALDEEN et al., 2019);
- 3) aumentar a resposta contrátil para o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (SOTNÍKOVÁ et al., 1999), o qual parece regular negativamente a contração induzida por

noradrenalina através da geração de óxido nítrico. Isso ocorre quando a produção de  $H_2O_2$  está aumentada nos vasos diabéticos e a atividade da sintase do óxido nítrico está normal (KOBAYASHI; KAMATA, 2002);

- 4) diminuir a resposta vasorelaxante dependente de endotélio produzida pela acetilcolina (KAMATA; MIYATA; KASUYA, 1989; KOBAYASHI; KAMATA, 2002; MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006; ÖZYAZGAN et al., 2000; SOTNÍKOVÁ et al., 1999), sendo essa resposta restaurada pelo tratamento com metformina (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006);
- 5) mas não altera a resposta vasorelaxante independente do endotélio produzida pelo nitroprussiato de sódio (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006; SOTNÍKOVÁ et al., 1999; XAVIER et al., 2003);

De todos esses estudos realizados com anéis de artéria aorta que foram apresentados acima, somente o de Özyazgan et al. (2000), utilizou fêmeas, sem, contudo, mencionar como os animais eram alocados nos grupos experimentais. As doses de STZ utilizadas para a obtenção do estado diabético nos animais variaram entre 50 a 65 mg/Kg, sendo administradas em dose única. A maior parte dos estudos utilizaram os animais após 4 e 8 semanas da indução, sendo que somente Shamsaldeen et al. (2019), acompanharam todas as 5 primeiras semanas, Kobayashi e Kamata (2002), após dez semanas e Sotníková et al. (1999), após vinte semanas.

Cabe ressaltar que Xavier et al. (2003), não encontraram diferença entre controle e diabéticos para a resposta da acetilcolina em anéis de aorta, embora Kamata, Miyata e Kasuya (1989), e Majithiya e Balaraman (2006), tenham demonstrado diminuição. Esses resultados evidenciam a importância do tempo de exposição desses vasos à hiperglicemia, pois estes últimos realizaram experimentos com animais submetidos a um estado hiperglicêmico por 8 semanas, enquanto Xavier et al. (2003), demonstraram os resultados encontrados em animais com 1 e 4 semanas após a indução do diabetes. Muito embora, temos resultados que demonstram hiporresponsividade sistêmica a agentes vasoconstritores e vasorrelaxante já na primeira semana após indução do diabetes em animais, quando avaliada a pressão arterial destes.

Os experimentos realizados por Inazu, Sakai e Homma (1991), utilizando a artéria renal de ratos após 6 semanas da administração de STZ (60 mg/Kg), sustentam os achados de aumento da resposta contrátil para a noradrenalina, além de demonstrar também para o cloreto de potássio (KCl) e uma hiperpermeabilidade da membrana para o cálcio. O estudo aponta que a hiper-responsividade ao KCl se deve à captação de cálcio extracelular pela musculatura

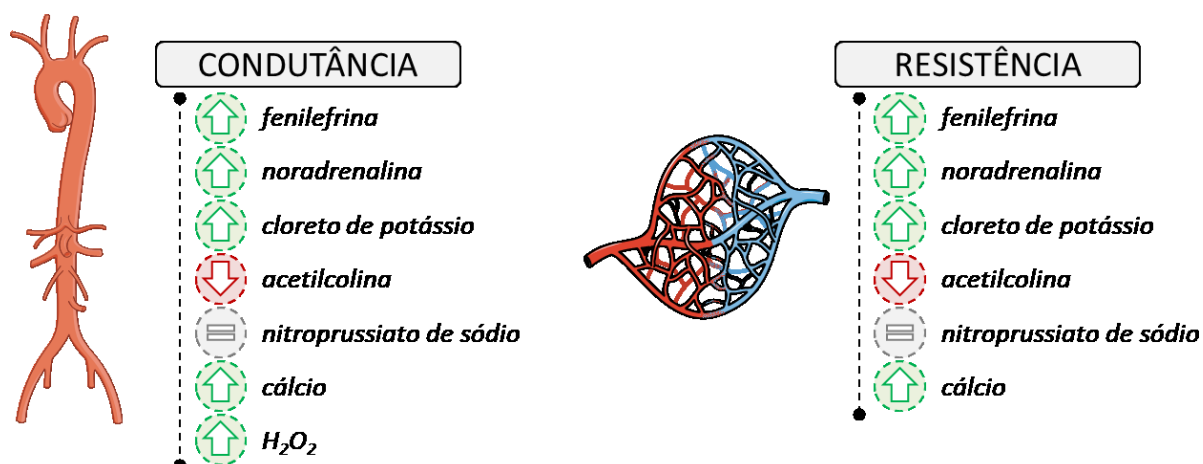
lisa através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Por sua vez, a hiper-reatividade apresentada pela noradrenalina estaria vinculada a dois componentes: à liberação de cálcio intracelular e ao influxo de cálcio extracelular.

Já no que concerne aos vasos de resistência, Ungvari et al. (1999), demonstram que em arteríolas de primeira ordem isoladas do músculo grácil de ratos diabéticos por 12 semanas, os resultados encontrados corroboram com aqueles que foram citados acima para a aorta: a) hiper-responsividade para noradrenalina; b) resposta prejudicada para acetilcolina; c) hiper-responsividade ao aumento da concentração de cálcio extracelular; e d) sem diferença para o nitroprussiato de sódio.

O estudo ainda demonstra que o nível de absorção de cálcio em repouso é maior nas preparações provenientes de animais diabéticos, o que pode ser explicado pela hiperpermeabilidade que a membrana apresenta a esse cátion. Outro achado é que o diabetes provoca nesses vasos um aumento da constrição miogênica induzida por pressão, que parece ser independente do comprometimento endotelial e atrelado ao aumento da atividade dos canais de cálcio dependentes voltagem e/ou da proteína cinase C, ambos, presentes na musculatura lisa arteriolar. Em suma, esse último achado pode significar aumento do tônus arteriolar e conseqüente redução da perfusão microvascular da musculatura esquelética *in vivo* (UNGVARI et al., 1999).

Utilizando a artéria mesentérica superior de ratos diabéticos, com indução por STZ, o estudo conduzido por Agrawal e McNeill (1987), demonstrou que a resposta contrátil de todos os agonistas testados foi maior do que as observadas nos controles, entre os agonistas estavam a noradrenalina, a fenilefrina, o potássio e o agonista dos canais de cálcio do tipo L, o BAY K 8644. A síntese de todos esses achados em vasos de condutância e vasos de resistência obtidos de animais diabéticos é apresentada na Figura 5.

Ainda, o estudo do leito vascular coronário de ratos diabéticos, 9 meses após a indução, realizado por Kamata et al. (2008), demonstrou a diminuição das respostas contráteis para altas concentrações de potássio, para acetilcolina e para a endotelina 1 (ET-1) e o aumento da resposta contrátil quando ativado canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L com o BAY K 8644, o qual ainda foi capaz de potencializar a vasoconstrição induzida pela acetilcolina nas preparações provenientes do grupo diabético.



**Figura 5 – Síntese das principais alterações encontradas em vasos de condutância e vasos de resistência obtidos de animais diabéticos.** Vasos de condutância: anéis de artéria aorta e artéria renal. Vasos de resistência: arteríolas de primeira ordem isoladas do músculo grácil e anéis de artéria mesentérica superior. ↑ grupo diabético apresentou hiperresponsividade ao agente vasoativo, quando comparado com o grupo controle; ↓ grupo diabético apresentou menor resposta ao agente vasoativo, quando comparado com o grupo controle; = grupo diabético não apresentou diferença no efeito desencadeado pelo agente vasoativo quando comparado com o grupo controle. Imagens: *Servier Medical Art*. Fonte: O autor, a partir dos dados apresentados nos seguintes estudos: Agrawal e McNeill (1987); Inazu, Sakai e Homma (1991); Kamata, Miyata e Kasuya (1989); Kobayashi e Kamata (2002); Majithiya e Balaraman (2006); Özyazgan et al. (2000); Shamsaldeen et al. (2019); Sotníková et al. (1999); Tang et al., (2011); Ungvari et al. (1999); e Xavier et al. (2003).

Analisando todos esses resultados obtidos com os vasos sanguíneos de animais diabéticos torna-se bastante evidente a presença da disfunção endotelial instaurada frente a um contexto hiperglicêmico. E como vimos, a regulação do fluxo sanguíneo de perfusão envolve processos de vasorrelaxamento e vasoconstrição, processos esses que dependem do íon cálcio para que ocorram, conforme veremos a seguir.

### 1.7 Um cátion, múltiplas funções

É notável o papel que o íon cálcio desempenha como mensageiro biológico. Tem papel fundamental na fase de platô do potencial de ação cardíaco e na velocidade do potencial do marcapasso. E é capaz de se ligar a uma vasta gama de efetores intracelulares e assim participar nos processos de excitação, contração muscular, atividades enzimáticas, dentre diversos outros (ZHENG; ZENG; WANG, 2015).

Também se sabe que num contexto hiperglicêmico, como o que é observado no diabetes, as funções fisiológicas desempenhadas pelo cálcio encontram-se prejudicadas. Por exemplo, a alteração na homeostase intracelular do cálcio é considerada como a principal contribuinte no comprometimento da função das células β-pancreáticas, onde há aumento da expressão de receptores de rianodina (RyR; do inglês *Ryanodine receptors*) e receptores de



inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R; do inglês *inositol trisphosphate receptor*). Muito embora, classicamente é aceito que o influxo de cálcio extracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem é quem desempenha o papel prioritário na secreção dos grânulos de insulina, a secreção está estimulada inicialmente através da resposta sensora ao aumento da glicemia realizado pela glicocinase (SANTULLI et al., 2017).

Além do diabetes, as deficiências no metabolismo do cálcio também são observadas nas doenças cardiovasculares, sendo que as próprias alterações no metabolismo do cálcio observadas no diabetes já são prejudiciais ao sistema cardiovascular (SMANI et al., 2019).

Já apresentamos anteriormente o endotélio, e já é bem estabelecido que as células endoteliais são capazes de modular a contratilidade das células do músculo liso vascular através de sinalização parácrina, secretando tanto fatores vasoconstritores, como fatores vasorelaxantes. Como exemplo de secreções vasoconstritoras temos as EROs, as endotelinas e as prostaglandinas; e como fatores vasorelaxantes podemos citar a prostaciclina e o óxido nítrico.

Ocorre que em todos esses processos acima citados, o cálcio citosólico é o principal impulsionador (BERTERO; MAACK, 2018; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; WANG et al., 1996); tanto nas células endoteliais quanto nas células da musculatura lisa vascular. O evento que está associado a todos esses processos é o influxo e/ou a mobilização de cálcio, que ocorrem através de canais de cálcio. E, em suas vias de sinalização celular, o cálcio pode contar com a participação das proteínas ligantes de cálcio, como, por exemplo, a calmodulina, troponina C e a calsequestrina.

Normalmente, a concentração do cálcio citosólico é mantida em baixos níveis (~100 a 200 nM) pela ação de numerosas proteínas ligantes de cálcio e bombas de cálcio ATPases (RASMUSSEN, 1986). E dois processos são capazes de ocasionar o aumento da concentração de cálcio citosólico: o influxo ou entrada de cálcio extracelular e a mobilização ou liberação de cálcio intracelular.

Alguns sinais de cálcio podem resultar em um aumento nos níveis de cálcio de forma sustentada e uniforme em toda a célula, porém outros podem ocorrer apenas de forma transitória. E, uma vez que estes sinais podem se apresentar espacialmente restritos ou localizados, essas formas de apresentação podem, além de limitar a toxicidade celular do cálcio, servir para dar uma maior especificidade ao cálcio em seu alvo a jusante (NAVEDO et al., 2005).

Para que ocorra uma localização espacial do sinal é importante a existência de agrupamentos de canais de cálcio em microdomínios específicos na membrana plasmática,

além da participação das proteínas ligantes de cálcio e da alta viscosidade do citosol que atuam como fatores limitantes para a difusão do cálcio (OTTOLINI; HONG; SONKUSARE, 2019). Nas células da musculatura lisa vascular, sinais globais de cálcio estão envolvidos no processo de vasoconstrição; por sua vez, sinais localizados atuam sobre canais de potássio ativados por cálcio ( $K_{Ca}$ ), ocasionando hiperpolarização e consequente vasodilatação (NELSON et al., 1995).

O influxo ou entrada de cálcio extracelular dependerá de canais iônicos presentes na membrana celular. O aumento na concentração global de cálcio intracelular é regido principalmente pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC; do inglês *voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels*), os quais são controlados pelo potencial de membrana (LEDOUX et al., 2006). O influxo de cálcio promovido pelos VDCC também é capaz de ativar canais iônicos ativados por cálcio presentes na membrana plasmática (NAVEDO et al., 2005).

Mesmo quando ocorre a hiperpolarização da membrana, devido à ativação dos canais de potássio ativado por cálcio de baixa condutância (SK3) e dos canais de potássio ativado por cálcio de condutância intermediária (IK), o influxo de cálcio não cessa, pois, a hiperpolarização gerada é capaz de ativar os canais de potencial receptor transitório (TRP; do inglês *Transient receptor potential*) presentes nas células endoteliais permitindo o influxo de cálcio (LEDOUX et al., 2006). Também a proteína cinase C (PKC) é capaz de ativar os VDCC do tipo L e, assim, promover o influxo de cálcio (FISH et al., 1988; GLEASON; FLAIM, 1986).

Por sua vez, a mobilização ou liberação de cálcio intracelular dependerá da participação dos  $IP_3R$  ou dos  $RyR$ . Os  $IP_3R$  são canais de cálcio operados por receptor sensíveis ao inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), este proveniente da degradação de fosfolipídios de membrana (FOSKETT et al., 2007; MIKOSHIBA, 2007). E o aumento na concentração intracelular de cálcio através dos  $IP_3R$  já foi demonstrado como o responsável pelo componente fásico da resposta contrátil a agonistas (ABDEL-LATIF, 1989; FRANSEN et al., 2015; KOBAYASHI et al., 1989). Já os  $RyR$  são canais de liberação de cálcio sensíveis à rianodina que atuam como mediadores da liberação de cálcio induzida por cálcio (LANNER et al., 2010).

O cálcio é transportado para o retículo através de  $Ca^{2+}$ -ATPases do retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA). Em condições de repouso essas ATPases têm sua atividade inibida pela proteína fosfolambana (PBL), porém uma vez que essa proteína é fosforilada pela proteína cinase A (PKA) ou pela proteína cinase G (PKG), ela deixa de inibir a SERCA, permitindo a captação de cálcio pelo retículo (SIMMERMAN; JONES, 1998). As PBL, inicialmente descritas em células musculares cardíacas, também estão presentes nas

células da musculatura lisa (RAEYMAEKERS; JONES, 1986). Uma vez dentro do retículo, o cálcio se liga a proteínas de ligação de cálcio mantendo assim a concentração de cálcio citosólica livre em níveis baixos. Essa estocagem de cálcio citosólico também é realizada pelas mitocôndrias (NICHOLLS, 2005; PENG; WONG; KRAINIC, 2020; POZZAN et al., 1994).

Para que ocorra contração das células da musculatura lisa vascular, o cálcio, que teve sua concentração no citosol elevada, precisa se ligar à proteína citosólica calmodulina (CaM), formando o complexo conhecido como  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Este complexo ativa a cinase de cadeia leve da miosina (MLCK; do inglês *Myosin light chain kinase*) que passa a fosforilar a miosina. Uma vez fosforilada, a miosina passa a interagir com a actina, ligando-se a esta, e formando as pontes cruzadas, resultando no processo de contração muscular. O retorno aos níveis basais da concentração intracelular do cálcio possibilita que a fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP; do inglês *Myosin light chain phosphatase*) passe a desfosforilar a miosina, formando as pontes trancadas e devolvendo o nível tônico basal à musculatura (HONG et al. 2011; IRVINE, 1992; KRUEGER et al., 1997; NISHIMURA; BREEMEN, 1989). E diversas são as formas de se estudar a mobilização de cálcio para que a contração muscular ocorra, entre elas estão os estudos funcionais utilizando o banho de órgãos isolados (KARAKI; KUBOTA; URAKAWA, 1979).

## **1.8 Um olhar para o periférico**

Em suma, é perceptível que o diabetes descompensado ocasiona diversas complicações cardiovasculares em seus portadores. E uma dessas complicações é a úlcera do pé diabético que ocorre devido à neuropatia e a traumas. Quando a úlcera do pé diabético ocorre juntamente com a doença arterial periférica o paciente é considerado como tendo isquemia crítica do membro (BANDYK, 2018) e sabe-se que 15% dos diabéticos irão apresentar em algum momento da vida úlceras de pé. Além disso, com uma incidência de 3% a 4% entre os diabéticos, os que desenvolvem úlceras de pé diabético apresentam uma incidência 8% maior de vir a necessitar realizar a amputação de membro inferior (PARVIZI; KIM, 2010).

Por sua vez, a doença arterial periférica permanece assintomática por muito tempo e geralmente só apresenta suas manifestações clínicas em estágios avançados, sendo a claudicação intermitente a manifestação mais conhecida. As formas mais graves da doença arterial periférica incluem a isquemia crítica de membros, com significativa redução do fluxo sanguíneo, principalmente aos membros inferiores. E nos casos mais graves há

desenvolvimento de gangrenas e ulcerações que podem precipitar a amputação da perna (TZOULAKI; FOWKES, 2017).

Apesar de haver diversos estudos focados nas alterações do fluxo sanguíneo em membros inferiores de pacientes diabéticos (por exemplo: BOULTON, 2019; EDMONDS; ROBERTS; WATKINS, 1982; PUREWAL et al., 1995), são poucos os estudos utilizando modelos animais para avaliar alterações dos vasos periféricos. Dentre esses, também se percebe que os poucos que avaliaram a perfusão sanguínea em membros posteriores de animais com diabetes, utilizavam o modelo de isquemia induzida pela oclusão da artéria femoral (BIR et al., 2008; CORCORAN et al., 2009; IWABAYASHI et al., 2012). Todas essas informações contribuem para evidenciarmos que os estudos existentes são insuficientes para a compreensão das alterações na biologia do leito vascular da musculatura esquelética em animais diabéticos. E é essa a lacuna que o desenvolvimento desse estudo busca preencher.

Aliado a isso, também percebemos que os métodos existentes eram limitados para a avaliação da reatividade do leito vascular da musculatura esquelética. Dessa forma, um dos objetivos desse estudo foi desenvolver um método de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética baseado na técnica de perfusão do *hindquarter* (quarto traseiro), descrita inicialmente por Ruderman, Houghton e Hems (1971), permitindo assim o estudo da função do leito vascular da musculatura esquelética utilizando mais de uma droga ou mesmo a associação de drogas. Assim, foi desenvolvido o presente estudo com a finalidade de avaliarmos como a hiperglicemia impacta a função vascular e sua relação com os vasos que irrigam a musculatura esquelética de animais numa fase precoce do diabetes. O conhecimento dos prejuízos detectados em fases precoces de qualquer patologia, assim como dos mecanismos envolvidos, é bastante útil para o desenvolvimento de medidas eficazes de tratamento e, quiçá, de cura.

Dessa forma, a hipótese desse trabalho é que a disfunção vascular nas fases iniciais do diabetes contribui para a má perfusão da musculatura esquelética mais tardiamente.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar a função vascular no diabetes precoce e a sua contribuição para a perfusão da musculatura esquelética em ratas mais tardiamente.

### **2.2 Objetivos específicos**

1) Caracterizar a indução do diabetes com a administração intraperitoneal de STZ em ratas;

2) Avaliar o efeito sistêmico da administração de agonistas adrenérgicos (adrenalina, fenilefrina e isoprenalina) e dos vasodilatadores acetilcolina e nitroprussiato de sódio sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca, o fluxo sanguíneo renal e o fluxo sanguíneo do músculo esquelético em ratas diabéticas após uma e quatro semanas da indução do diabetes;

3) Padronizar um novo método para estudo do leito vascular da musculatura esquelética em roedores utilizando um sistema de perfusão de órgãos isolados;

4) Mensurar o efeito da administração de agonistas adrenérgicos (adrenalina, fenilefrina e isoprenalina) e dos vasodilatadores acetilcolina e nitroprussiato de sódio sobre a pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética proveniente de ratas diabéticas após quatro semanas da indução do diabetes;

5) Determinar a participação das EROs sobre as respostas evocadas pelos agonistas adrenérgicos adrenalina e fenilefrina no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas após quatro semanas da indução do diabetes; e

6) Investigar a contribuição do cálcio intracelular e extracelular na reatividade do leito vascular da musculatura esquelética proveniente de ratas diabéticas após quatro semanas da indução do diabetes.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar fornecidas pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com idade entre 50 e 120 dias e peso corpóreo entre 132 a 234 g. As ratas foram aclimatizadas e mantidas no biotério setorial do Departamento de Farmacologia da UFSC, abrigadas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 h e com acesso *ad libitum* à água e à ração (Biotec Ratos e Camundongos/BioBase Alimentação Animal Ltda., Águas Frias, Santa Catarina, Brasil).

Com aproximadamente 53 dias de idade, as ratas foram conduzidas ao Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Cardiovascular, onde os animais eram alojados em rack ventilado com injeção individual e direta de ar (Série VentiLife 25, ALESCO<sup>®</sup>); em seus mini-isoladores, dimensões externas de 48,3 cm de comprimento x 33,7 cm de largura x 21,4 cm de altura, foram mantidos de 3 a 6 animais por caixa. As ratas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente: temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , controlada com auxílio de termômetro digital, e com ciclo claro/escuro de 12 h, controlados por temporizador analógico programável. A cama de maravalha era trocada três vezes por semana; todavia, para os animais do grupo diabético (tratado com STZ) a troca era diária.

Todos os procedimentos utilizados na condução deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo nº 5057160718.

#### 3.2 Drogas e reagentes

Para execução desse estudo foram utilizados:

##### **I – Tampão fosfato de sódio (PBS, do inglês *Phosphate-buffered saline*) estéril**

Composto por: cloreto de sódio (NaCl; 137 mM), cloreto de potássio (KCl; 2,7 mM), fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,5 mM) e fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 10,8 mM), todos procedentes da Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha).

##### **II – Soluções fisiológicas**

###### *• Solução fisiológica nutritiva*

Composta por: NaCl (131,3 mM), KCl (4,7 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,18 mM), sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,17 mM), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ; 14,9

mM), D(+)-glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ; 5,5 mM), cloreto de cálcio dihidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 1,6 mM) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; 0,03 mM).

•*Solução fisiológica nutritiva sem cálcio*

Composta por: NaCl (131,3 mM), KCl (4,7 mM),  $KH_2PO_4$  (1,18 mM),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1,17 mM),  $NaHCO_3$  (14,9 mM), D(+)-glucose (5,5 mM) e EDTA (0,03 mM).

•*Solução fisiológica despolarizante*

Composta por: NaCl (70,1 mM), KCl (59,9 mM),  $KH_2PO_4$  (1,18 mM),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1,22 mM),  $NaHCO_3$  (15 mM), D(+)-glucose (5,5 mM), e  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (1,6 mM).

•*Solução fisiológica despolarizante sem cálcio*

Composta por: NaCl (76,3 mM), KCl (60 mM),  $KH_2PO_4$  (1,18 mM),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1,17 mM),  $NaHCO_3$  (14,9 mM), D(+)-glucose (5,5 mM) e EDTA (0,03 mM).

Todos os sais procedentes da Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha), apenas o EDTA procedente da Sigma Chemical<sup>®</sup> (Saint Louis, EUA).

### **III – Anestésicos e anticoagulante**

Cloridrato de cetamina 10% (100 mg/mL) e cloridrato de xilazina 2% (20 mg/mL) (Syntec do Brasil Ltda; São Paulo, Brasil); cloridrato de lidocaína 2% (20 mg/mL) (Cristália; São Paulo, Brasil); e heparina sódica (5.000 U.I./mL) (Blau Farmacêutica S.A.; São Paulo, Brasil).

### **IV – Ferramentas farmacológicas**

Adrenalina, apocinina (4-hidróxi-3-metoxiacetofenona/acetovanilona), dimetilsulfóxido (DMSO), fenilefrina e isoprenalina (Sigma Chemical; Saint Louis, EUA); acetilcolina e nitroprussiato de sódio (Merck KGaA; Darmstadt, Alemanha); STZ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Dallas, TX, EUA); e citrato de sódio (Labsynth Produtos para Laboratórios LTDA; Diadema, SP, Brasil). A apocinina foi dissolvida em DMSO e diluída em solução salina fisiológica, o citrato de sódio foi diluído em água Milli-Q e ajustado para um pH 4,5 originando o tampão citrato de sódio 0,1 M, a STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M gelado minutos antes de ser utilizada e os demais sais foram dissolvidos em água destilada e diluídos em solução salina fisiológica ou PBS, conforme os protocolos experimentais.

## **3.3 Procedimentos experimentais**

### **3.3.1 Indução do diabetes químico**



Com idade de aproximadamente 53 dias, as ratas eram alocadas no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Cardiovascular. Este era considerado o primeiro dia da semana basal. No último dia da semana basal os valores glicêmicos foram medidos nas ratas no período da manhã e à tarde elas eram colocadas em jejum. No dia seguinte, primeiro dia da semana 1, foi realizada a administração de STZ, preparada no momento da administração em quantidade suficiente, para a indução de um estado de hiperglicemia crônico e persistente nos animais.

O protocolo utilizado foi adaptado de Junod et al. (1967). De modo breve, no sétimo dia da semana basal, retirava-se a ração de todas as caixas, mantendo-se apenas o livre acesso das ratas à água. Após o período de 18 h de jejum, as ratas eram pesadas e, em uma sala escura, recebiam uma única injeção de STZ (50 mg/Kg) por via intraperitoneal. De modo semelhante eram tratadas as ratas do grupo controle, porém recebiam o veículo, tampão citrato de sódio 0,1 M gelado, pH ~4,5, em igual volume no lugar da STZ. Após a administração da droga ou do veículo, as ratas eram devolvidas às suas caixas e, somente após 2 h a ração era repostada. Permanecendo, a partir desse momento, os grupos com livre acesso à ração e à água até o momento dos experimentos.

A glicemia capilar era mensurada 72 h após a administração da STZ ou veículo utilizando uma gota de sangue da veia caudal adicionada à tira de teste impregnada com glicose-desidrogenase (Accu-Check<sup>®</sup> Active, Roche). No grupo tratado com STZ, somente as ratas com glicemia acima de 250 mg/dL foram consideradas como diabéticas (SIBA et al., 2017; OZCAN et al., 2017; LIN et al., 2017).

Apenas duas ratas apresentaram glicemia abaixo de 250 mg/dL, estas, após três dias, foram novamente colocadas em jejum e realizada a administração de STZ pela segunda vez, conforme o protocolo acima, e passaram a apresentar glicemia acima de 250 mg/dL sendo alocadas ao grupo diabéticas. Todas as ratas que receberam veículo tiveram seus valores glicêmicos menores que 250 mg/dL. A partir desse momento, as ratas foram pesadas semanalmente e verificada a sua glicemia capilar ao final da primeira ou da quarta semana após a administração da STZ ou veículo, isto é, antes da realização dos experimentos, para maiores detalhes ver Figura 7.

### 3.3.2 Medida direta da pressão arterial em animal anestesiado

Para a condução destes experimentos, as ratas eram anestesiadas por via intramuscular (i.m.), com uma mistura de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg), e sempre que necessário recebiam reforço de um terço da dose. As ratas diabéticas recebiam apenas 75%

das doses iniciais dos anestésicos utilizados para evitar morte por *overdose* anestésica nesses animais, o que era comumente observado quando se utilizava a dose completa.

Após a mistura anestésica iniciar seus efeitos, as ratas eram então colocadas em decúbito dorsal sobre uma manta térmica com chave reguladora de temperatura (Sonobel Produtos Térmicos; Pelotas, RS) mantida a aproximadamente 37° C para evitar a hipotermia nos animais (ANTON et al., 2019). Durante o experimento, a temperatura da manta térmica era monitorada ininterruptamente com o auxílio de um termômetro digital e a temperatura da sala era mantida constante a 24° C.

A constatação da anestesia profunda era realizada através do pinçamento da cauda e observação da ausência dos reflexos oculares. E, uma vez confirmada a obtenção do estado anestésico profundo, era realizada uma incisão na face ventral da coxa esquerda dos animais para exposição da veia femoral comum esquerda, a qual era imediatamente isolada permitindo a canulação da mesma com uma agulha 23G x 1” (0,6 x 25 mm), conectada a uma cânula de polietileno (PE 20). Assim que o acesso era obtido administrava-se 100 µL de uma solução de heparina preparada em PBS estéril (~33,1 UI/mL) e, a partir desse momento, o acesso se encontrava pronto para a administração sistêmica das drogas a serem utilizadas.

Logo em seguida, era realizada uma incisão na região ventral cervical dos animais, e o músculo esterno-hióideo era seccionado para exposição da traqueia; nesse momento, com auxílio de pinças curvas era realizada a exposição da artéria carótida comum direita, a qual, após ser totalmente separada dos tecidos conectivos e do nervo vago, tinha a sua porção distal isolada e o fluxo sanguíneo interrompido. A artéria era canulada com auxílio de um cateter flexível 22G x 1” (0,9 x 25 mm), o qual era afixado à artéria com o auxílio de um fio de nylon e acoplado a um transdutor de pressão descartável que permitia a aferição da pressão arterial média (PAM), da pressão arterial sistólica (PAS), da pressão arterial diastólica (PAD), ambas em mmHg, e da frequência cardíaca em bpm.

Para facilitar a respiração espontânea, sempre que necessária, era realizada uma traqueostomia nos animais (SILVA et al., 2015), através de uma incisão no ligamento anular entre os arcos cartilagosos próximos à cartilagem cricóide, seguida pela introdução de uma haste adaptada na luz da traqueia, até a proximidade da carina.

Para a mensuração do fluxo sanguíneo cortical renal, um botão anestésico com lidocaína (2 mg, via intradérmica) era realizado na região lateral esquerda das ratas para exposição do músculo oblíquo externo esquerdo do abdômen, no qual, após receber injeção do botão anestésico de lidocaína (2 mg, via intramuscular), era feita uma incisão (~2,5 cm), a qual permitia a localização do rim esquerdo. Neste momento, um sonda de fibra óptica (DP2b,

Moor Instruments, Inglaterra), acoplada a um sistema *Laser Doppler* (modelo VMS-LDF2; Moor Instruments, Inglaterra) era posicionada sobre a superfície ventral do rim esquerdo permitindo a mensuração do fluxo sanguíneo renal (em unidades arbitrárias), conforme descrito por Flemming et al. (2000), com algumas modificações.

Para avaliarmos o fluxo sanguíneo muscular, uma incisão (~1,5 cm) foi realizada na perna direita das ratas na altura do músculo gastrocnêmio e, utilizando o mesmo aparelho acima descrito para a aferição do fluxo sanguíneo renal, a outra sonda de fibra óptica foi posicionada sobre a cabeça medial do músculo gastrocnêmio permitindo a mensuração do fluxo sanguíneo muscular (em unidades arbitrárias).

Os protocolos experimentais que utilizaram a medida direta da pressão arterial em animais anestesiados eram realizados com apenas um animal por vez e os animais dos grupos experimentais eram intercalados. Ao término dos experimentos, as ratas foram eutanasiadas através da administração intravenosa em *bolus* de uma *overdose* anestésica.

### 3.3.3 Perfusão do leito vascular da musculatura esquelética

Para a realização da perfusão do leito vascular da musculatura esquelética, as ratas eram anestesiadas por via intraperitoneal, com uma mistura de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg), seguida pela administração de heparina sódica (2 UI/animal; via intraperitoneal) para evitar a formação de coágulos no leito vascular a ser isolado. Após a constatação da anestesia profunda, através do pinçamento da cauda e da observação de ausência dos reflexos oculares, as ratas eram posicionadas em decúbito dorsal sobre a bancada e então os procedimentos cirúrgicos eram iniciados.

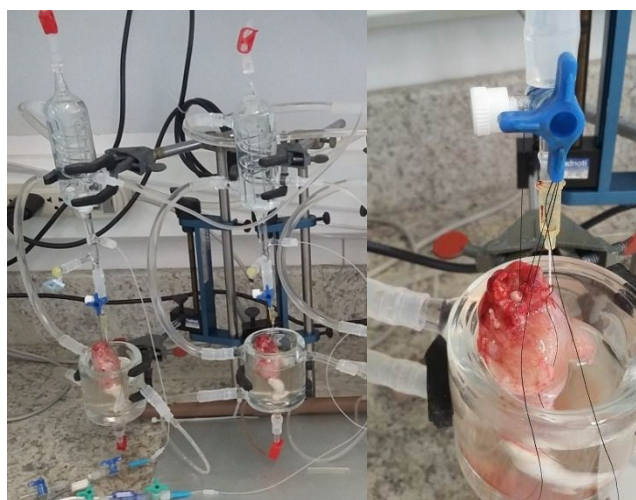
Inicialmente era realizada uma pequena incisura (~1 cm) na pele das ratas localizada na região da coxa esquerda, e através dessa pequena incisura a ponta de uma tesoura era inserida e iniciava-se o processo de divulsionamento de toda a perna do animal, o qual permitia a retirada completa de toda a pele que envolvia os músculos da perna.

Após o divulsionamento, a artéria femoral comum esquerda era localizada e isolada dos tecidos conectivos e da veia femoral comum esquerda, sendo então posicionados dois fios de nylon em volta da artéria femoral. O primeiro fio de nylon era conduzido até a altura da artéria ilíaca externa, que tinha sua porção distal isolada e o fluxo sanguíneo interrompido. A artéria era canulada com auxílio de um cateter flexível 24G x 3/4" (0,7 x 19 mm), o qual era afixado à artéria com o auxílio do outro fio de nylon.

Nesse momento, a veia femoral comum esquerda era seccionada, permitindo assim o efluxo sanguíneo. E, após ter sua abertura externa lavada com solução fisiológica nutritiva para retirada do sangue, ao cateter era acoplada uma seringa descartável. Com o auxílio da seringa descartável eram administrados 5 mL de solução fisiológica nutritiva para realizar a lavagem do leito vascular da perna isolada. Então o animal era sacrificado com uma *overdose* anestésica por via intracardiaca e a perna esquerda era totalmente separada do corpo.

À cabeça do fêmur era amarrado um fio de nylon (~20 cm) e então a perna isolada era conduzida e acoplada ao sistema de perfusão de órgão isolado, sendo conectada a este com o auxílio do cateter e, para oferecer maior suporte, o fio de nylon preso à cabeça do fêmur também era amarrado ao sistema de perfusão, conforme Figura 6.

O sistema de perfusão de órgãos isolados consistia em: a) um banho-maria, que mantinha de forma constante a temperatura do sistema e das soluções de perfusão a 37° C; b) uma bomba d'água portátil, que propiciava a recirculação da água aquecida pelo sistema através dos espaços pneumáticos das cubas de vidro; c) uma cuba de vidro com sistema cata-bolha, uma serpentina para aquecimento da solução de perfusão e três acessos externos, onde cada um permitia de forma única e exclusiva a perfusão da perna isolada, a administração de drogas ou o acoplamento do transdutor; d) uma cuba de vidro com capacidade de 100 mL para acomodação do órgão isolado em solução salina nutritiva aquecida; e) uma bomba peristáltica eletrônica para o controle da velocidade do fluxo da perfusão; e f) um transdutor de pressão descartável.



**Figura 6 – Perfusão da musculatura esquelética do quadrante posterior esquerdo de *Rattus norvegicus* utilizando o sistema de perfusão de órgãos isolados.** À esquerda mostram-se os quadrantes posteriores nas cubas acoplados ao sistema de perfusão. À direita observa-se um zoom de um dos quadrantes demonstrando o ponto de apoio (cabeça do fêmur) utilizado no método de Perfusão de Perna Isolada. Fonte: O autor.

Uma vez acoplado ao sistema de perfusão acima descrito, a perna isolada passava a ser perfundida com solução salina nutritiva aerada com mistura carbogênica (composição: 95% de O<sub>2</sub> para 5% de CO<sub>2</sub>), à temperatura de 37° C e um fluxo constante de 4 mL/min. Era respeitado um intervalo de 30 min antes do início dos protocolos para a estabilização das preparações.

O registro dos dados era realizado com o auxílio do transdutor de pressão, que permitia a detecção da pressão interna do sistema, o qual estava interligado a um sistema eletrônico de aquisição de dados (LabChart v7.00 AD Instruments; Austrália), onde eram registrados os dados dos leitos vasculares referentes à pressão de perfusão (mmHg).

### **3.4 Protocolos experimentais**

#### **3.4.1 Caracterização do diabetes químico**

A fim de caracterizar a indução do diabetes pela administração de STZ nas ratas, foram avaliados os seguintes parâmetros: o ganho de peso corpóreo, a glicemia capilar, a ingesta de água e de ração e a diurese. As ratas do grupo controle também foram avaliadas para comparação.

##### Avaliação do peso corpóreo

As ratas foram pesadas: 1) no primeiro dia da semana basal; 2) antes do início do jejum; 3) ao final do jejum de 18 h; 4) 72 h após a administração da STZ ou veículo; e 5) semanalmente, até o término da quarta semana. Os animais do grupo experimental semana 1 foram pesados apenas até o final da primeira semana. Os resultados foram expressos em g.

##### Avaliação da glicemia capilar

A glicemia capilar das ratas foi aferida em três momentos distintos: 1) no último dia da semana basal, isto é, antes da administração de veículo ou STZ, para verificação dos valores glicêmicos basais; 2) após a administração da STZ ou veículo (72 h) para a classificação dos grupos experimentais; e 3) ao final da primeira ou da quarta semana, conforme os grupos experimentais em que as ratas foram alocadas. Uma vez que o aparelho utilizado para a aferição da glicemia possuía uma faixa de medição entre 10 e 600 mg/dL, aos valores acima

da faixa de detecção foi atribuído o valor de 601 mg/dL para a confecção dos resultados apresentados neste trabalho. Os resultados foram expressos em mg/dL.

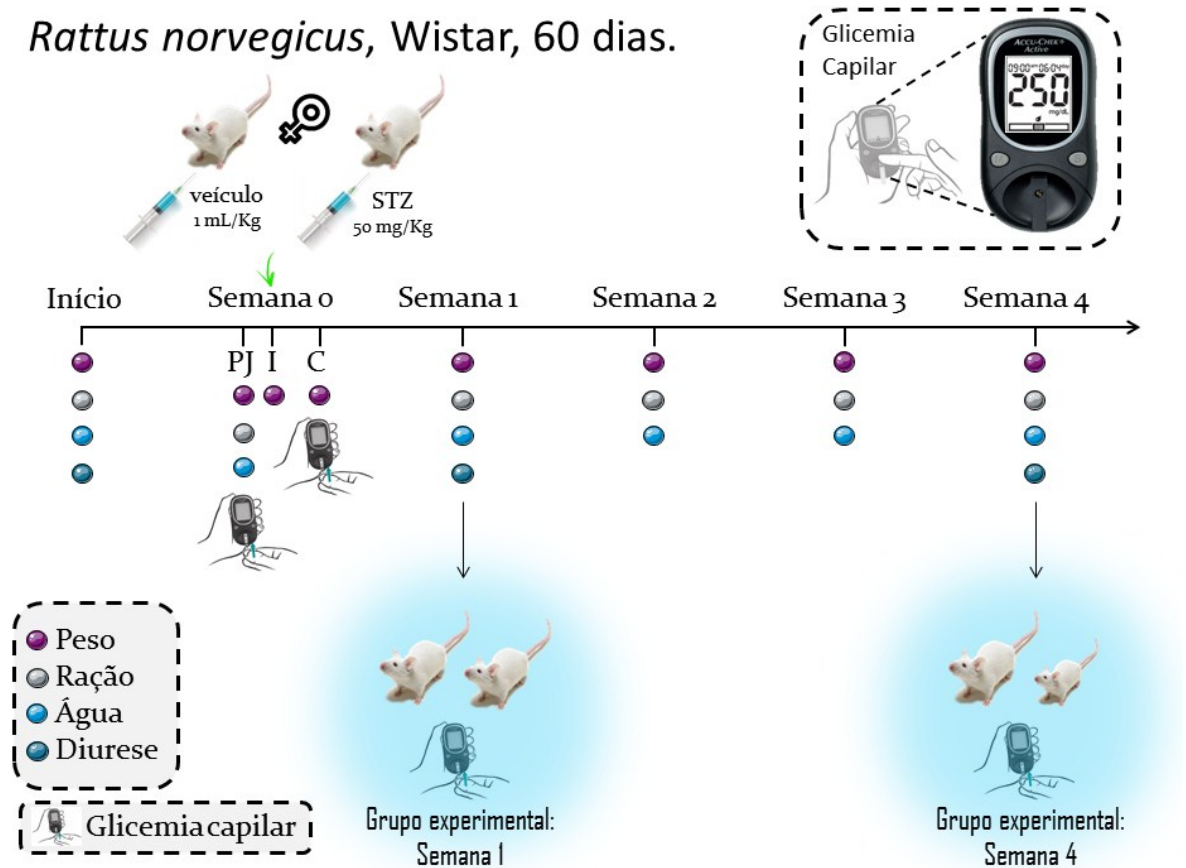
#### Avaliação da ingestão de comida e água

Para a avaliação da ingestão de comida e água, a ração e a água foram mensuradas no decorrer das semanas, a partir da semana basal até a quarta semana após a administração da STZ ou veículo. A ração era pesada em balança digital eletrônica e a água era medida em proveta de vidro graduada antes dos animais serem separados nos grupos experimentais e dispostos em suas respectivas caixas. Ração e água eram disponibilizadas aos animais *ad libitum*.

No decorrer de cada semana, sempre que necessário fazer reposições, as quantidades residuais de ração e de água eram anotadas, assim como as quantidades que eram repostas nas caixas. Era realizada a soma cumulativa semanal por caixa da quantidade de ração e de água e o valor era dividido pelo peso total dos animais da caixa. Após encontrar o valor de ração e água equivalentes a 1 g, este coeficiente era multiplicado pelo peso individual das ratas para determinar o consumo por animal. Os resultados foram expressos em razão do peso dos animais: em mL/g, para a ingestão de água, e em g/g, para o consumo de ração.

#### Avaliação da diurese

Para avaliação da diurese, uma aclimação das ratas antes dos experimentos foi realizada, sendo elas colocadas em gaiolas metabólicas durante 4 h para reconhecimento do ambiente e, após esse período, retornavam para as suas caixas. Ainda dentro da semana basal, as ratas eram novamente alocadas nas gaiolas metabólicas sendo, a partir desse momento, verificado o volume urinário coletado nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 h. Ao final da primeira e da quarta semana após a administração de STZ ou veículo verificava-se novamente o volume urinário excretado pelas ratas. A excreção urinária cumulativa foi expressa em volume urinário (mL) por peso de animal (100 g).



**Figura 7 – Fatores avaliados antes e após a administração de estreptozotocina ou veículo em ratos.** Para a administração da estreptozotocina (STZ; 50 mg/Kg) ou veículo foram utilizadas ratas com idade próxima a sessenta dias na Semana 0. Na linha temporal é apresentado o dia que as ratas eram recebidas (Inicial) e as semanas seguintes (Semana 0 a Semana 4). Conforme legenda disponível na própria imagem, os parâmetros avaliados estão identificados no decorrer das semanas. PJ- pré-jejum. I- indução. C- classificação das ratas nos grupos experimentais. Todas as ratas incluídas no grupo diabéticas, tanto do Grupo experimental Semana 1 quanto do Grupo experimental Semana 4, apresentaram glicemia capilar acima de 250 mg/dL no momento da classificação (C). Ao final da Semana 1 ou Semana 4, conforme o grupo experimental dos animais, uma última mensuração da glicemia capilar era feita e os animais seguiam para os experimentos. Fonte: O autor.

### 3.4.2 Avaliação da função vascular sistêmica

Para a avaliação da função vascular sistêmica, utilizamos as ratas controle e diabéticas após 1 e 4 semanas da administração de veículo ou STZ, respectivamente, preparadas para o registro da pressão arterial e do fluxo sanguíneo muscular e fluxo sanguíneo renal, conforme descritos nos itens 3.3.1 e 3.3.2, respectivamente. Após 20 min de estabilização iniciavam-se os protocolos. Neste conjunto de experimentos foram realizados dois protocolos experimentais:

1) Curva dose resposta para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg), acetilcolina (0,1, 1, 10 e 100 nmol/Kg) e nitroprussiato de sódio (0,1, 1, 10 e 100 nmol/Kg), conforme apresentado no Apêndice B (Protocolo experimental 8); e

2) Curva dose resposta para adrenalina (3, 10 e 30 nmol/Kg) e isoprenalina (0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 nmol/Kg), conforme apresentado no Apêndice B (Protocolo experimental 9).

Sempre respeitando um intervalo de 5 min entre as doses ou o retorno aos valores basais. Os resultados foram expressos em delta do efeito máximo ocasionado (mmHg) e em área sob a curva dos efeitos observados (unidades arbitrárias).

### 3.4.3 Avaliação do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas

Uma vez padronizada a perfusão do leito vascular da musculatura esquelética, investigamos a reatividade vascular desse leito utilizando ratas diabéticas e controles provenientes do grupo experimental 4 semanas. Dessa forma, para avaliarmos a reatividade vascular do leito da musculatura esquelética aos agentes vasoconstritores e vasorrelaxantes, foram realizados os seguintes protocolos experimentais:

#### Protocolo I: Curva dose resposta para fenilefrina, acetilcolina e isoprenalina

Com as preparações prontas para o início do experimento, uma curva dose resposta para fenilefrina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) foi realizada. Logo em seguida o líquido de perfusão (solução fisiológica nutritiva) foi trocado por outro de mesma composição contendo fenilefrina (3  $\mu$ M). Após 30 min de perfusão com a fenilefrina, uma curva dose resposta para acetilcolina (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 nmol) foi realizada, seguida por uma curva dose resposta para isoprenalina (0,01, 0,1 e 1 nmol), conforme demonstrado no Apêndice B (Protocolo experimental 10).

#### Protocolo II: Curva dose resposta para adrenalina e nitroprussiato de sódio

Com as preparações prontas para o início do experimento, uma curva dose resposta para adrenalina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) foi realizada. Logo em seguida a solução fisiológica nutritiva foi trocada por solução fisiológica nutritiva contendo fenilefrina (3  $\mu$ M). Após 30 min de perfusão com a fenilefrina foi realizada uma curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio (0,1, 1, 10 e 100 nmol), com intervalos entre as doses de 5 a 10 min, conforme demonstrado no Apêndice B (Protocolo experimental 11).



### Protocolo III: Curva dose resposta para cloreto de cálcio em solução nutritiva sem cálcio

Com as preparações prontas para o início do experimento, a solução fisiológica nutritiva (líquido de perfusão) era trocada pela solução fisiológica nutritiva sem cálcio durante 30 min. Logo em seguida, uma segunda troca era realizada, agora por uma solução fisiológica nutritiva sem cálcio contendo fenilefrina numa concentração de 3  $\mu$ M. Após 30 min de perfusão com este novo líquido de perfusão, uma curva dose resposta para o cálcio (10, 30, 100 e 300 nmol e 1, 3, 10 e 30  $\mu$ mol) era realizada, conforme demonstrado no Apêndice B (Protocolo experimental 12).

### Protocolo IV: Influência das espécies reativas nas respostas evocadas por agentes vasoconstritores no leito vascular periférico

Com as preparações prontas para o início do experimento foi realizada a troca do líquido de perfusão por outro de mesma composição contendo apocinina (1 mM). Após 30 min de perfusão com apocinina nas preparações, uma curva dose resposta para fenilefrina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) e outra para adrenalina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) foram realizadas, conforme demonstrado no Apêndice B (Protocolo experimental 13).

## **3.5 Análise estatística**

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas ou ANOVA de uma via, ambas seguidas pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, ou pelo teste *t* de *Student* para comparações simples, quando apropriados. Somente valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os gráficos foram elaborados no *GraphPad Prism* (GraphPad Software<sup>®</sup>, La Jolla, CA, USA).

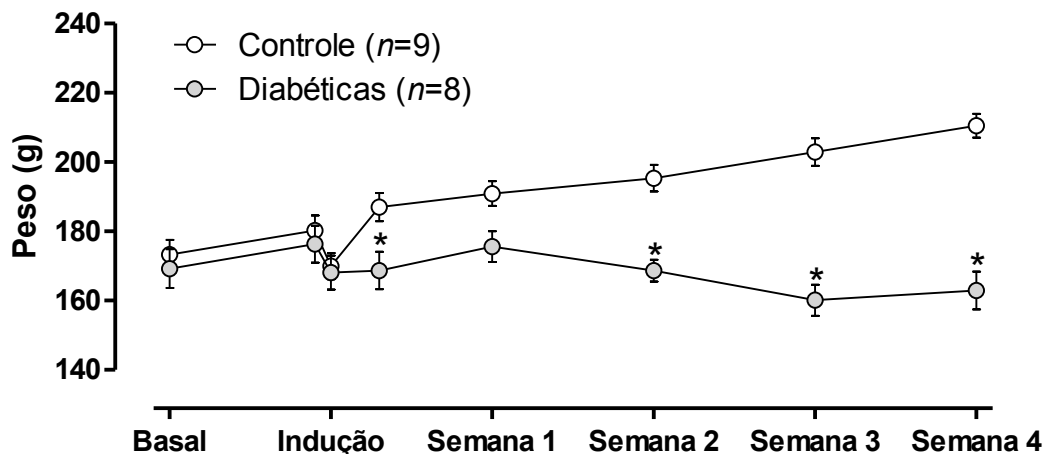


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização do diabetes químico em ratas

#### 4.1.1 STZ proporciona perda no ganho de peso corpóreo

A Figura 8 apresenta o peso corpóreo de ratas antes e após administração de STZ ou veículo, em gramas, no decorrer das semanas. Em cinco semanas, as ratas do grupo controle tratadas com veículo tiveram um aumento ponderal progressivo no peso corpóreo, com um incremento em torno de 21%, passando de valores próximos a 173 g para 210 g. Por sua vez, a administração de STZ foi capaz de impedir este aumento no ganho de peso corpóreo em torno de 23% e ainda ocasionou uma perda de aproximadamente 4% em relação ao peso inicial das ratas, conforme demonstrado na Figura 8.

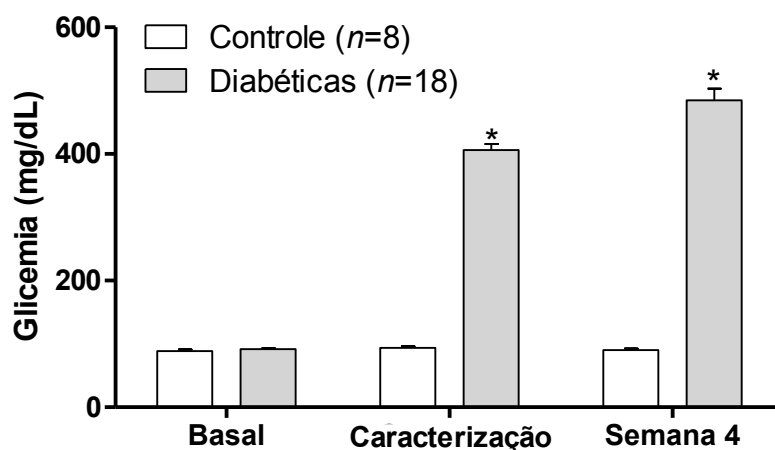


**Figura 8 – Peso corpóreo de ratas antes e após administração de estreptozotocina ou veículo.** Os animais foram divididos em dois grupos e tiveram seu peso medido antes (basal), durante (indução) e após o tratamento com veículo (círculos vazios) ou com estreptozotocina (50 mg/Kg; círculos cheios) por 4 semanas. Os círculos imediatamente antes e depois da indução representam os valores do peso corporal obtidos no sexto dia da semana basal antes do jejum e 72 h após os tratamentos com estreptozotocina ou veículo. Os círculos representam a média  $\pm$  erro padrão da média do peso corporal em g. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.1.2 STZ induz um estado hiperglicêmico crônico em ratas

A Figura 9 apresenta os valores da glicemia capilar, em mg/dL, de ratas após a administração de STZ ou veículo. Os animais apresentaram valores glicêmicos basais de 90 mg/dL e estes valores permaneceram estáveis no grupo de ratas controle ao longo de 4

semanas. Uma única dose de STZ em ratas foi capaz de elevar os níveis glicêmicos a valores próximos de 406 mg/dL, 72 h após a sua administração. Estes valores permaneceram elevados no decorrer das 4 semanas avaliadas, sendo que observamos valores médios em torno de 485 mg/dL na quarta semana, conforme demonstrado na Figura 9.



**Figura 9 – Glicemia capilar de ratas após administração de estreptozotocina ou veículo.**

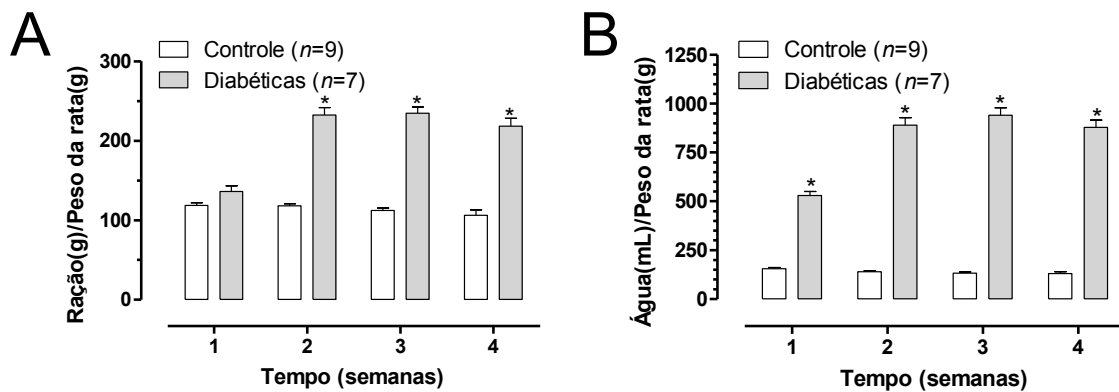
Os animais foram divididos em 2 grupos e tiveram seus valores glicêmicos medidos antes (basal) e após 72h (caracterização) e 4 semanas (semana 4) da administração de veículo (barra vazia) ou estreptozotocina (50 mg/Kg; barras cheias). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média dos valores glicêmicos em mg/dL. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.1.3 STZ provoca polifagia e polidipsia em ratas

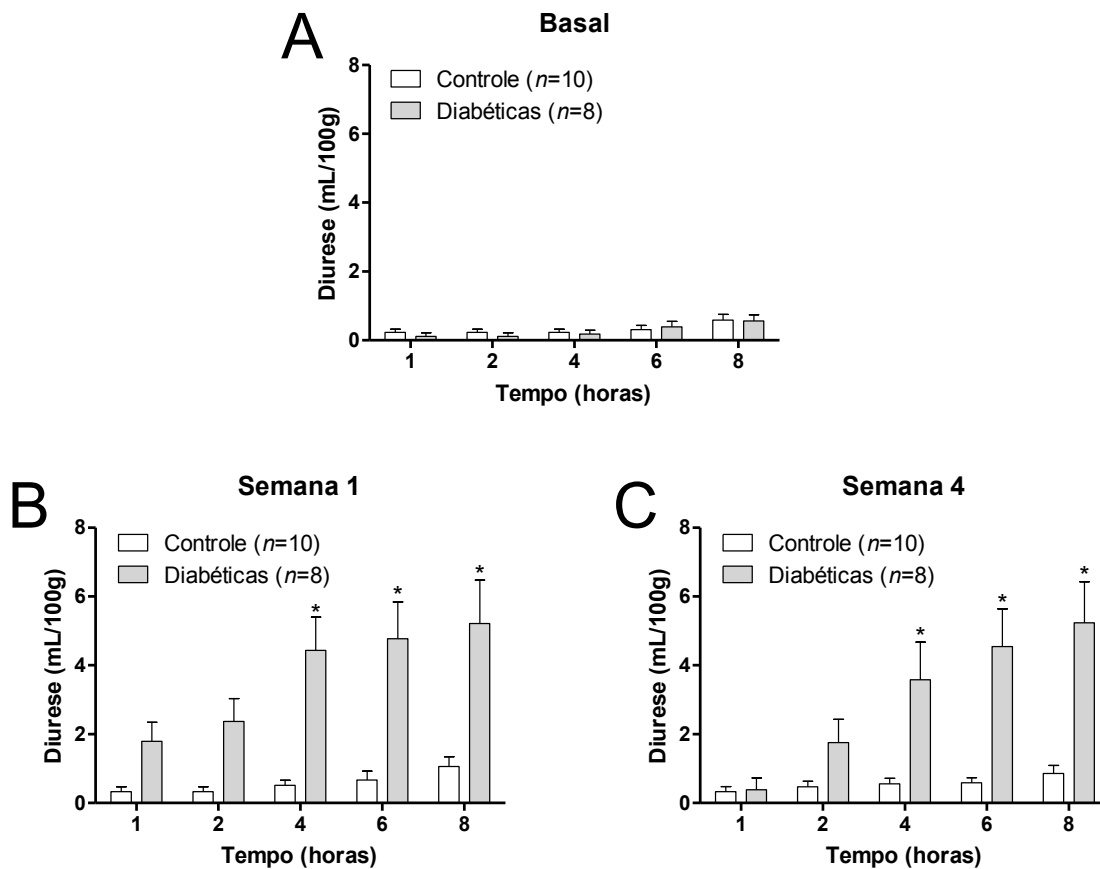
A Figura 10 apresenta os valores obtidos quando mensuradas a ingesta alimentar, em gramas de ração, e a ingesta hídrica, em mL, de ratas após administração de STZ ou veículo, os dois parâmetros foram corrigidos pelo peso dos animais, em gramas. Os animais diabéticos passaram a apresentar significativo aumento na ingesta alimentar a partir da segunda semana após a administração da STZ, mantendo-se elevado até a quarta semana, quando comparados aos animais do grupo controle que receberam veículo. Por sua vez, a ingesta de água começou a aumentar já na primeira semana após a administração de STZ, aumentando substancialmente na segunda semana e mantendo-se assim até a quarta semana, conforme demonstrado na Figura 10. Como podemos observar ainda na Figura 10, os animais do grupo controle tiveram a ingesta alimentar e de água mantidas nos valores basais.

#### 4.1.4 STZ ocasiona poliúria em ratas

A Figura 11 apresenta a diurese de ratas, em mL por 100 g de peso corpóreo dos animais, antes e após administração de STZ ou veículo. De modo semelhante ao que foi observado com relação à ingesta de água, o volume urinário de ratas tratadas com STZ apresentou aumento substancial desde a primeira semana até a última semana avaliada, quando comparado ao de ratas do grupo controle (Figura 11).



**Figura 10 – Ingesta alimentar (A) e hídrica (B) de ratas após administração de estreptozotocina ou veículo.** Os animais foram divididos em grupos e tiveram a ingesta alimentar (A) e hídrica (B) acompanhadas por 4 semanas após o tratamento com veículo (barras vazias) ou estreptozotocina (50 mg/Kg; barras cheias). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da ingesta alimentar medida como a razão de peso de ração ingerido em g pelo peso do animal em g (A) e da ingesta de água medida como a razão do volume de água ingerido em mL pelo peso do animal em g (B). \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



**Figura 11 – Diurese de ratas antes e após administração de estreptozotocina ou veículo.** Os animais foram divididos em 2 grupos e tiveram a diurese medida antes (A) e após 1 (B) e 4 (C) semanas do tratamento com veículo (barras vazias) ou estreptozotocina (50 mg/Kg; barras cheias). As barras representam a diurese de ratas controle (barras vazias) e do grupo diabéticas (barras cheias). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da diurese medida em mL/100g de peso corporal. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.2 Prejuízos vasculares sistêmicos decorrentes do diabetes

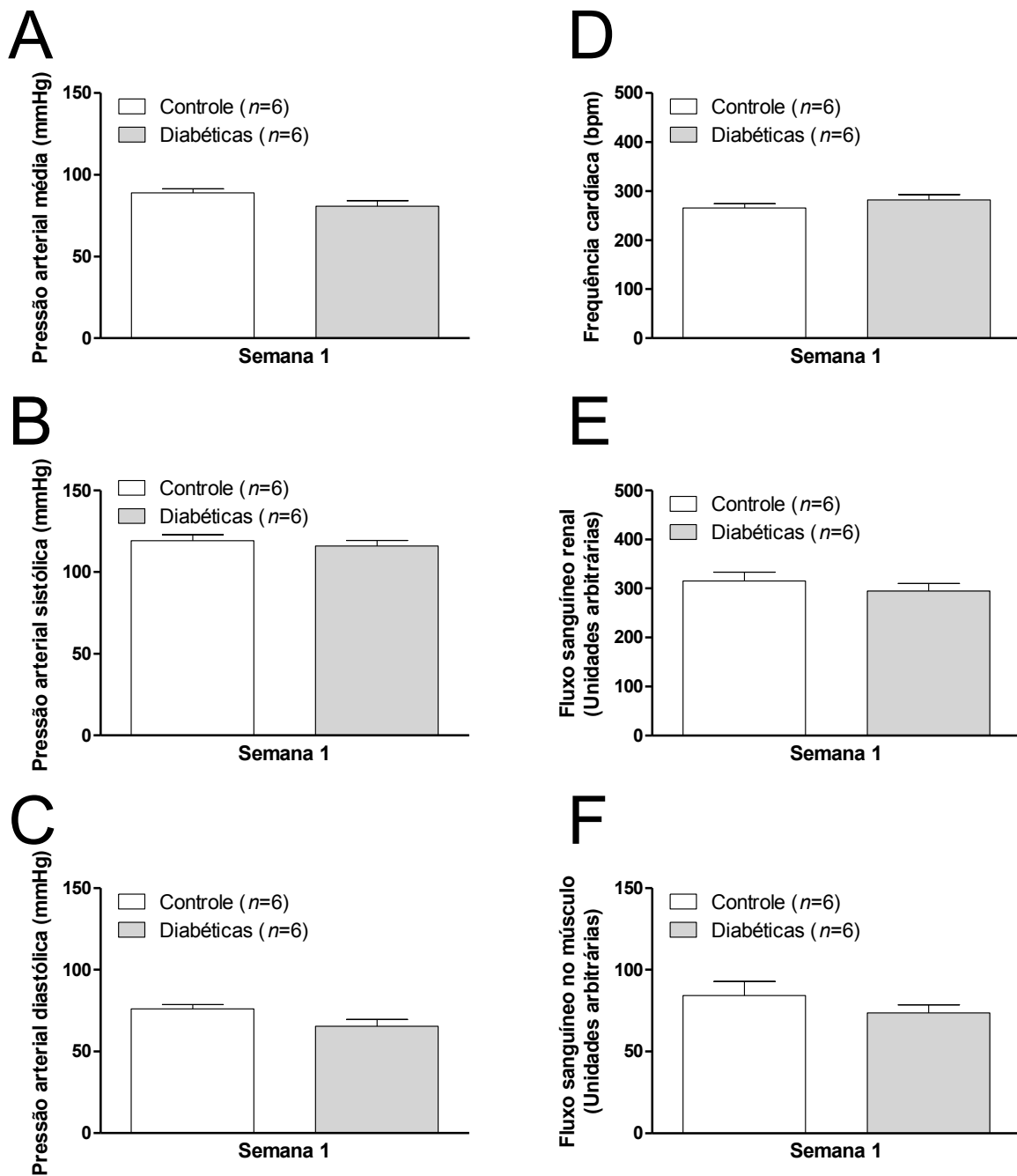
A Figura 12 mostra os valores basais dos grupos experimentais semana 1 (controle e diabéticas) para a PAM, a PAS e a PAD, ambas em mmHg, para a frequência cardíaca, em bpm, e para os fluxos sanguíneo renal e do musculo esquelético, ambos em unidades arbitrárias. Uma semana após a administração de STZ, quando avaliada pela medida direta de pressão arterial em animais anestesiados, as ratas diabéticas não apresentaram nenhuma diferença nos valores basais da PAM, da PAS, da PAD, da frequência cardíaca, do fluxo sanguíneo renal e do fluxo sanguíneo do musculo, quando comparadas com o grupo controle.

Uma semana após a administração da STZ ou veículo, as ratas controle e diabéticas apresentaram respectivamente os seguintes valores basais:  $89 \pm 6$  e  $81 \pm 8$  mmHg, para a PAM;  $119 \pm 9$  e  $116 \pm 8$  mmHg, para a PAS;  $76 \pm 6$  e  $65 \pm 10$  mmHg, para a PAD;  $266 \pm 22$  e  $282 \pm 27$

bpm, para a frequência cardíaca;  $315\pm 44$  e  $295\pm 38$  unidades arbitrárias, para o fluxo sanguíneo renal; e  $84\pm 21$  e  $74\pm 12$  unidades arbitrárias, para o fluxo sanguíneo do músculo esquelético.

A Figura 13 mostra os valores basais dos grupos experimentais semana 4 (controle e diabéticas) para a PAM, a PAS e a PAD, ambas em mmHg, para a frequência cardíaca, em bpm, e para os fluxos sanguíneo renal e do músculo esquelético, ambos em unidades arbitrárias. Quatro semanas após a administração de STZ, quando avaliada pela medida direta de pressão arterial em animais anestesiados, as ratas diabéticas apresentaram valores basais menores para a PAM, a PAS e a PAD e também para o fluxo sanguíneo renal, quando comparadas com o grupo controle. A frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo do músculo esquelético foram semelhantes entre os grupos.

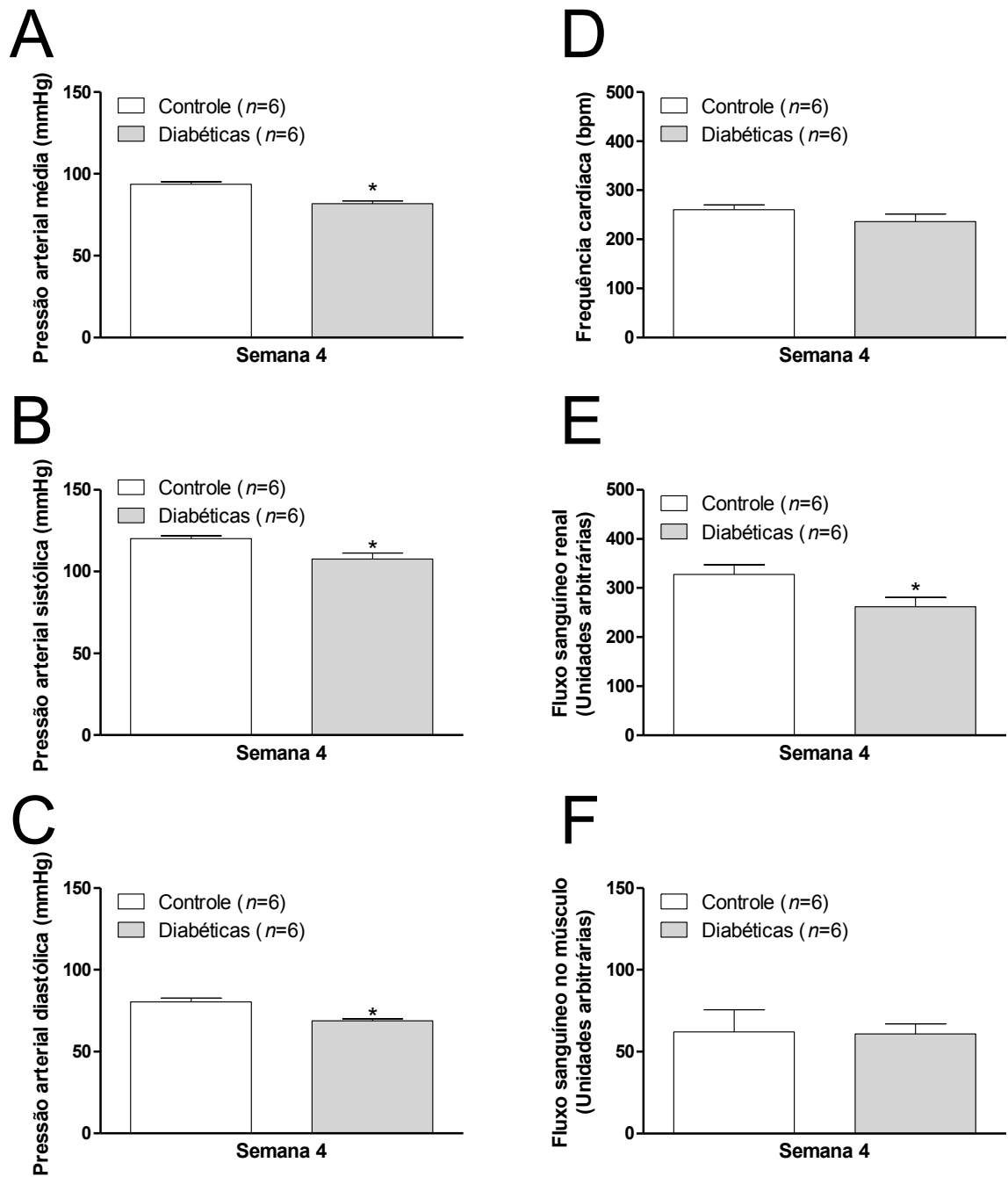
Quatro semanas após a administração da STZ ou veículo, as ratas controle e diabéticas apresentaram respectivamente os seguintes valores basais:  $94\pm 4$  e  $82\pm 4$  mmHg, para a PAM;  $120\pm 4$  e  $108\pm 9$  mmHg, para a PAS;  $80\pm 5$  e  $69\pm 3$  mmHg, para a PAD;  $260\pm 25$  e  $236\pm 38$  bpm, para a frequência cardíaca;  $328\pm 46$  e  $262\pm 46$  unidades arbitrárias, para o fluxo sanguíneo renal; e  $62\pm 33$  e  $61\pm 15$  unidades arbitrárias, para o fluxo sanguíneo do músculo esquelético.



**Figura 12 – Valores pressóricos e de fluxo sanguíneo basais de ratas controle e diabéticas anestesiadas após 1 semana da administração de estreptozotocina e veículo.**

Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas, barras cheias) ou com veículo (controle, barras vazias) foram alocadas no grupo experimental 1 semana após o tratamento. As ratas provenientes desse grupo experimental foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Após um período de 20 min de estabilização, os valores basais eram aferidos para a pressão arterial média (A), a pressão arterial sistólica (B), a pressão arterial diastólica (C), ambas em mmHg, para a frequência cardíaca (D), em batimentos por minuto (bpm), e para os fluxos sanguíneos renal (E) e da musculatura esquelética (F), ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Teste *t* de Student).





**Figura 13 – Valores pressóricos e de fluxo sanguíneo basais de ratos controle e diabéticas anestesiadas após 4 semana da administração de estreptozotocina e veículo.**

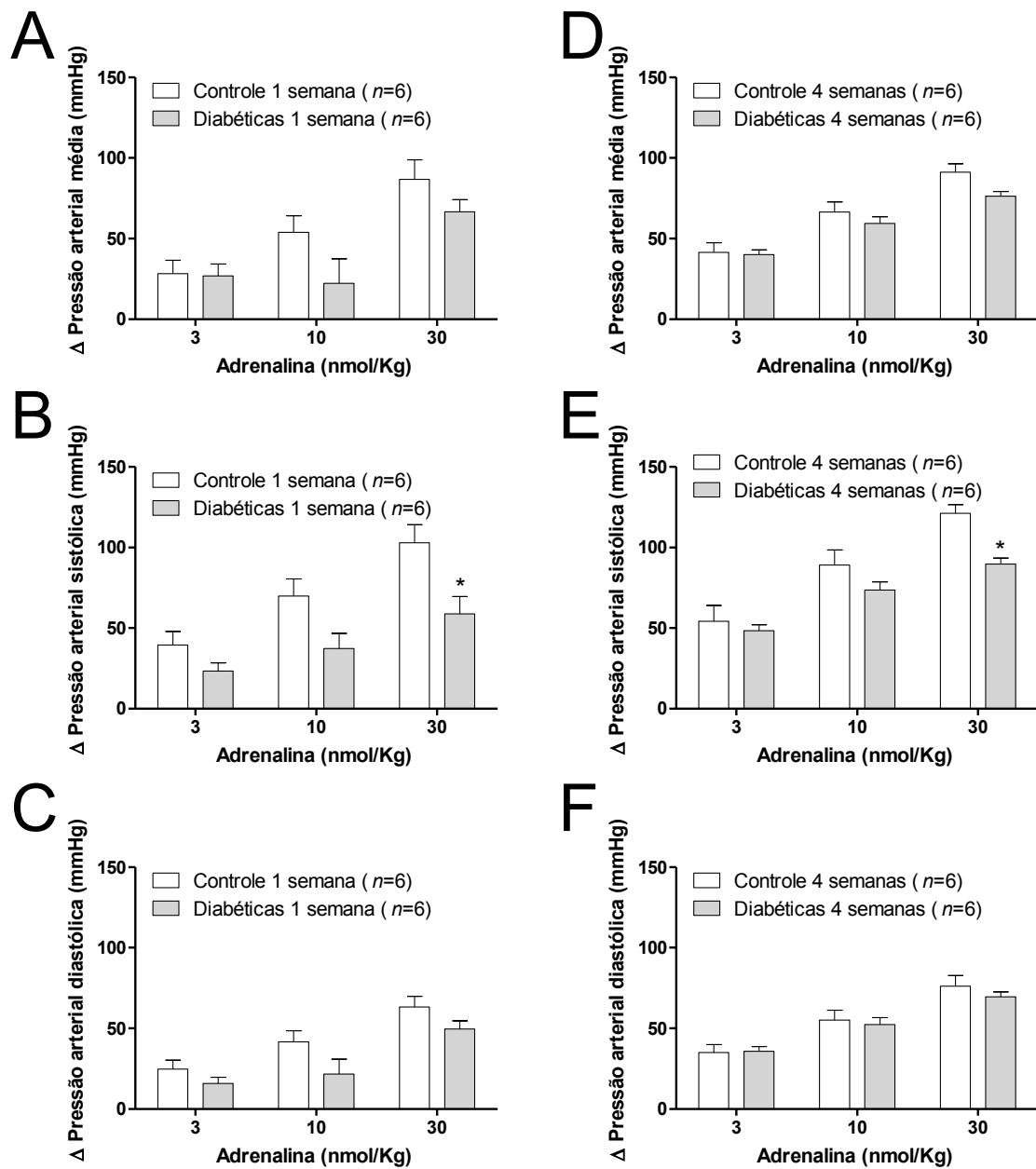
Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas, barras cheias) ou com veículo (controle, barras vazias) foram alocadas no grupo experimental 4 semana após o tratamento. As ratas provenientes desse grupo experimental foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Após um período de 20 min de estabilização, os valores basais eram aferidos para a pressão arterial média (A), a pressão arterial sistólica (B), a pressão arterial diastólica (C), ambas em mmHg, para a frequência cardíaca (D), em batimentos por minuto (bpm), e para os fluxos sanguíneos renal (E) e da musculatura esquelética (F), ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença significativa existente entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Teste *t* de Student.

#### 4.2.1 Diabetes ocasiona hiporresponsividade vascular aos agentes vasoconstritores

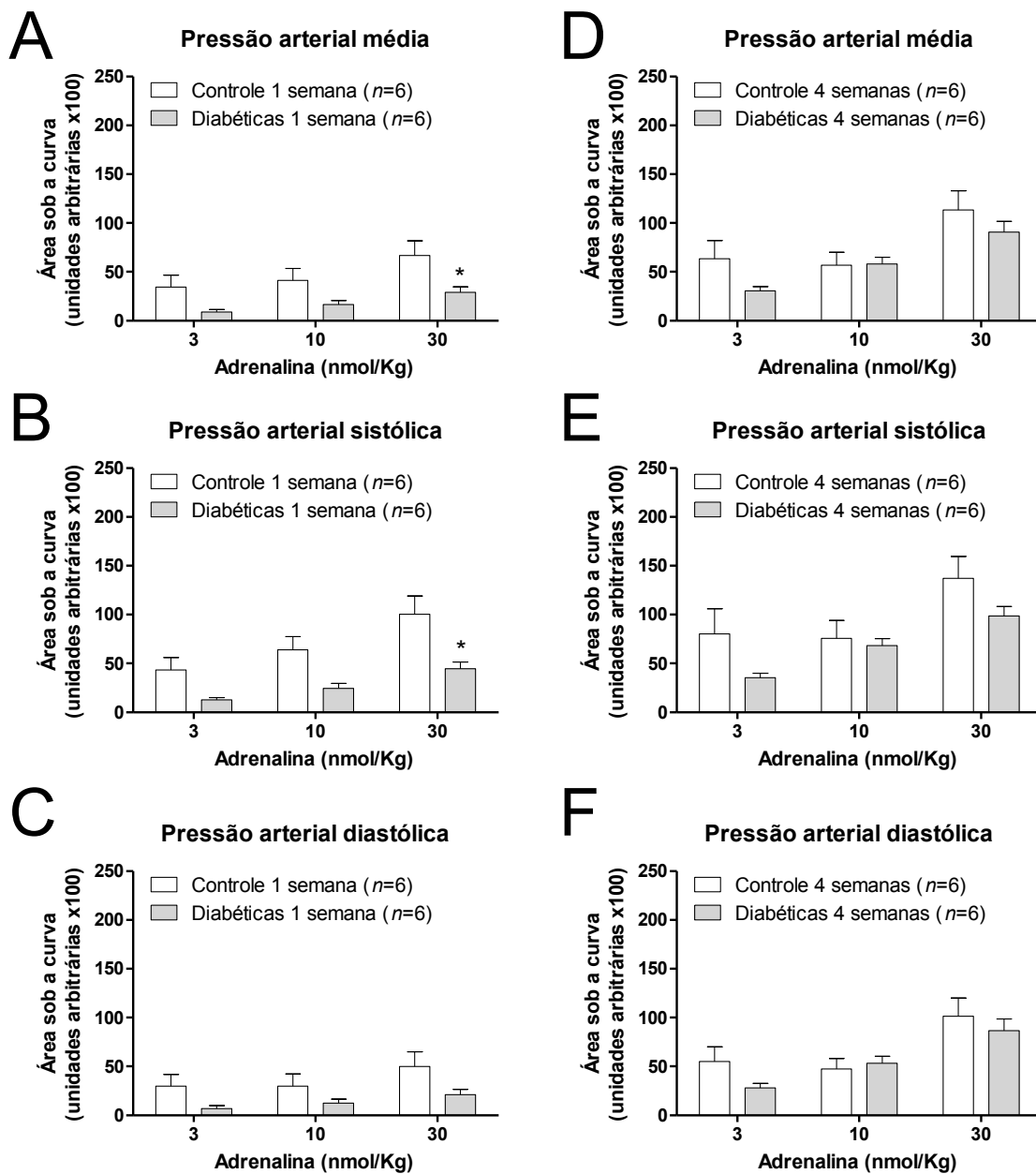
A Figura 14 mostra o delta de variação da PAM, PAS e PAD obtidas pela administração de adrenalina expresso em mmHg; enquanto que a Figura 15 mostra a área sob a curva das respostas pressóricas expressa em unidades arbitrárias também para a adrenalina.

As Figuras 14 e 15 mostram que a dose mais alta de adrenalina induziu uma resposta pressora reduzida nas ratas após uma semana do tratamento com STZ observada pela diminuição no delta do efeito máximo na PAS (Figura 14B) e na área sob a curva da PAM (Figura 15A) e da PAS (Figura 15B), mas não nas ratas que receberam veículo.

Por sua vez, quando comparadas às ratas do grupo controle, observamos uma redução no delta da resposta máxima da PAS (Figura 14E), mas não na área sob a curva (Figura 15D-15F) no grupo experimental das ratas após 4 semanas do tratamento com SZT.



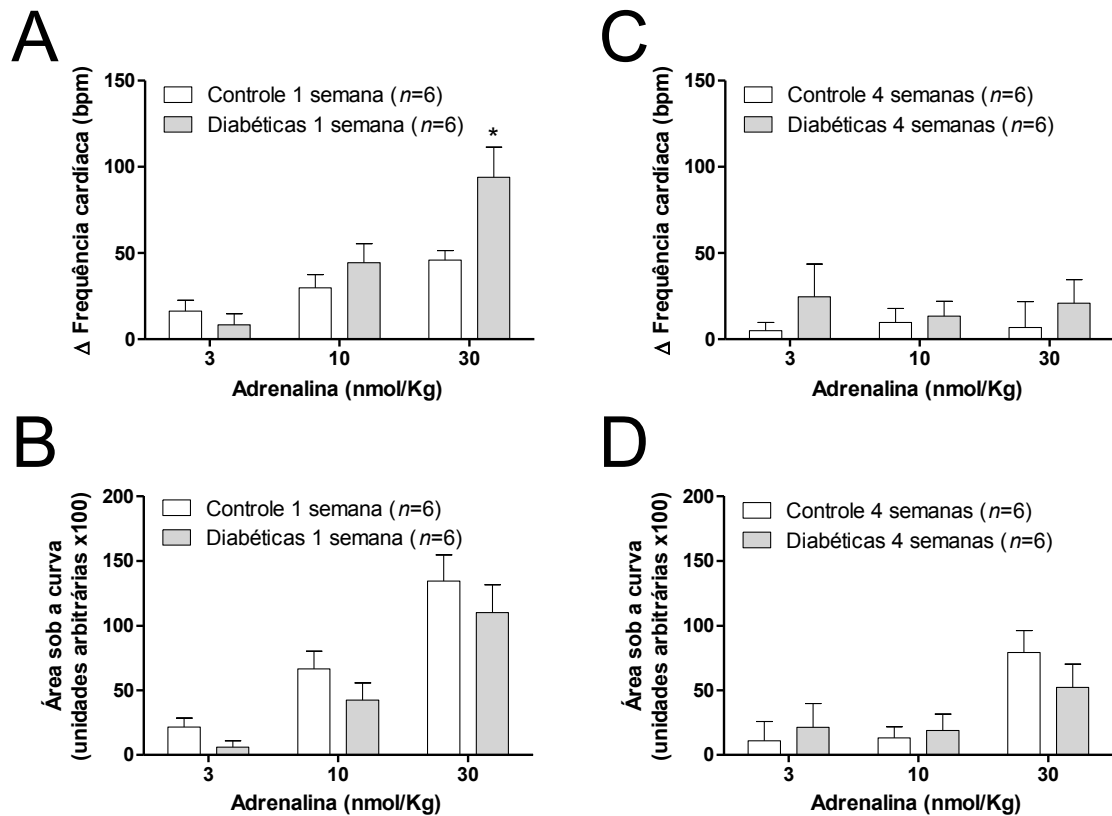
**Figura 14 – Variação da pressão arterial de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para adrenalina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do delta de alteração da pressão arterial em relação à pressão arterial basal aferida em mmHg. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



**Figura 15 – Área sob a curva da pressão arterial de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para adrenalina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão arterial medida em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 16 mostra o delta da variação da frequência cardíaca obtida pela administração de adrenalina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

Quando comparadas às ratas do grupo controle, uma semana após receberem STZ, as ratas diabéticas apresentaram aumento no delta da frequência cardíaca na dose de 30 nmol/Kg de adrenalina (Figura 16A), mas não na área sob a curva (Figura 16B). Na quarta semana após os tratamentos não houve diferença entre os grupos controle e diabéticas para a frequência cardíaca após as sucessivas administrações de adrenalina (Figura 16C e 16D).

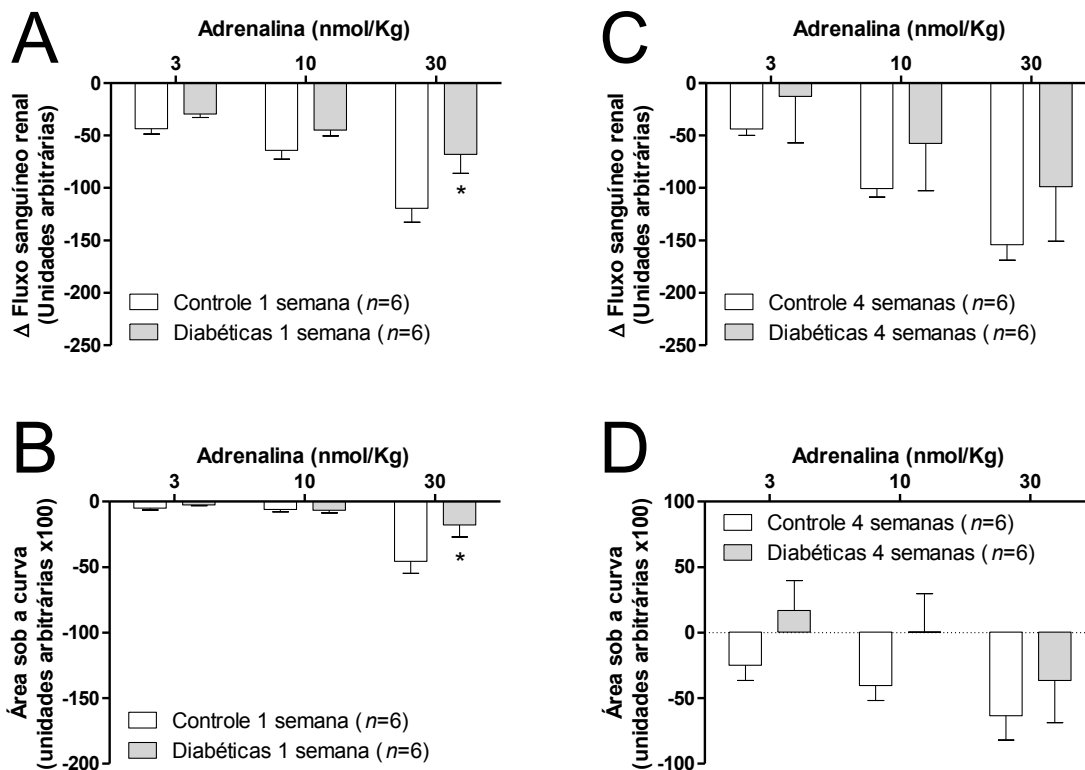


**Figura 16 – Frequência cardíaca de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da frequência cardíaca conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para adrenalina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (em bpm; A e C) e a área sob a curva (em unidades arbitrárias; B e D) dos efeitos gerados sobre a frequência cardíaca. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da frequência cardíaca. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 17 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo renal obtida pela administração de adrenalina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

Em resposta à administração da dose de 30 nmol/Kg de adrenalina, o delta (Figura 17A) e a área sob a curva (Figura 17B) do fluxo sanguíneo renal do grupo diabético apresentaram-

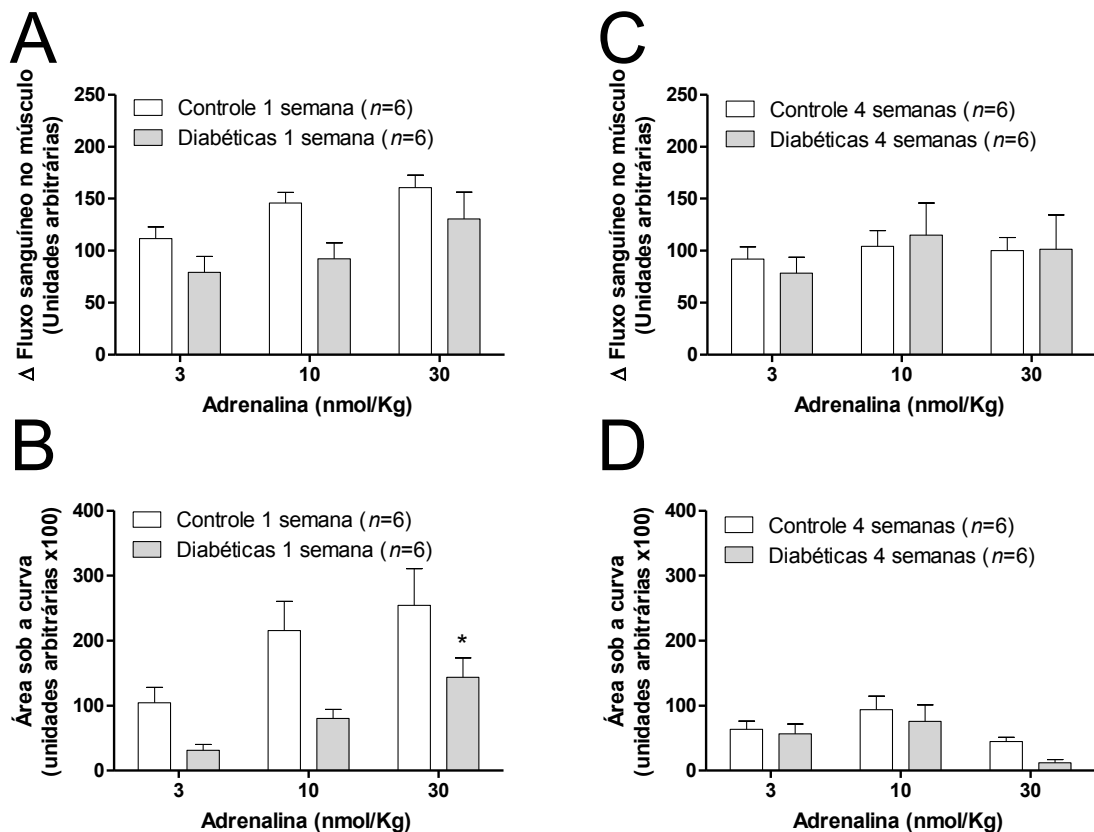
se reduzidos na primeira semana, mas não na quarta semana (Figura 17C e 17D), quando comparados com o grupo controle.



**Figura 17 – Fluxo sanguíneo renal de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição do fluxo renal conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para adrenalina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo renal, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo renal. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

Por sua vez, a Figura 18 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo no musculo esquelético obtida pela administração de adrenalina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

E, quando comparado ao grupo controle, a área sob a curva (Figura 18B), mas não o delta (Figura 18A) do fluxo sanguíneo da musculatura gastrocnêmica do grupo tratado com STZ apresentou-se reduzida em resposta à adrenalina (30 nmol/Kg) na primeira semana. Ao passo que, na quarta semana após os tratamentos com STZ ou veículo, não observamos diferenças significativas entre os grupos (Figura 18C e 18D).

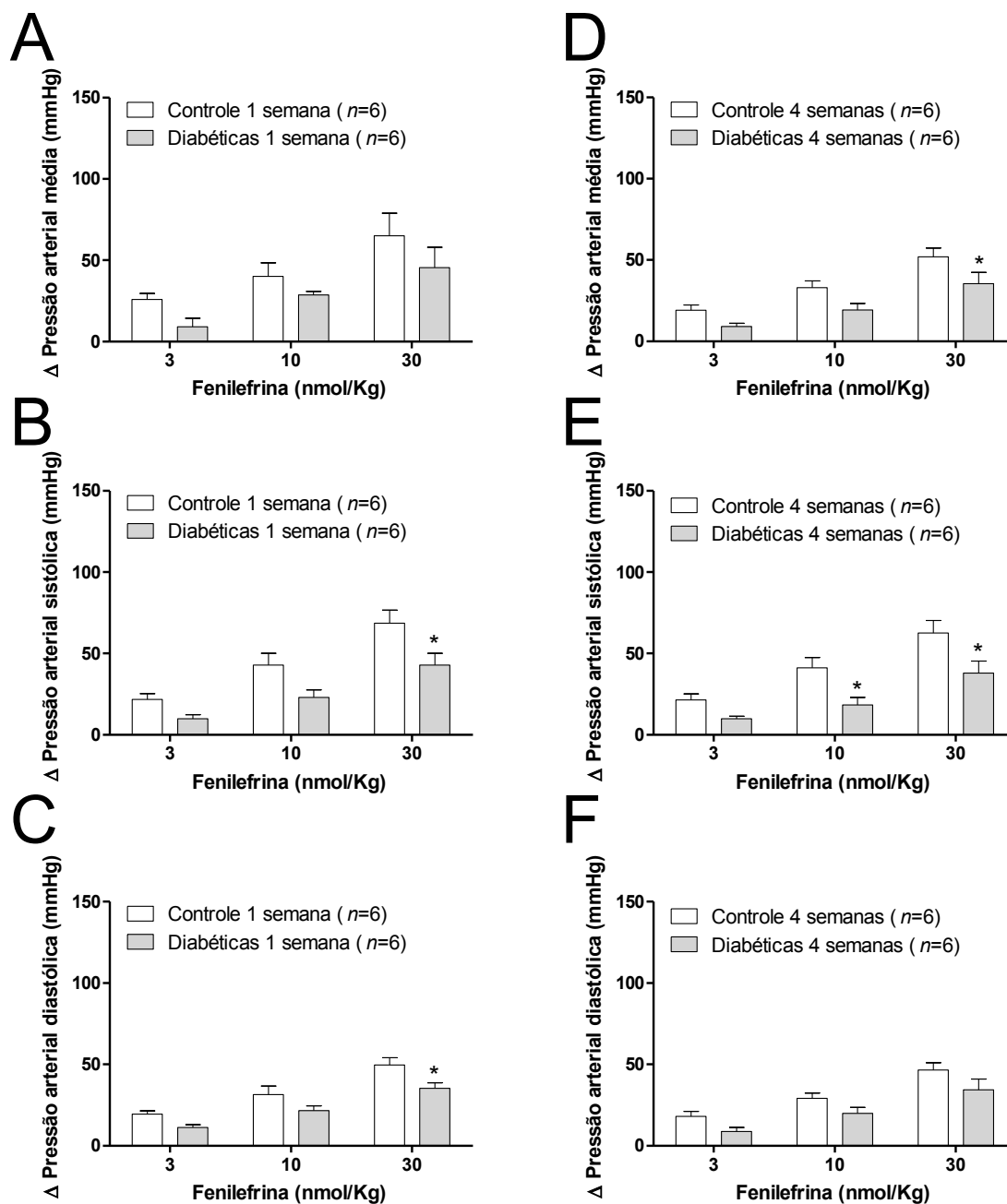


**Figura 18 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de adrenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição do fluxo sanguíneo gastrocnêmico conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para adrenalina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo muscular, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo muscular. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 19 mostra o delta de variação das PAM, PAS e PAD obtidas pela administração de fenilefrina expresso em mmHg; enquanto que a Figura 20 mostra a área sob a curva dessas respostas pressóricas expressa em unidades arbitrárias.

Observamos aumento nos valores pressóricos induzidos por fenilefrina 1 semana e 4 semanas após administração de veículo ou STZ (50 mg/Kg) quando expressos tanto como delta (Figura 19) ou como área sob a curva (Figura 20). No entanto, o aumento no delta da PAS e PAD induzido por fenilefrina na dose de 30 nmol/Kg foi menor em ratas diabéticas de 1 semana do que nas ratas controle. O aumento nos valores de delta da PAM e da PAS induzidos por essa mesma dose (30 nmol/Kg) de fenilefrina foram menores em ratas diabéticas de 4 semanas do que nas ratas controle. Já a dose de 10 nmol/Kg de fenilefrina

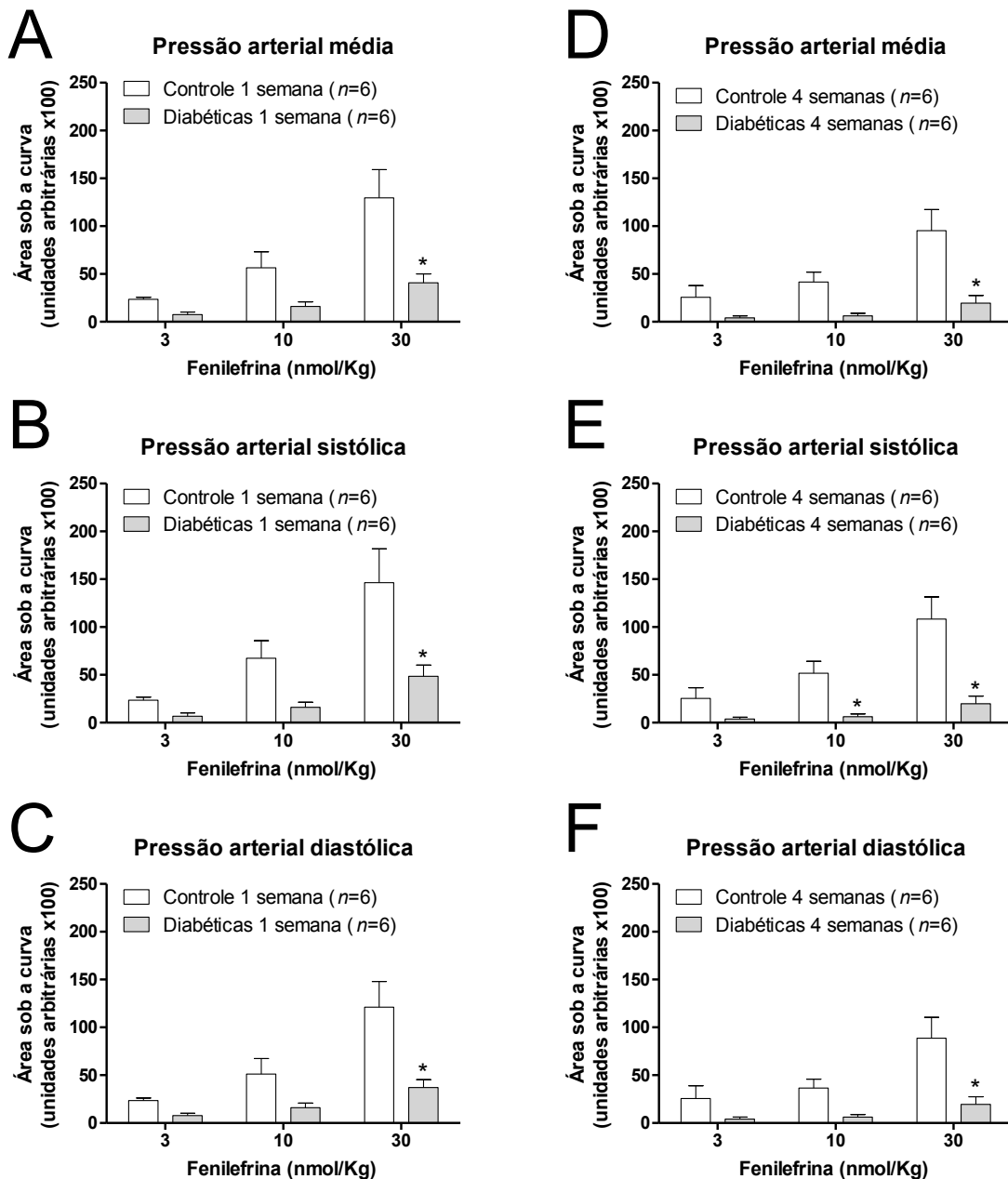
induziu um menor aumento no delta da PAS de ratas diabéticas de 4 semanas após a administração da STZ, quando comparada com as ratas controle (Figura 19).



**Figura 19 – Variação da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para fenilefrina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média ± erro padrão da média do delta da pressão arterial aferida em mmHg. \* representa diferença significativa (p < 0,05) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



Resultados semelhantes foram observados nos valores pressóricos induzidos por fenilefrina quando expressos em área sob a curva, onde observamos uma menor área sob a curva para as PAM, PAS e PAD na primeira e na quarta semana após tratamento com STZ, quando comparada às ratas do grupo que recebeu veículo (Figura 20).

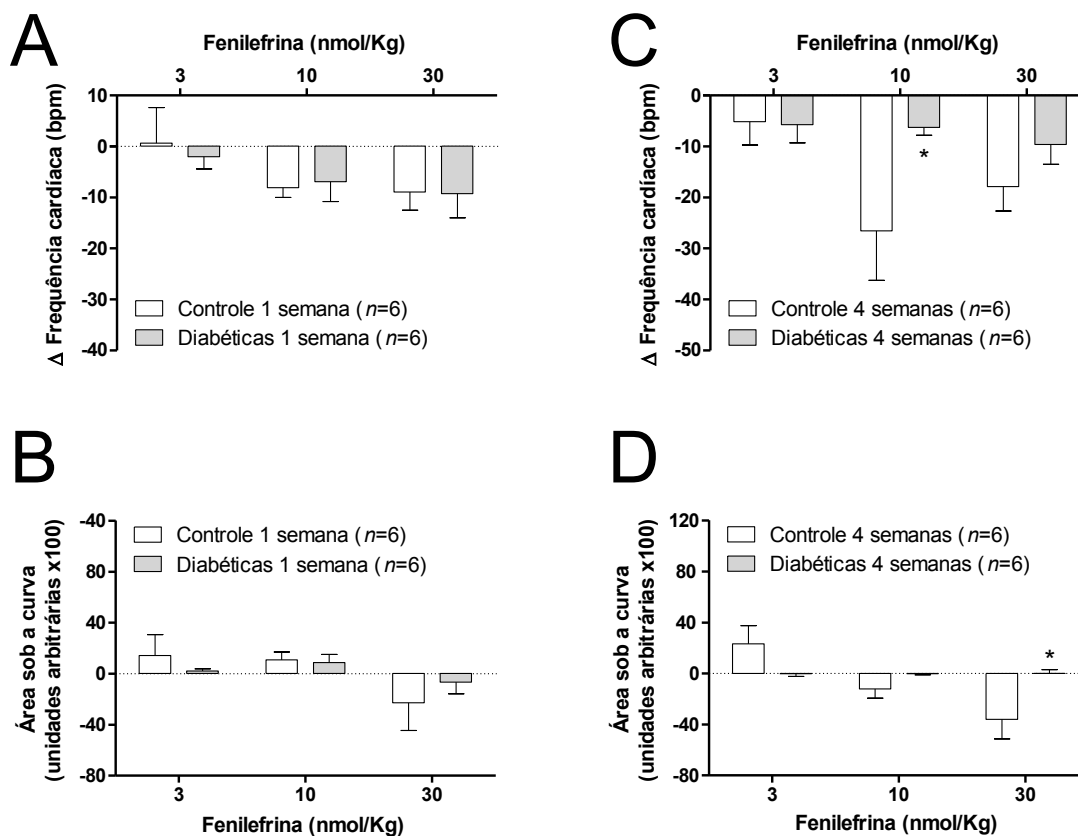


**Figura 20 – Área sob a curva da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para fenilefrina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a

pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão arterial medida em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 21 mostra o delta da variação da frequência cardíaca obtida pela administração de fenilefrina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

Na primeira semana após o tratamento com STZ (50 mg/Kg) ou veículo, a frequência cardíaca não se apresentou alterada entre os grupos em resposta às sucessivas administrações de fenilefrina (Figura 21A e 21B). Todavia, após 4 semanas dos tratamentos, tanto o delta do aumento da frequência cardíaca obtido na dose de 10 nmol/Kg (Figura 21C) quanto a área sob a curva do aumento da frequência cardíaca na dose de 30 nmol/Kg (Figura 21D) foram menores no grupo diabético, quando comparados com os obtidos no grupo controle.

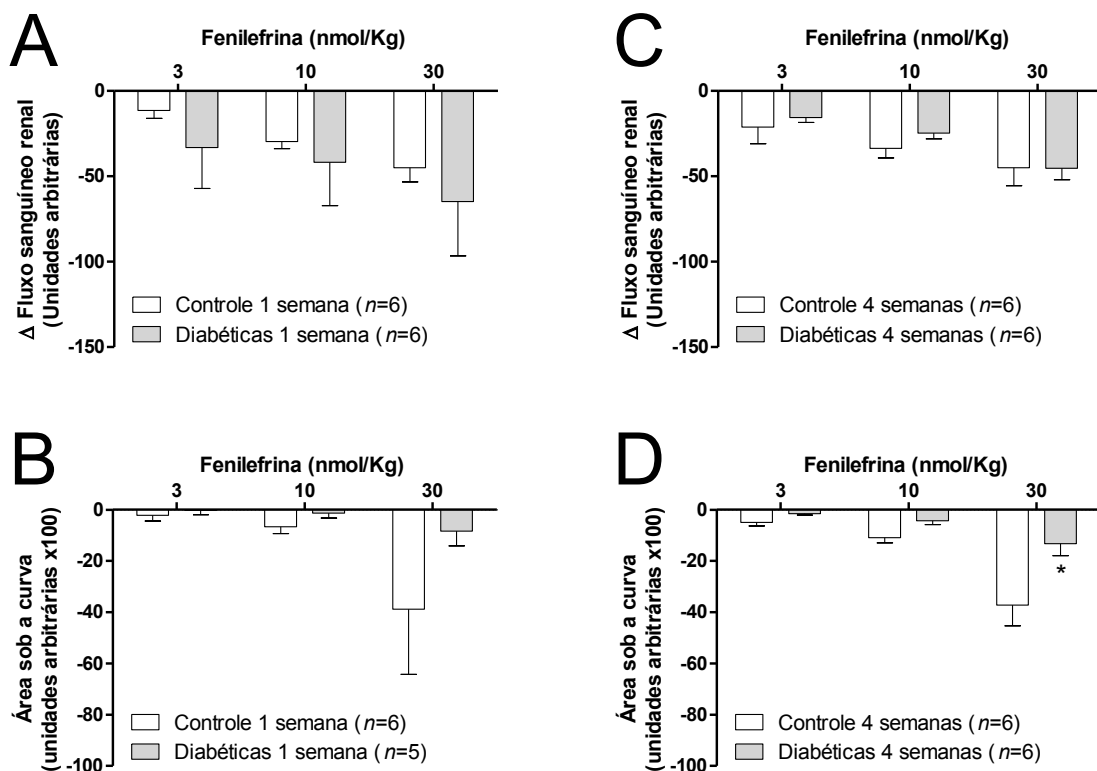


**Figura 21 – Frequência cardíaca de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da frequência cardíaca conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para fenilefrina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (em bpm; A e C) e a área sob a curva (em unidades arbitrárias; B e D) dos efeitos gerados sobre a frequência cardíaca. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da frequência cardíaca. \* representa diferença

significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 22 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo renal obtida pela administração de fenilefrina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

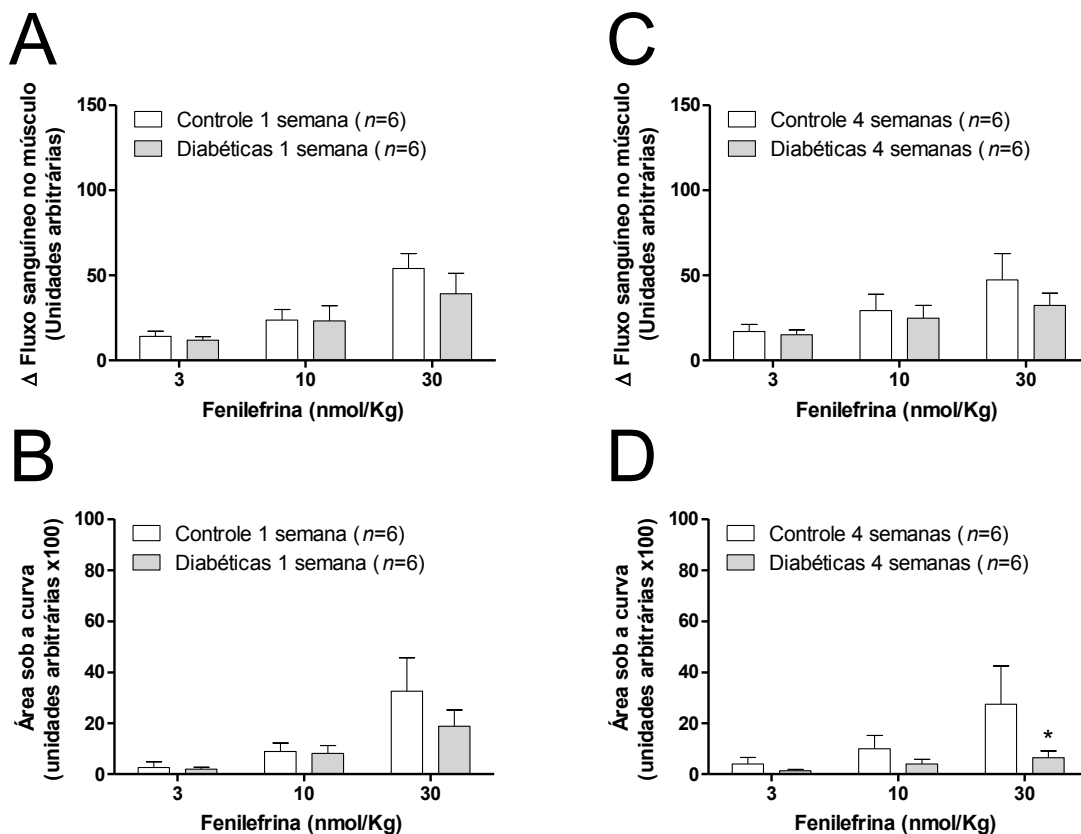
As variações de fluxo sanguíneo renal em resposta às administrações sistêmicas de fenilefrina não apresentaram diferenças entre os grupos tratados com STZ ou veículo na primeira semana (Figura 22A e 22B). Já na quarta semana após o tratamento com STZ ou veículo, a área sob a curva da diminuição do fluxo sanguíneo renal foi menor no grupo tratado com STZ do que no controle (Figura 22D), sem diferença entre os grupos quando analisado o delta desse mesmo efeito (Figura 21C).



**Figura 22 – Fluxo sanguíneo renal de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição do fluxo sanguíneo renal, conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para fenilefrina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo renal, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo renal expressos como delta ou área sob a curva em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 23 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo no musculo esquelético obtida pela administração de fenilefrina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

De forma semelhante ao que foi observado para o fluxo sanguíneo renal, as variações do fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio, em resposta às administrações sistêmicas de fenilefrina, não apresentaram diferenças entre os grupos tratados com STZ ou veículo na primeira semana (Figura 23A e 23B). Por sua vez, na quarta semana após o tratamento com STZ ou veículo o fluxo sanguíneo muscular dos animais tratados com STZ apresentou uma menor área sob a curva quando comparada ao grupo controle (Figura 23D), mas sem diferenças no delta do efeito máximo (Figura 23C).



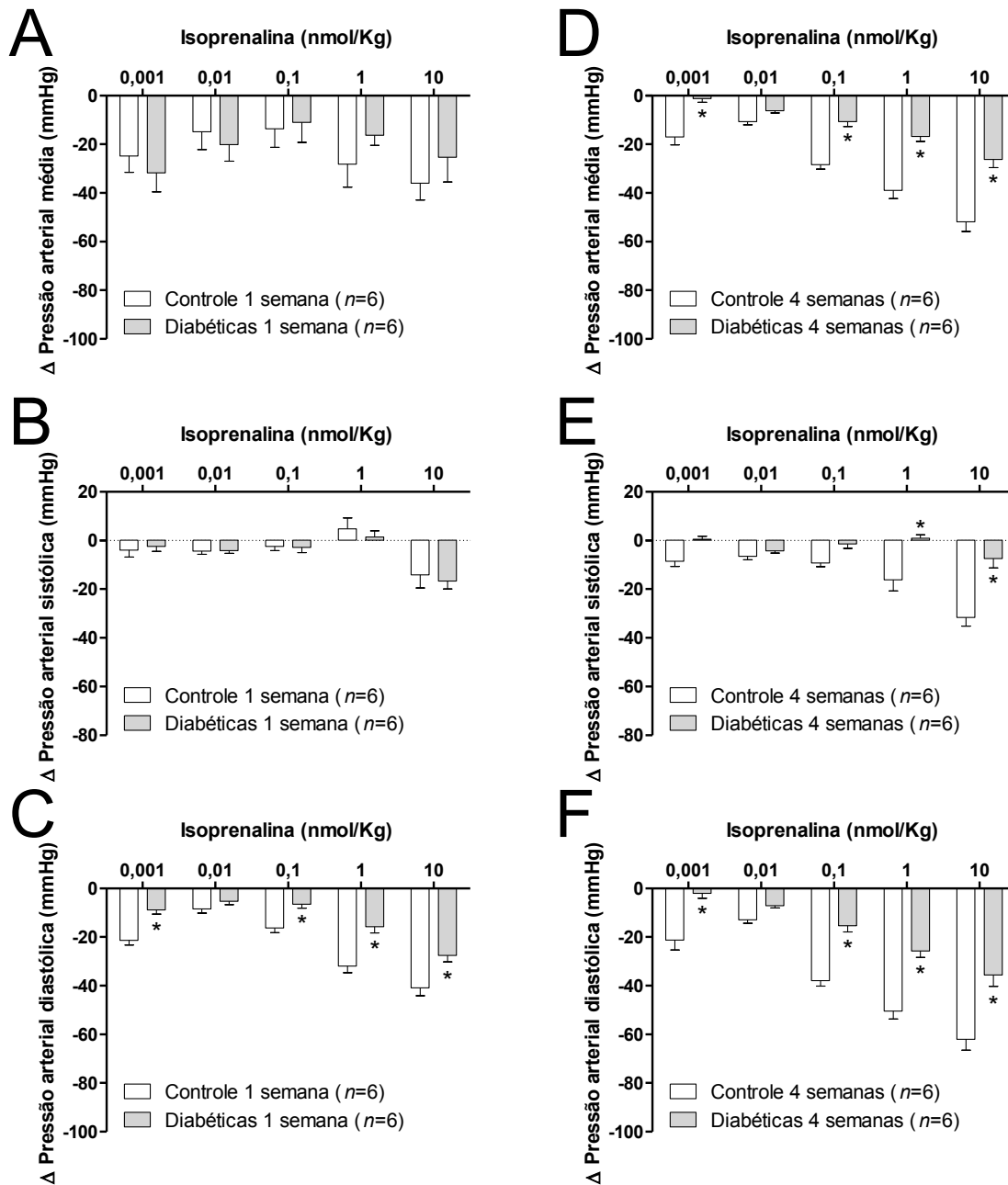
**Figura 23 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de fenilefrina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição do fluxo sanguíneo gastrocnêmico conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para fenilefrina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo muscular, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo muscular. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.2.2 Diabetes ocasiona hiporresponsividade vascular via receptores $\beta$ -adrenérgicos

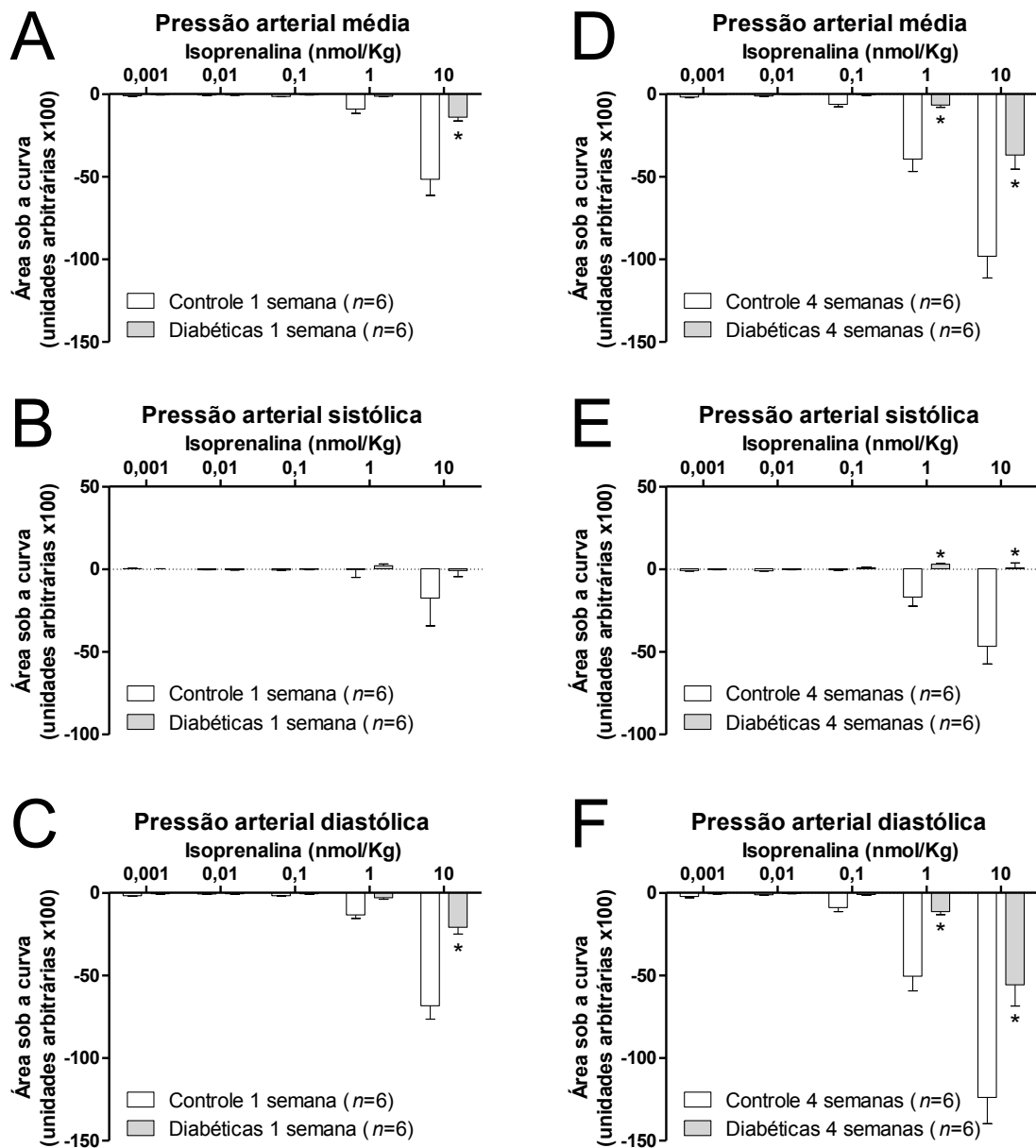
A Figura 24 mostra o delta de variação das PAM, PAS e PAD obtidas pela administração de isoprenalina expresso em mmHg; enquanto que a Figura 25 mostra a área sob a curva dessas respostas pressóricas expressa em unidades arbitrárias.

A administração de isoprenalina de forma sistêmica ocasionou diminuição na pressão arterial, efeito melhor observado sobre a PAD. Na primeira semana após a indução do diabetes, quando analisado o delta máximo do efeito hipotensor da isoprenalina, somente observamos diferença entre os grupos para a PAD (Figura 24C), tendo o grupo diabético apresentado menor efeito hipotensor. Na análise da área sob a curva do efeito hipotensor obtido, somente foram encontradas diferenças para as dose de 10 nmol/Kg de isoprenalina na PAM (Figura 25A) e na PAD (Figura 25C).

Já na quarta semana após a indução do diabetes, a administração sistêmica de isoprenalina apresentou menor efeito hipotensor nas ratas diabéticas, isso observado tanto pelo delta da queda da PAM (Figura 24D), da PAS (Figura 24E) e da PAD (Figura 24F), quanto pela diminuição da área sob a curva (Figura 25D-25F).



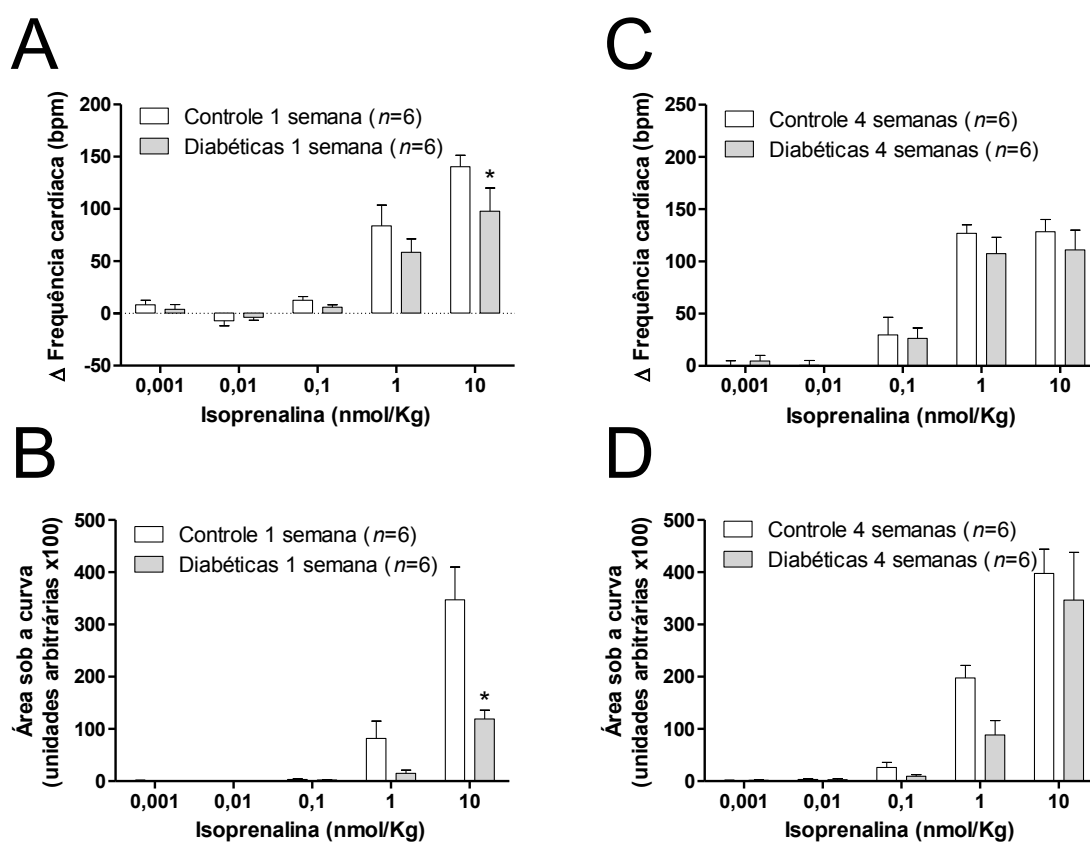
**Figura 24 – Variação da pressão arterial de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para isoprenalina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da pressão arterial aferida em mmHg. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



**Figura 25 – Área sob a curva da pressão arterial de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para isoprenalina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão arterial medida em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 26 mostra o delta da variação da frequência cardíaca obtida pela administração de isoprenalina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

A frequência cardíaca aumentou de forma dependente da dose quando administrada isoprenalina sistemicamente nos animais. Contudo, só houve diferença entre os grupos na primeira semana, onde as ratas diabéticas apresentaram menor elevação da frequência cardíaca quando utilizada a dose de 10 nmol/Kg, observado através do delta (Figura 26A) e da área sob a curva (Figura 26B). Não foram observadas diferenças entre os grupos, quando as mesmas análises foram realizadas na quarta semana após a indução do diabetes (Figura 26C e 26D).

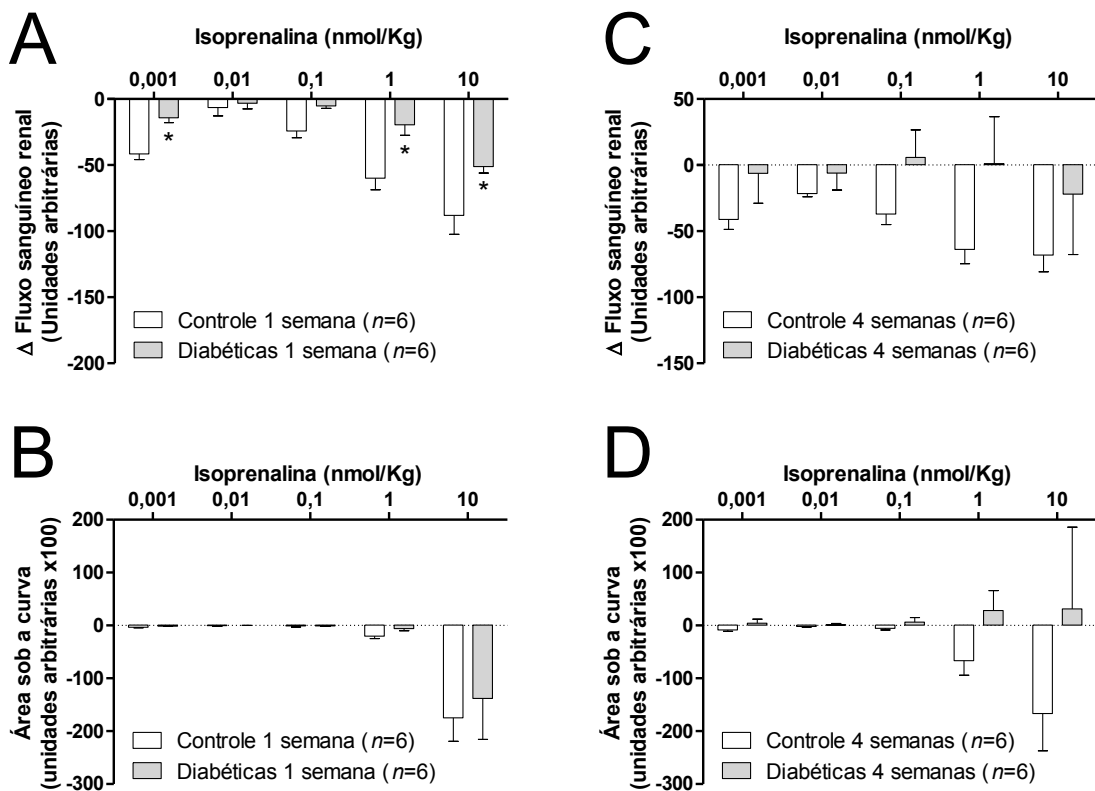


**Figura 26 – Frequência cardíaca de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para isoprenalina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (em bpm; A e C) e a área sob a curva (em unidades arbitrárias; B e D) dos efeitos gerados sobre a frequência cardíaca. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da frequência cardíaca. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 27 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo renal obtida pela administração de isoprenalina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.



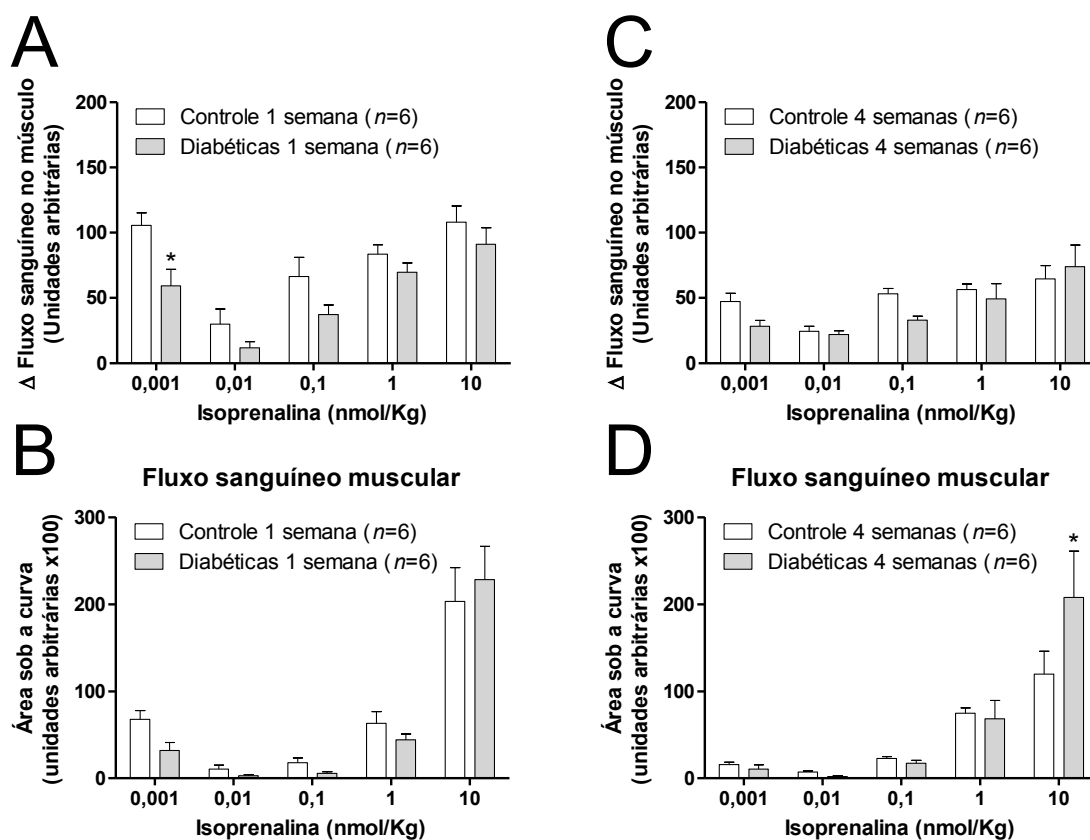
O fluxo sanguíneo renal era diminuído pela ação da isoprenalina de forma dependente da dose e formando uma curva em forma de “U”. Na primeira semana foi observada uma redução no delta máximo apresentado pelas ratas diabéticas (Figura 27A), mas sem apresentar diferenças na área sob a curva (Figura 27B). Quando avaliado o efeito da isoprenalina nos grupos experimentais 4 semanas não observamos nenhuma diferença nos efeitos obtidos quando analisados o delta do efeito máximo (Figura 27C) e a área sob a curva (Figura 27D).



**Figura 27 – Fluxo sanguíneo renal de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para isoprenalina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo renal, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo renal. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 28 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo no musculo esquelético obtida pela administração de isoprenalina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

A administração de isoprenalina aumentou o fluxo sanguíneo muscular de forma dependente da dose e também obtínhamos uma curva em forma de “U”. Entre os grupos experimentais 1 semana não houve diferenças estatisticamente significantes quando analisados o delta do efeito máximo (Figura 28A) e a área sob a curva (Figura 28B). Por sua vez, quando analisados os grupos experimentais 4 semanas, observamos apenas uma maior área sob a curva para a dose de 10 nmol/Kg (Figura 28D), não sendo observada nenhuma outra diferença entre os grupos.



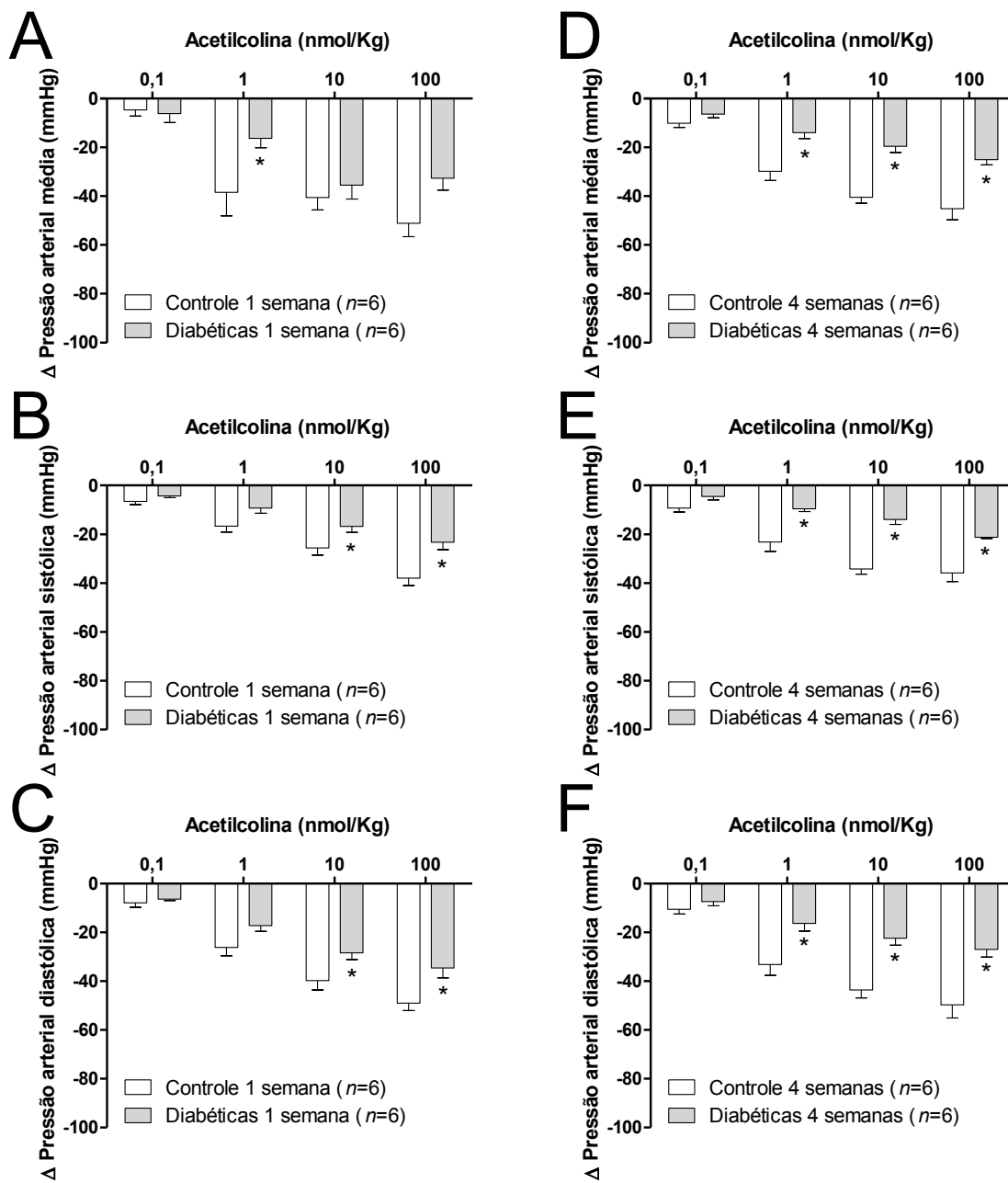
**Figura 28 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de isoprenalina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para isoprenalina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo muscular, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo muscular. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.2.3 Diabetes induz prejuízo vascular dependente do endotélio

A Figura 29 mostra o delta de variação das PAM, PAS e PAD obtidas pela administração de acetilcolina expresso em mmHg; enquanto que a Figura 30 mostra a área sob a curva dessas respostas pressóricas expressa em unidades arbitrárias.

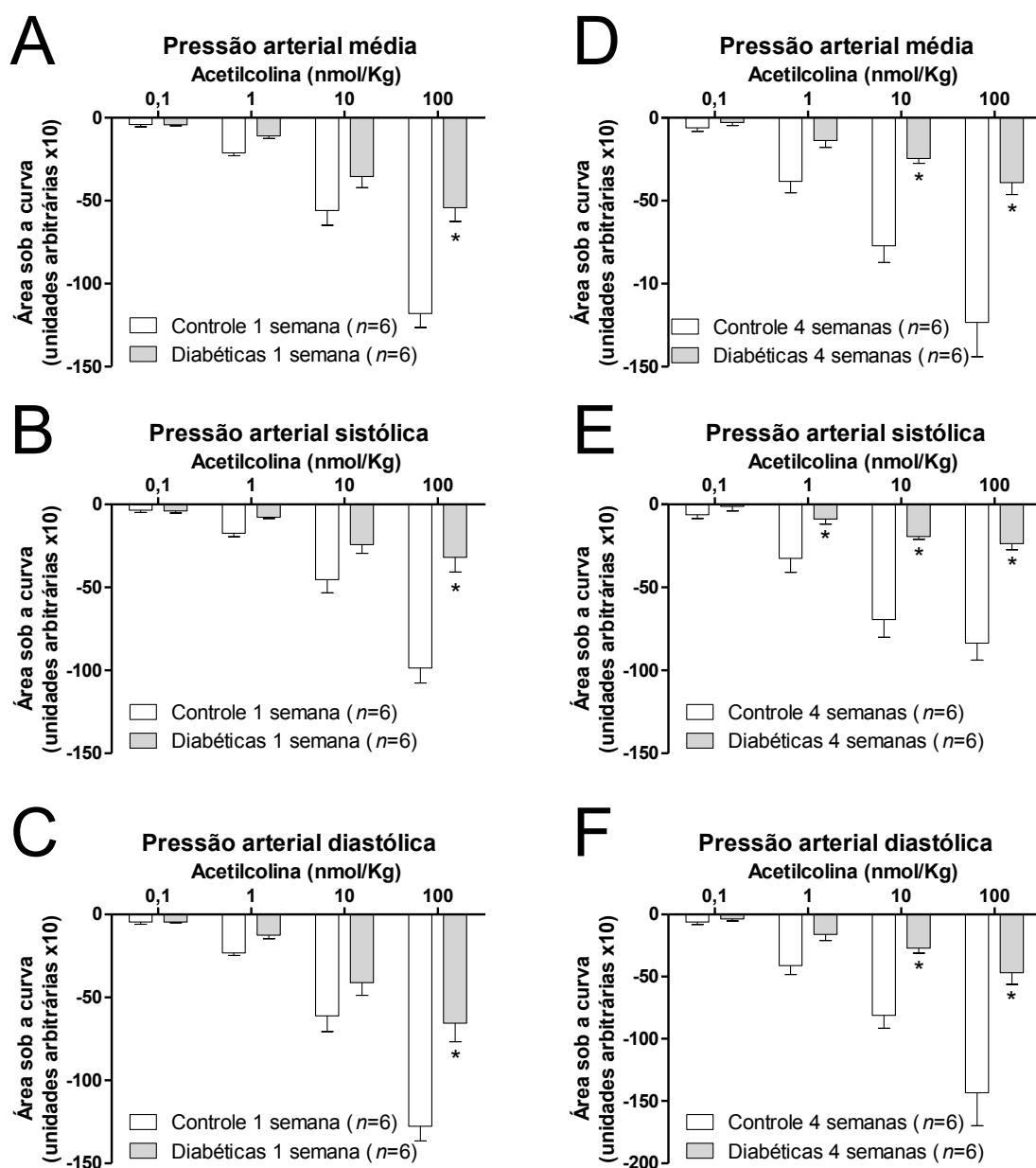
Quando avaliamos a resposta vasorrelaxante dependente do endotélio induzida por acetilcolina no leito vascular da musculatura esquelética, observamos que o delta da PAM para a dose de 1 nmol/Kg (Figura 29A) e o delta da PAS (Figura 29B) e da PAD (Figura 29C) para as doses de 10 e 100 nmol/Kg foram menores no grupo das ratas diabéticas uma semana após receberem STZ do que naquelas que receberam veículo. Enquanto que, nessa mesma semana, o grupo das ratas diabéticas teve uma menor área sob a curva para a resposta hipotensora da acetilcolina, mas apenas na dose de 100 nmol/Kg (Figura 30A-30C).

Por sua vez, na quarta semana após o tratamento com STZ ou veículo, houve redução no delta máximo de relaxamento induzido por acetilcolina, para as doses de 1, 10 e 100 nmol/Kg, no grupo das ratas que receberam STZ observada nas PAM (Figura 29D), PAS (Figura 29E) e PAD (Figura 29F). Resultados semelhantes foram observados na área sob a curva da PAM (Figura 30D), da PAS (Figura 30E) e PAD (Figura 30F), onde apresentaram-se menores para o grupo das ratas diabéticas, quando comparado com o grupo controle.



**Figura 29 – Variação da pressão arterial de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina.** Ratos tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratos provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para acetilcolina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F).

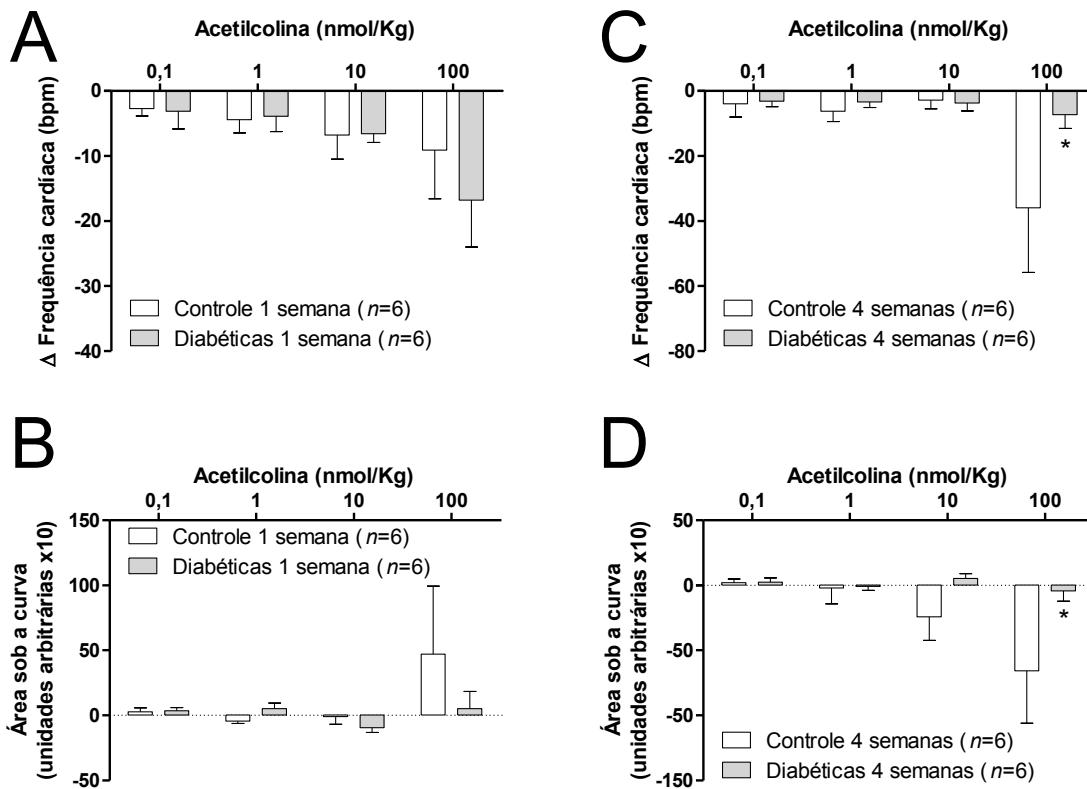
As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da pressão arterial aferida em mmHg. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



**Figura 30 – Área sob a curva da pressão arterial de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para acetilcolina foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão arterial medida em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 31 mostra o delta da variação da frequência cardíaca obtida pela administração de acetilcolina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

No grupo experimental de 1 semana após tratamentos com STZ ou veículo não houve diferença de variações na frequência cardíaca entre os grupos após a administração de acetilcolina (Figura 31A e 31B). Já no grupo experimental de 4 semanas após os tratamentos com STZ ou veículo, a dose de 100 nmol/Kg foi capaz de ocasionar uma queda na frequência cardíaca de  $36 \pm 48$  bpm (Figura 31C) no grupo controle, enquanto que o grupo diabético não apresentou tal redução, apresentando queda máxima de  $7 \pm 10$  bpm (Figura 31C) e uma menor área sob a curva (Figura 31D), quando comparado com a obtida com o grupo controle.

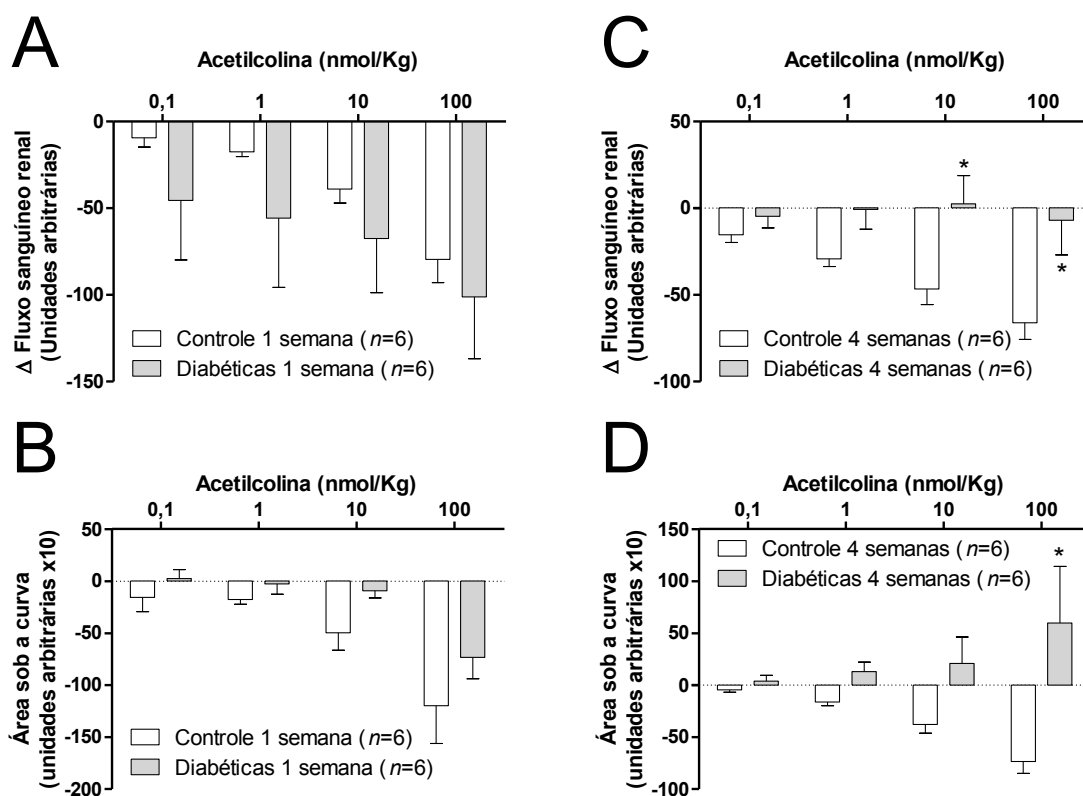


**Figura 31 – Frequência cardíaca de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para acetilcolina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (em bpm; A e C) e a área sob a curva (em unidades arbitrárias; B e D) dos efeitos gerados sobre a frequência cardíaca. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da frequência cardíaca. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 32 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo renal obtida pela administração de acetilcolina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

A administração sistêmica de acetilcolina induziu diminuição do fluxo sanguíneo renal de modo dependente da dose administrada. Na primeira semana após o tratamento com STZ ou veículo não observamos diferença entre os grupos para as variações no fluxo sanguíneo renal ocasionadas pela administração de acetilcolina (Figura 32A e 32B).

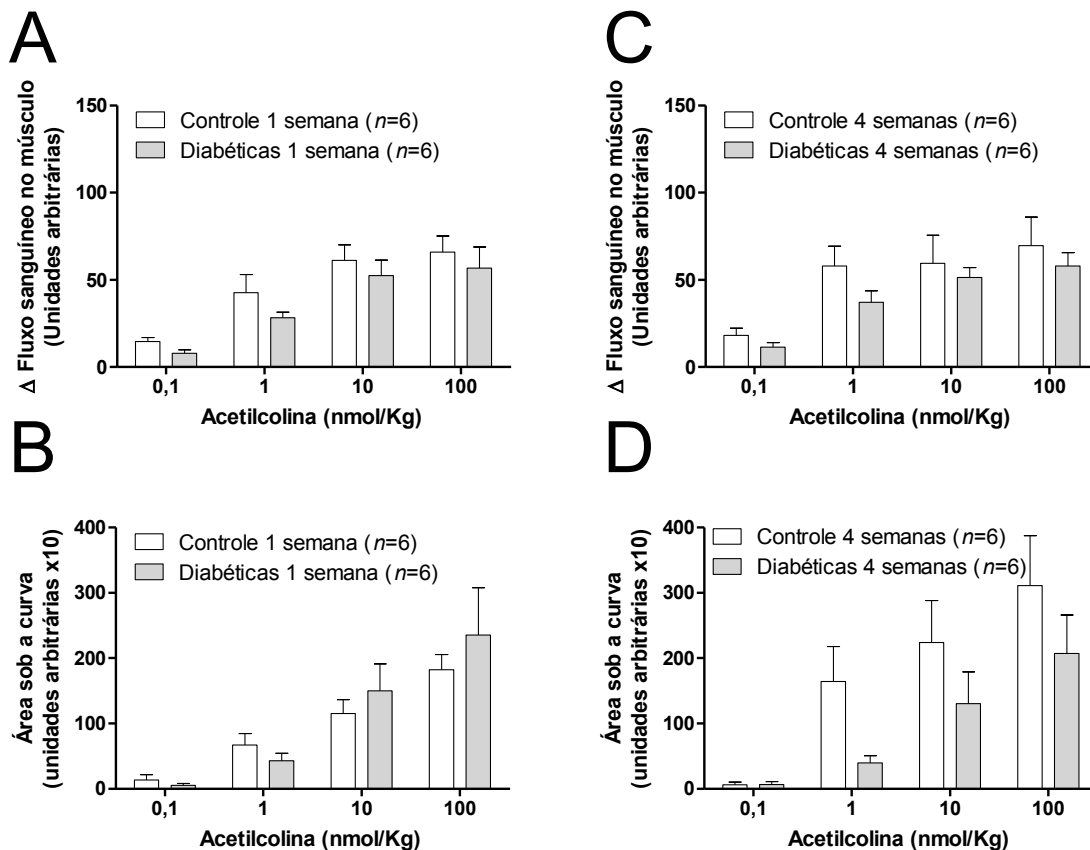
Por outro lado, na quarta semana após o tratamento com STZ ou veículo, observamos que as maiores doses de acetilcolina (10 e 100 nmol/Kg) tiveram o delta máximo de relaxamento menor no grupo diabético (Figura 32C); enquanto que a dose de 100 nmol/Kg de acetilcolina apresentou uma menor área sob a curva para a variação do fluxo sanguíneo renal, ao tempo que o controle apresentava uma maior queda no fluxo sanguíneo renal para esta mesma dose (Figura 32D).



**Figura 32 – Fluxo sanguíneo renal de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para acetilcolina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo renal, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo renal. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 33 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo no músculo esquelético obtida pela administração de acetilcolina e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

Quando administrada de forma sistêmica, não observamos diferenças no aumento do fluxo sanguíneo muscular no gastrocnêmio induzido pela acetilcolina entre os grupos, tanto na primeira semana (Figura 33A e 33B) quanto na quarta semana (Figura 33C e 33D) após os tratamentos.



**Figura 33 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de acetilcolina.**

Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para acetilcolina foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo muscular, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo muscular. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

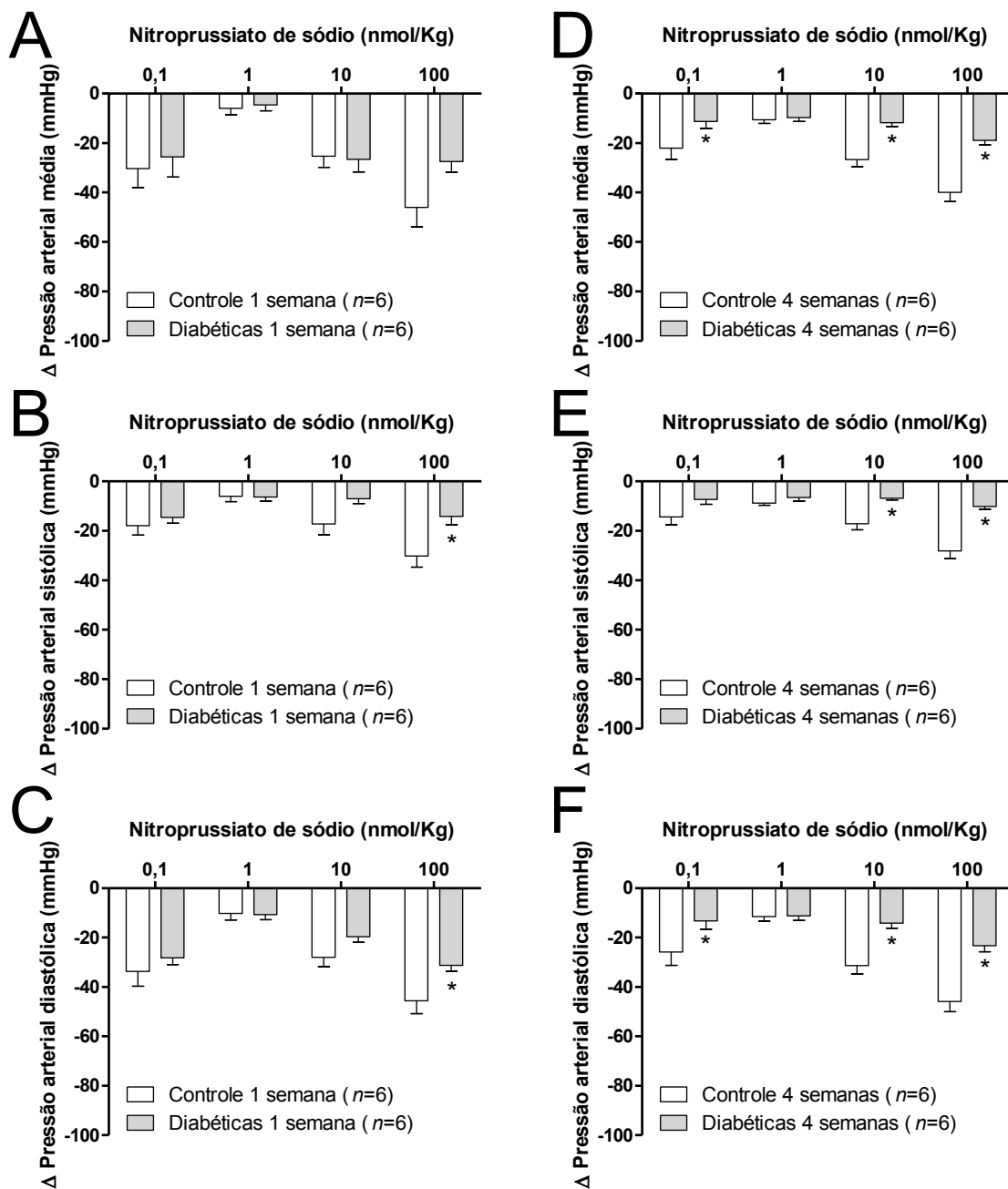


#### 4.2.4 Diabetes induz prejuízo vascular independente do endotélio

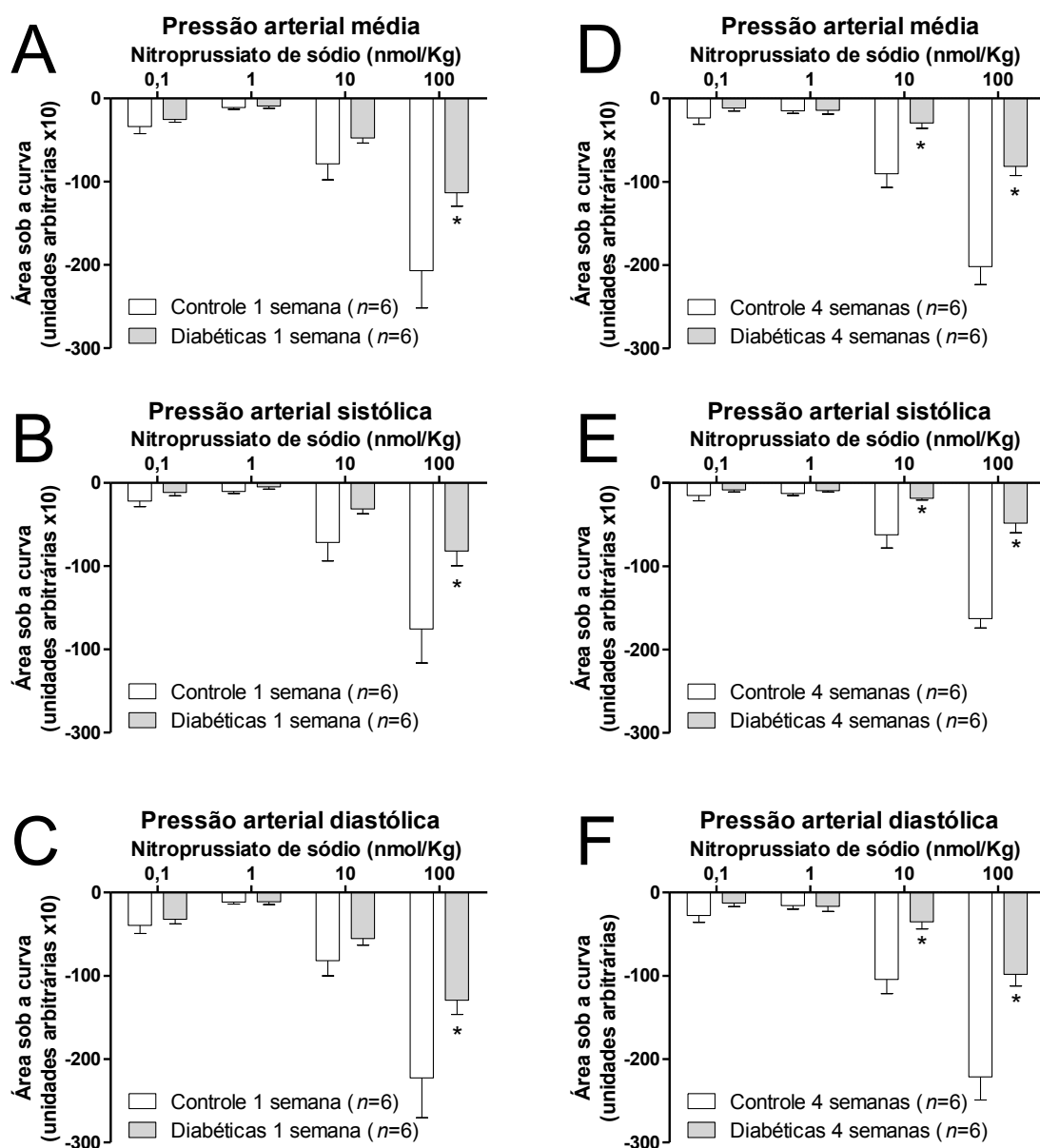
A Figura 34 mostra o delta de variação das PAM, PAS e PAD obtidas pela administração de nitroprussiato de sódio expresso em mmHg; enquanto que a Figura 35 mostra a área sob a curva dessas respostas pressóricas expressa em unidades arbitrárias.

O doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, induziu uma queda na PAM, na PAS e na PAD de ratas diabéticas e de ratas controle (Figura 34). Uma semana após o tratamento com STZ ou veículo observamos um menor delta e uma menor área sob a curva para a resposta de diminuição da pressão arterial de ratas diabéticas induzida por nitroprussiato de sódio (100 nmol/Kg) na PAS (Figura 34B e Figura 35B) e na PAD (Figura 34C e Figura 35C). E, ainda para a mesma dose, também observamos uma menor área sob a curva na PAM (Figura 34A) sem, contudo, apresentar diferença no delta do efeito máximo (Figura 35A).

Na quarta semana após o tratamento com STZ ou veículo observamos que houve uma menor resposta vasorrelaxante no grupo diabético quando analisado o delta da resposta máxima obtida com as administrações das doses de 0,1, 10 e 100 nmol/Kg de nitroprussiato de sódio na PAM (Figura 34D) e na PAD (Figura 34F) e nas doses de 10 e 100 nmol/Kg de nitroprussiato de sódio na PAS (Figura 34E). Já quando avaliada a área sob a curva do efeito vasorrelaxante do nitroprussiato de sódio, observamos uma menor área para as doses de 10 e 100 nmol/Kg de nitroprussiato de sódio no grupo diabético para a PAM (Figura 35D), PAS (Figura 35E) e PAD (Figura 35F).



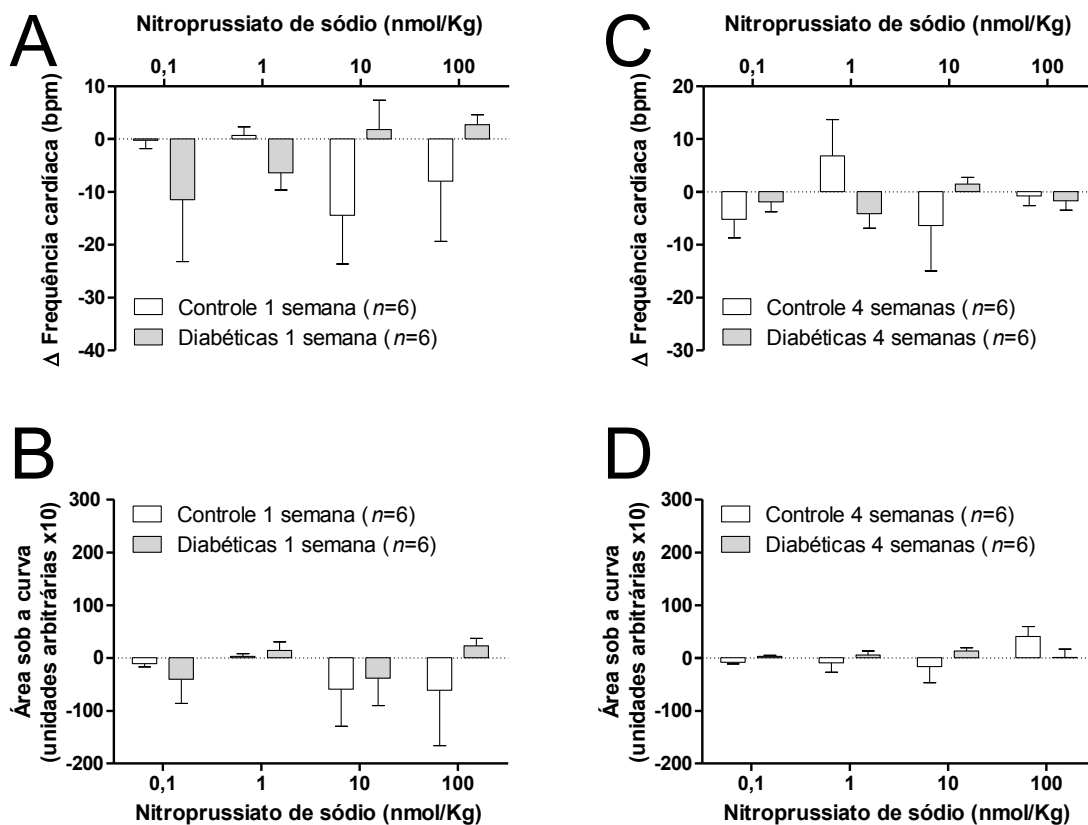
**Figura 34 – Variação da pressão arterial de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da pressão arterial aferida em mmHg. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



**Figura 35 – Área sob a curva da pressão arterial de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A, B e C) e 4 semanas após o tratamento (D, E e F). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio foi realizada, sendo registrados os efeitos gerados sobre a pressão arterial média (A e D), a pressão arterial sistólica (B e E) e a pressão arterial diastólica (C e F). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão arterial medida em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 36 mostra o delta da variação da frequência cardíaca obtida pela administração de nitroprussiato de sódio e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

A variação da frequência cardíaca induzida pela administração sistêmica de nitroprussiato de sódio não foi diferente entre os grupos na primeira (Figura 36A e 36B) e na quarta semana (Figura 36C e 36D) após os tratamentos com STZ ou veículo.

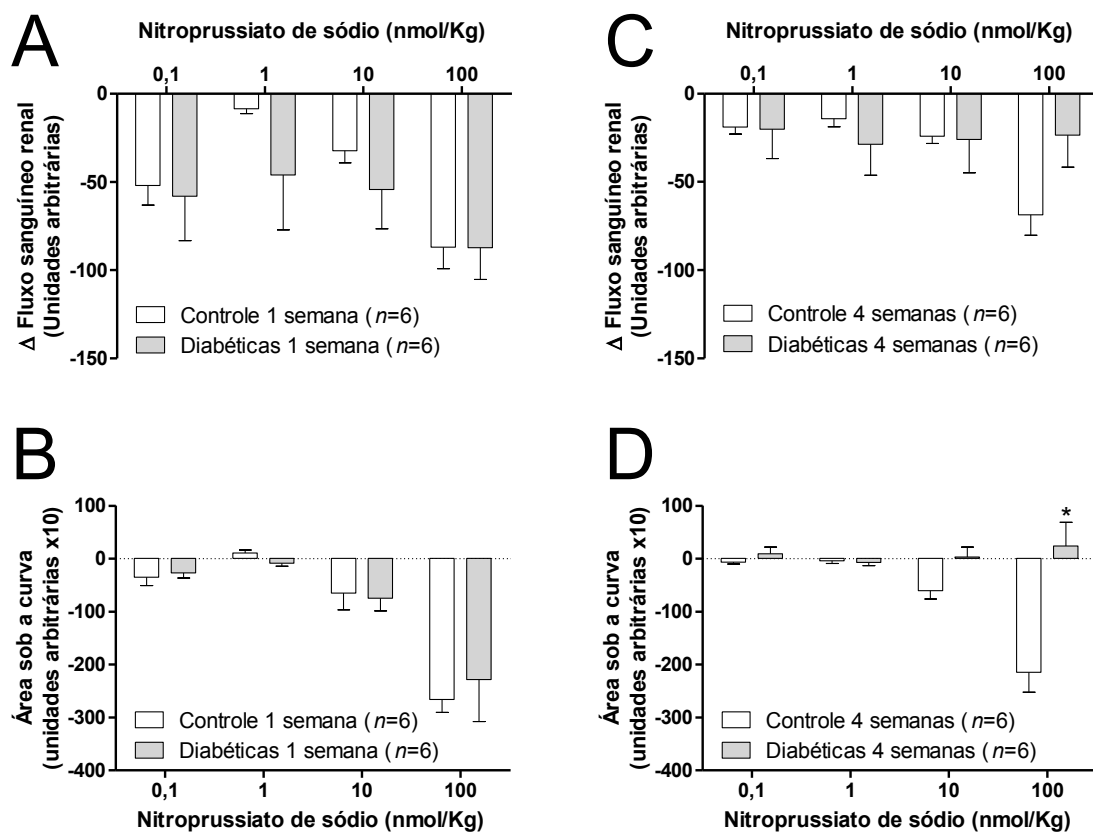


**Figura 36 – Frequência cardíaca de ratos controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio foi realizada, sendo registrados o delta máximo (em bpm; A e C) e a área sob a curva (em unidades arbitrárias; B e D) dos efeitos gerados sobre a frequência cardíaca. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da frequência cardíaca. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 37 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo renal obtida pela administração de nitroprussiato de sódio e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias.

A administração sistêmica de nitroprussiato de sódio diminuiu o fluxo sanguíneo renal das ratas dos dois grupos (Figura 37). Na primeira semana, a administração de nitroprussiato de sódio não causou diferenças significativas no fluxo renal entre as ratas controle e diabéticas; seja quando esse resultado é expresso como delta do efeito máximo (Figura 37A)

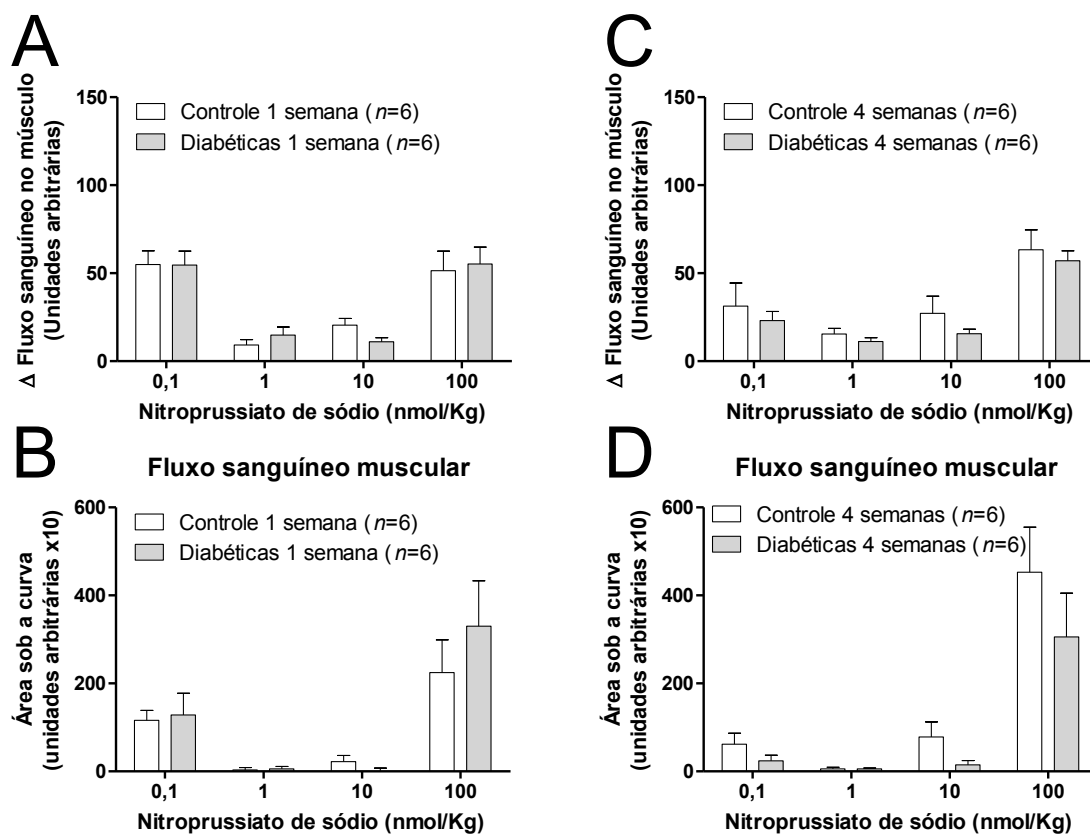
ou como área sob a curva (Figura 37B). Entretanto, na quarta semana, apenas para a dose de 100 nmol/Kg de nitroprussiato de sódio, a área sob a curva do fluxo sanguíneo renal foi menor nas ratas diabéticas do que no grupo controle (Figura 37D).



**Figura 37 – Fluxo sanguíneo renal de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo renal, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo renal. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

Por sua vez, a Figura 38 mostra o delta da variação do fluxo sanguíneo no músculo esquelético obtida pela administração de nitroprussiato de sódio e expresso em mmHg, assim como a área sob a curva desse mesmo efeito expresso em unidades arbitrárias. Sendo que a administração de nitroprussiato de sódio ocasionou aumento no fluxo sanguíneo muscular de forma dependente da dose e formando uma curva em forma de “U” (Figura 38).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quando analisados o delta do efeito máximo (Figura 38A e 38C) e a área sob a curva (Figura 38B e 38D) na primeira e na quarta semana após a indução do diabetes.

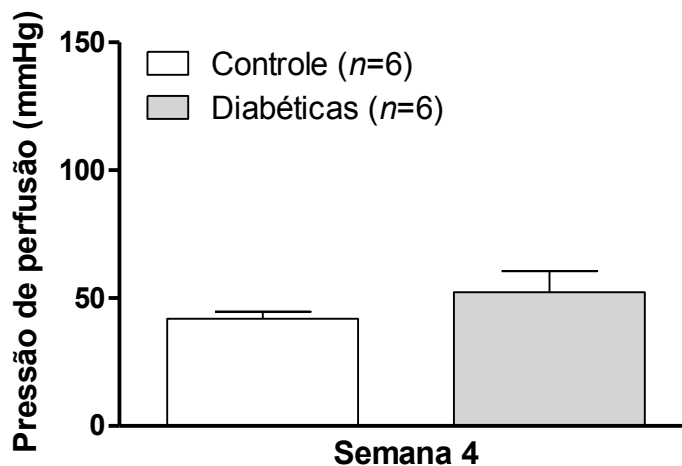


**Figura 38 – Fluxo sanguíneo na cabeça medial do musculo gastrocnêmio de ratas controle e diabéticas anestesiadas após a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) foram separadas em dois grupos experimentais: 1 semana após o tratamento (A e B) e 4 semanas após o tratamento (C e D). As ratas provenientes desses grupos experimentais foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão arterial conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.2 e 3.4.2, respectivamente. Uma curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio foi realizada, sendo registrados o delta máximo (A e C) e a área sob a curva (B e D) dos efeitos gerados sobre o fluxo sanguíneo muscular, ambos em unidades arbitrárias. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do fluxo sanguíneo muscular. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 4.3 Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas controle e diabéticas

A Figura 39 apresenta os valores basais da pressão de perfusão, em mmHg, obtidas a partir de preparações de pernas isoladas de ratas controle e diabéticas após 4 semana da administração de STZ ou veículo. Quatro semanas após a administração de STZ ou veículo, quando avaliada a pressão de perfusão basal do leito vascular da musculatura esquelética não

foi encontrada diferença entre os grupos. O grupo controle apresentou uma pressão de perfusão basal de  $42 \pm 7$  mmHg, ao passo que o grupo diabético, de  $52 \pm 20$  mmHg.



**Figura 39 – Valores pressóricos basais da pressão de perfusão de preparações de pernas isoladas de ratos controle e diabéticos após 4 semanas da administração de estreptozotocina ou veículo.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas, barra cheia) ou com veículo (controle, barra vazia) foram alocadas no grupo experimental 4 semana após o tratamento. As ratas provenientes desse grupo experimental foram anestesiadas e preparadas para a aferição da pressão de perfusão conforme métodos e protocolos descritos em 3.3.3 e 3.4.3, respectivamente. Após um período de 30 min de estabilização, os valores basais da pressão de perfusão eram aferidos, em mmHg. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Teste *t* de Student).

#### 4.3.1 Reatividade aos agentes vasoconstritores

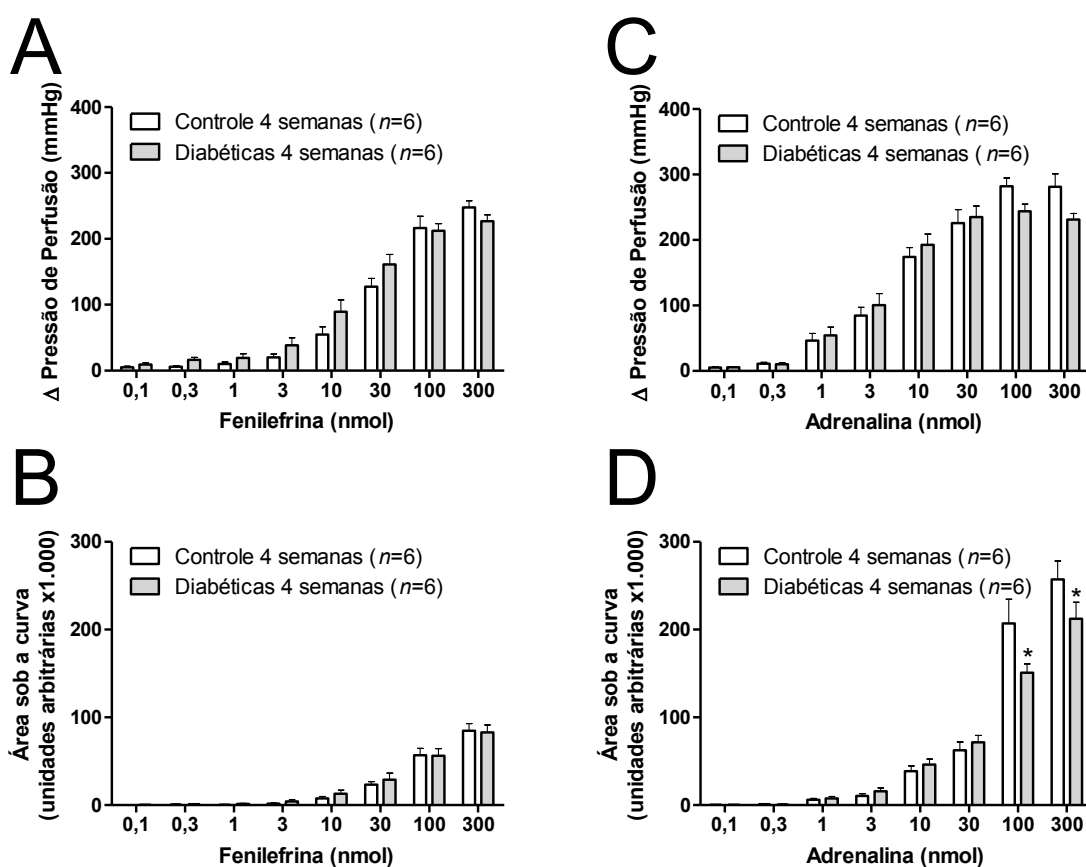
A Figura 40 mostra o delta de variação da pressão de perfusão obtida em preparações de pernas isoladas pelas administrações de fenilefrina (Figura 40A) e adrenalina (Figura 40C), expressas em mmHg, e as suas respectivas áreas sob a curva (Figura 40B e 40D).

Após 4 semana da administração de STZ ou veículo, no leito vascular da musculatura esquelética de ratos controle e de ratos diabéticos a fenilefrina induziu aumento na pressão de perfusão dependente da dose. O leito vascular da musculatura esquelética de ratos diabéticos (4 semanas) apresentou um delta máximo de contração para fenilefrina em torno de  $227 \pm 24$  mmHg, não sendo diferente da contração máxima apresentada pelo grupo controle, em torno de  $248 \pm 24$  mmHg. Os demais pontos da curva também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 40A), muito menos a área sob a curva (Figura 40B).

Por sua vez, a adrenalina também induziu aumento na pressão de perfusão de forma dependente da dose no leito vascular da musculatura esquelética de ratos controle e de ratos diabéticos. O efeito máximo do aumento na pressão de perfusão foi atingido já com a dose de

100 nmol. Dessa forma, obtivemos um aumento máximo na pressão de perfusão para o grupo diabético em torno de  $244 \pm 28$  mmHg e para o grupo controle em torno de  $282 \pm 30$  mmHg.

Quando analisado o delta da resposta máxima para o aumento da pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética, ocasionado pela administração de adrenalina nas preparações de pernas isoladas, não apresentou diferença entre os grupos (Figura 40C). Todavia, a área sob a curva para a adrenalina foi menor no grupo das ratas diabéticas após 4 semanas da administração de STZ, quando comparado com o grupo que recebeu veículo (Figura 40D).



**Figura 40 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para fenilefrina (A e B) e adrenalina (C e D).** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas, barras cheias) ou com veículo (controle, barras vazias) após 4 semanas do tratamento foram utilizadas neste experimento. Em A e C, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da variação da pressão de perfusão em mmHg. Em B e D, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão de perfusão em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

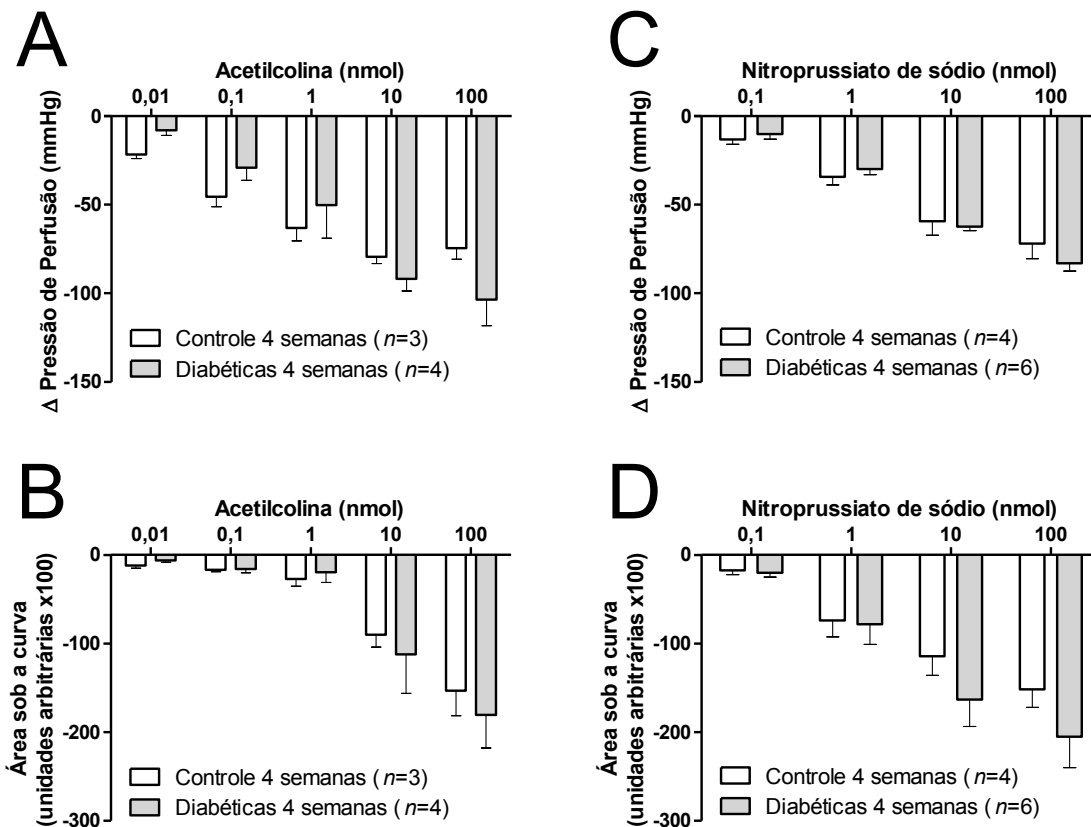


### 4.3.2 Reatividade aos agentes vasodilatadores

A Figura 41 mostra o delta de variação da pressão de perfusão obtida em preparações de pernas isoladas pelas administrações de acetilcolina (Figura 41A) e nitroprussiato de sódio (Figura 41C), expressas em mmHg, e as suas respectivas áreas sob a curva (Figura 41B e Figura 41D).

O efeito máximo da diminuição da pressão de perfusão ocasionada pela administração de acetilcolina no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas foi em torno de  $74 \pm 11$  mmHg, não sendo diferente do efeito máximo observado para o grupo controle, este, em torno de  $104 \pm 29$  mmHg. Também os demais pontos da curva dose resposta não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando analisado o delta (Figura 41A) e a área sob a curva (Figura 41B).

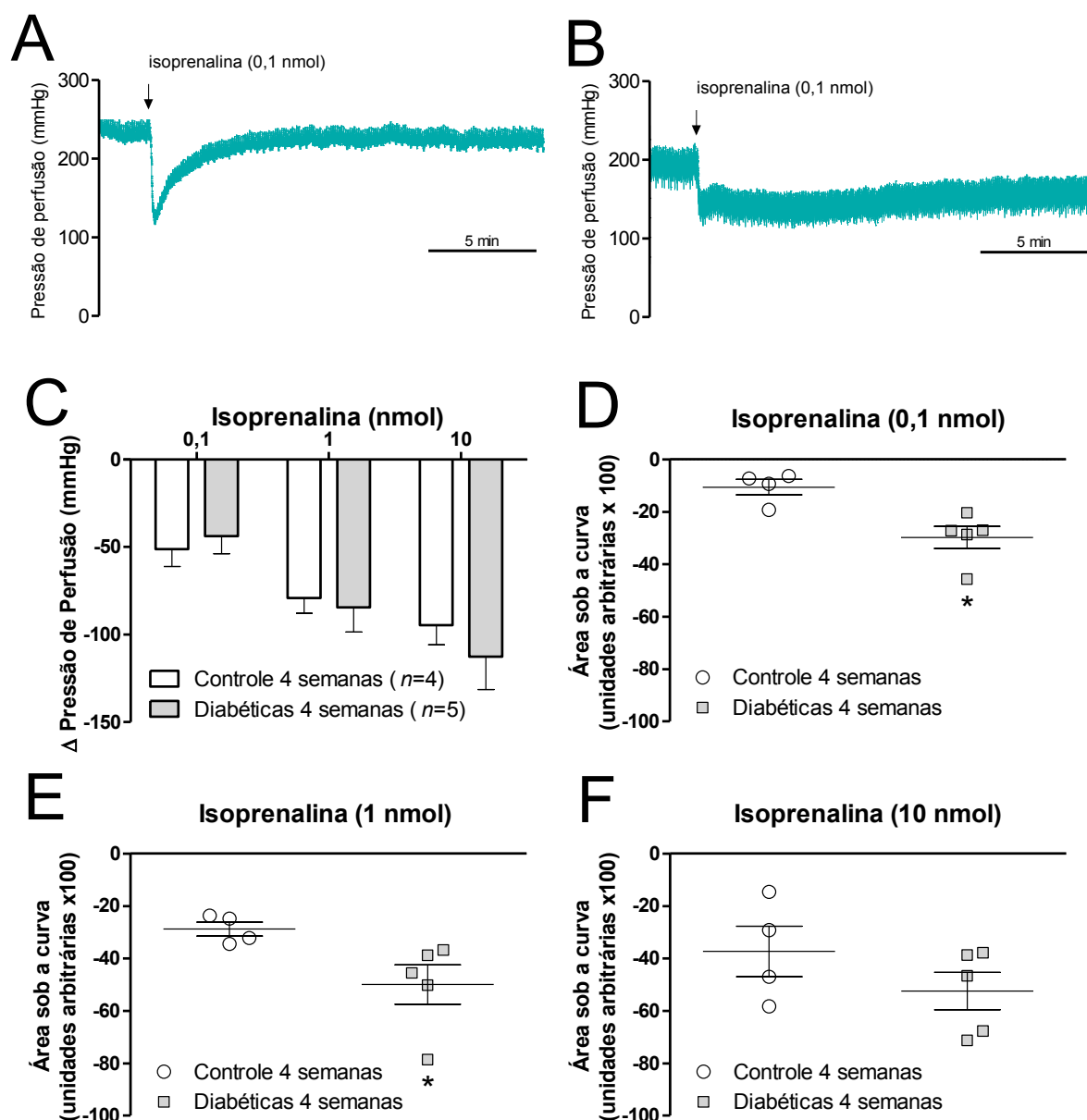
De modo semelhante ao que foi observado para a acetilcolina, a máxima diminuição da pressão de perfusão ocasionada pela administração de nitroprussiato de sódio no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas foi em torno de  $72 \pm 17$  mmHg, também não sendo diferente do efeito máximo observado para o grupo controle, este em torno de  $83 \pm 11$  mmHg. A curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio também não apresentou diferença estatisticamente significativa quando analisado o delta (Figura 41C) e a área sob a curva (Figura 41D).



**Figura 41 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para acetilcolina (A e B) e nitroprussiato de sódio (C e D).** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas, barras cheias) ou com veículo (controle, barras vazias) após 4 semanas do tratamento foram utilizadas neste experimento. Em A e C, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da variação da pressão de perfusão em mmHg. Em B e D, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão de perfusão em unidades arbitrárias. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas).

A Figura 42 apresenta a diminuição na pressão de perfusão induzida pela administração de isoprenalina no leito vascular da musculatura esquelética de ratas controle e de ratas diabéticas (4 semanas). Como podemos observar, a diminuição máxima ocasionada pela administração de isoprenalina no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas ( $95 \pm 23$  mmHg) não apresentou diferença quando comparada com o grupo controle ( $113 \pm 42$  mmHg), tampouco os demais pontos da curva (Figura 42C).

Todavia, quando analisados os primeiros 20 min das respostas obtidas com a administração das doses de isoprenalina, percebemos que as preparações provenientes de ratas diabéticas apresentaram diminuições na pressão de perfusão com magnitude maior do que a que foi observada para o grupo controle, demonstrado pela área sob a curva. (Figura 42D e 42E).



### Figura 42 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas

(4 semanas) para isoprenalina. Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) após 4 semanas do tratamento foram utilizadas neste experimento. É apresentado o registro de uma das preparações de perna isolada de animal controle (A) e diabético (B) demonstrando o efeito de uma dose de isoprenalina (0,1 nmol) reduzindo a pressão de perfusão das preparações e o seu retorno ao basal nos primeiros 5 min após a administração da dose. Em C é apresentado o delta da diminuição da pressão de perfusão das preparações ocasionada pela administração de doses crescentes de isoprenalina (0,1, 1 e 10 nmol) no grupo diabético (barras cheias) e controle (barras vazias). Na sequência são apresentados os valores da área sob a curva para o efeito da administração da isoprenalina nas doses de 0,1 nmol (D), 1 nmol (E) e 10 nmol (F) nas preparações de perna perfundida de ratas controle (círculos vazios) e diabéticas (quadrados cheios) durante 20 min após a administração. Em C, os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média da pressão de perfusão em mmHg. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas). Em D, E e F, os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa existente entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Teste *t* de Student.

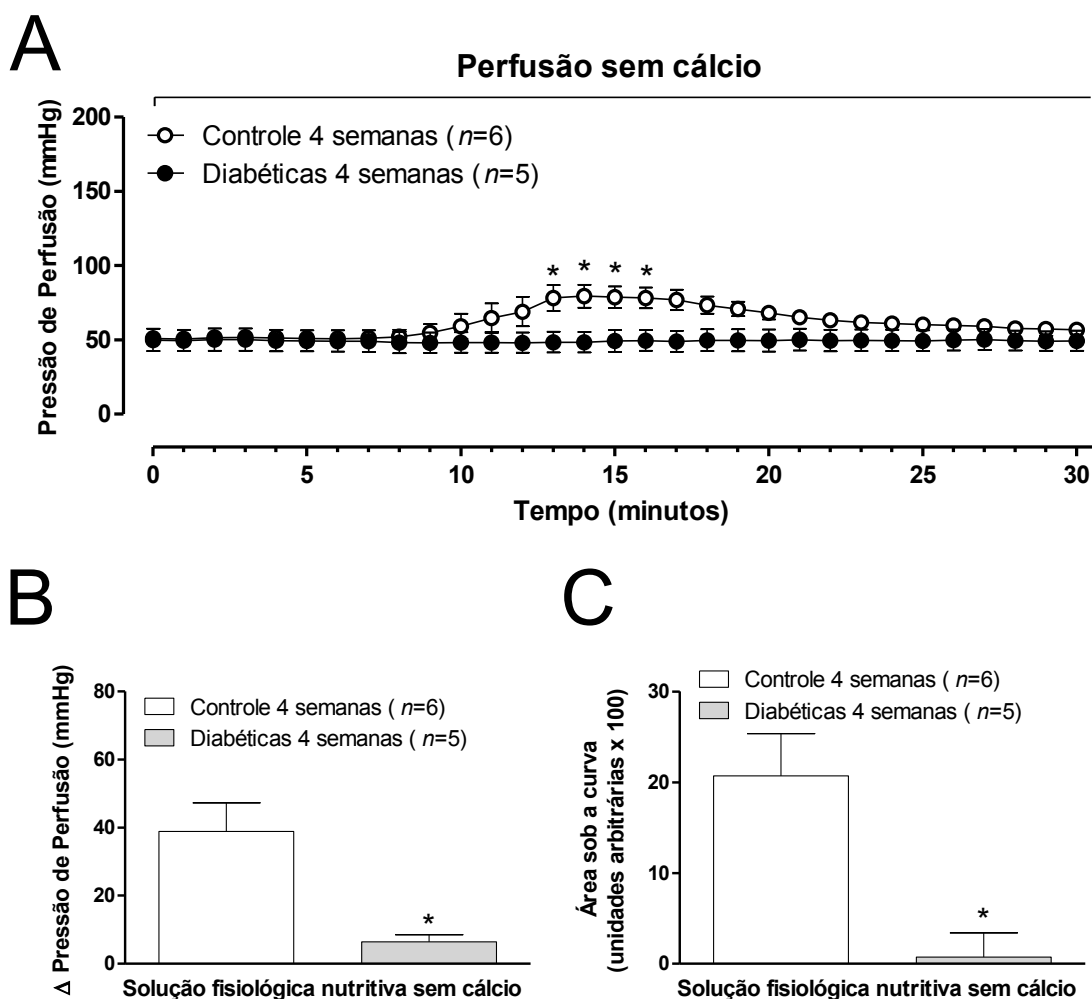
### 4.3.3 Mobilização e captação de cálcio no leito vascular da musculatura esquelética

A Figura 43 mostra o efeito da remoção do cálcio da composição do líquido de perfusão das pernas de ratas controle e diabéticas durante um período de 30 min. Podemos observar que a remoção de cálcio do líquido de perfusão induziu um aumento perceptível na pressão de perfusão dos leitos vasculares das ratas controle, mas não das ratas diabéticas, com o pico sendo atingido aproximadamente aos 15 min e retornando aos valores basais no tempo de 30 min (Figura 43A).

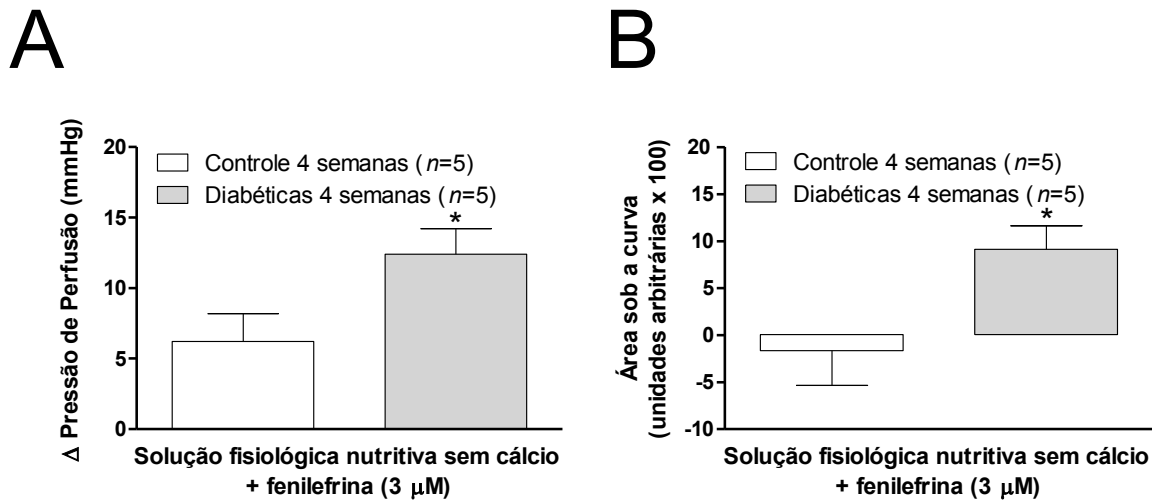
Durante os 30 min o aumento da pressão de perfusão nas pernas das ratas controle foi de  $39 \pm 21$  mmHg, enquanto que na perna das ratas diabéticas esse aumento foi menor, apenas  $6 \pm 5$  mmHg (Figura 43B). A Figura 43C traz o aumento na pressão de perfusão durante os 30 minutos iniciais da remoção de cálcio extracelular das pernas de ratas controle e diabéticas expresso como área sob a curva, demonstrando uma menor área sob a curva para o grupo das ratas diabéticas (4 semanas).

Na Figura 44 é apresentada a reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) à fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ) em meio zero cálcio. A adição de fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ) em meio zero cálcio foi capaz de aumentar sutilmente a pressão de perfusão dos leitos vasculares da musculatura esquelética de pernas de ratas controle e de ratas diabéticas ao longo de 30 min, sendo esse aumento maior nas preparações provenientes de ratas diabéticas, conforme observado tanto com o delta dessa sutil elevação (Figura 44A), como pela área sob a curva (Figura 44B).

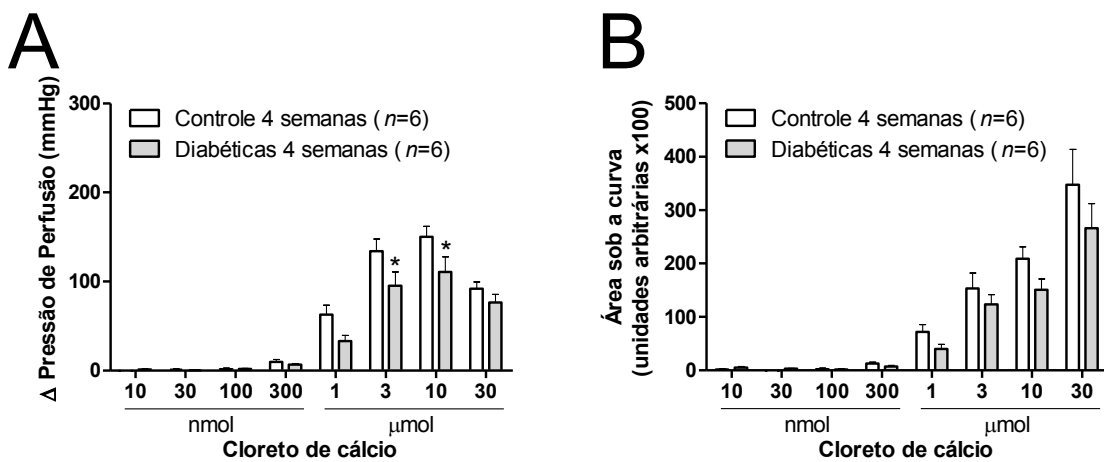
A Figura 45 apresenta a reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para o cálcio, expressa como delta (em mmHg; Figura 45A) e como área sob a curva (em unidades arbitrárias; Figura 45B). O delta da contração induzida pela administração de doses crescentes de cálcio nas preparações de perna isolada foi maior no leito vascular da musculatura esquelética das pernas de ratas controle do que no leito vascular das pernas de ratas diabéticas, ambas estimuladas constantemente com fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ) presente no líquido de perfusão sem cálcio. Por sua vez, não houve diferença entre os grupos quando analisada a área sob a curva para o mesmo efeito.



**Figura 43 – Efeito da remoção de cálcio da solução de perfusão no tônus basal do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas).** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) após 4 semanas do tratamento foram utilizadas neste experimento. Em A é apresentada a pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas controle (círculos vazios) e ratas diabéticas (círculos cheios) minuto a minuto ao longo de 30 min após a remoção de cálcio do meio extracelular. Na sequência é apresentado o aumento na pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética obtido com preparações de pernas de ratas controle (barras vazias) e diabéticas (barras cheias), durante os 30 min após a remoção de cálcio do meio extracelular, expresso como delta da variação em mmHg (B) e da área sob a curva em unidades arbitrárias (C). Os círculos e as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da pressão de perfusão em mmHg (A), do delta do aumento da pressão de perfusão em mmHg (B) e da área sob a curva da pressão de perfusão em unidades arbitrárias (C). \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni (A). Teste *t* de Student (B e C).



**Figura 44 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) à fenilefrina (3  $\mu$ M) em meio zero cálcio.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas) ou com veículo (controle) após 4 semanas do tratamento foram utilizadas neste experimento. Após 30 min da perfusão dos leitos vasculares da musculatura esquelética com solução de perfusão sem cálcio era adicionada fenilefrina (3  $\mu$ M) à solução de perfusão. Os gráficos expressam os primeiros 30 min após essa adição. Em A, é demonstrado o delta da contração máxima dos grupos controle (barras vazias) e diabéticas (barras cheias), enquanto que em B, é apresentada a área sob a curva desses mesmos grupos. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença significativa existente entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Teste *t* de Student.



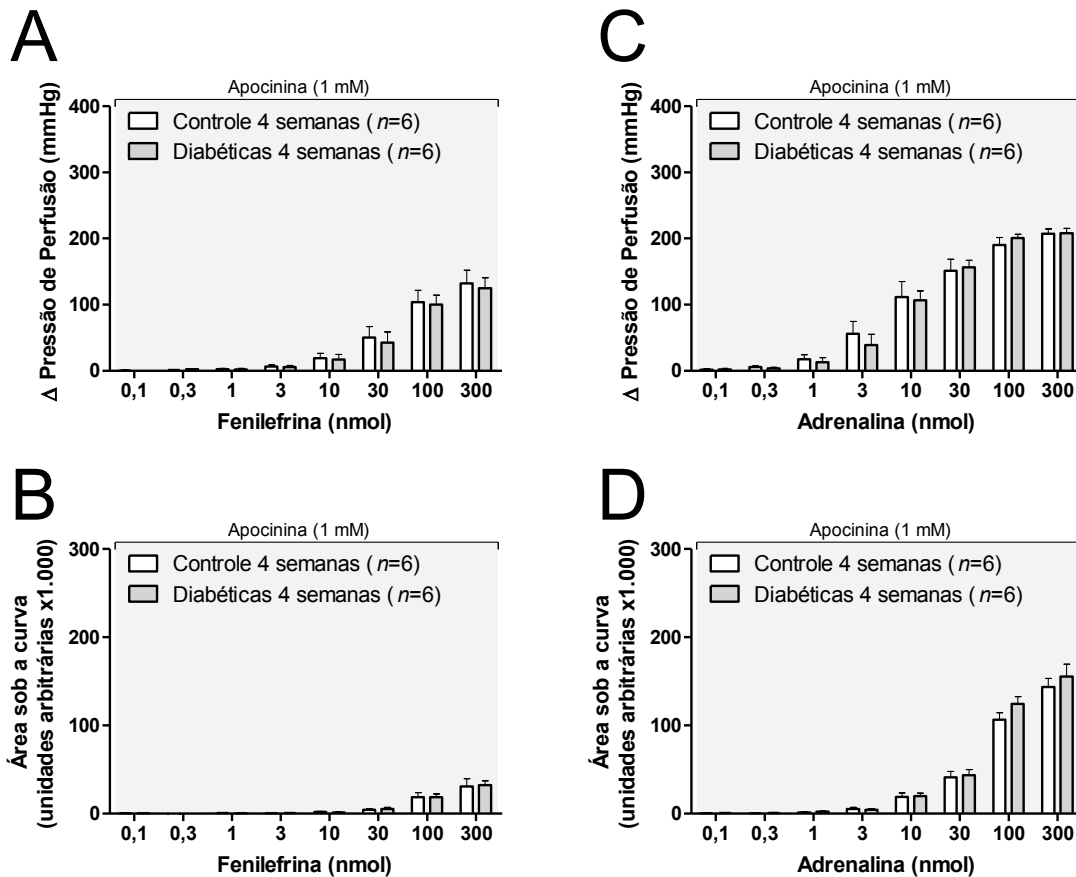
**Figura 45 – Reatividade do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (4 semanas) para o cálcio.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas, barras cheias) ou com veículo (controle, barras vazias) após 4 semanas do tratamento foram utilizadas neste experimento. Concentrações crescentes de cálcio foram adicionadas ao líquido de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de preparações de pernas de ratos controle (barras vazias) e de ratos diabéticas (barras cheias) e as mudanças na pressão de perfusão (em mmHg) foram medidas. As preparações foram previamente expostas ao meio zero cálcio por 30 min, com subsequente exposição à fenilefrina (3  $\mu$ M), naquele mesmo meio, por mais 30 min. Em A, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da variação da pressão de perfusão em mmHg. Em B, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão de perfusão em unidades arbitrárias. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.3.4 Participação das EROs na resposta do leito vascular da musculatura esquelética aos agentes vasopressores frente ao contexto hiperglicêmico

Com a finalidade de avaliar a participação das EROs nas respostas evocadas pelos agentes vasoconstritores fenilefrina e adrenalina quando administrados nas preparações do leito vascular da musculatura esquelética, utilizamos como ferramenta farmacológica a apocinina, um antioxidante capaz de inibir a ação da NADPH oxidase. A Figura 46 apresenta o efeito da apocinina sobre a pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas e controle, em mmHg, quando realizada a administração de fenilefrina (Figura 46A e 46B) e de adrenalina (Figura 46C e 46D) nas preparações de pernas perfundidas.

A perfusão do leito vascular da musculatura esquelética com apocinina (1 mM) diminuiu a resposta máxima para a fenilefrina em torno de 41,8% (controle) e 49,6% (diabéticas). Dessa forma, foram observados deltas máximos da pressão de perfusão em torno de  $132\pm 49$  mmHg, para o grupo controle, e  $125\pm 39$  mmHg, para o grupo diabético. Todavia não houve diferença entre os grupos quando avaliadas e comparadas as respostas obtidas com a curva dose resposta para fenilefrina realizada nas preparações proveniente de ratas controle e diabéticas, tanto quando expressas como delta (Figura 46A) como quando expressas como área sob a curva (Figura 46B).

De forma semelhante, para a adrenalina observamos uma diminuição da resposta máxima em torno de 15,2% (controle) e 26,2% (diabéticas). Nessas condições experimentais o delta máximo do aumento da pressão de perfusão foi de aproximadamente  $207\pm 18$  mmHg, para o grupo controle, e  $208\pm 18$  mmHg, para o grupo diabético. Diferentemente do que foi observado na realização da curva dose resposta para adrenalina na Figura 14, onde a resposta máxima foi obtida com a dose de 100 nmol, aqui a resposta máxima foi obtida com a maior dose utilizada (300 nmol). Não houve diferença entre os grupos quando avaliadas e comparadas as respostas obtidas com a curva dose resposta para adrenalina realizada nas preparações proveniente de ratas controle e diabéticas, tanto quando expressas como delta (Figura 46C) como quando expressas como área sob a curva (Figura 46D).



**Figura 46 – Efeito da apocinina sobre as respostas da fenilefrina e da adrenalina na perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas e controle.** Ratas tratadas com estreptozotocina (50 mg/Kg; diabéticas, barras cheias) ou com veículo (controle, barras vazias) após 4 semanas do tratamento foram utilizadas neste experimento. Curvas dose resposta para a fenilefrina e para a adrenalina foram realizadas no leito vascular da musculatura esquelética da perna isolada de ratas controle e diabéticas em presença de apocinina (1 mM) e o delta na pressão de perfusão (A e B) e a área sob a curva (C e D) foram avaliados. Em A e C, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da variação da pressão de perfusão em mmHg. Em B e D, as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média da área sob a curva da pressão de perfusão em unidades arbitrárias. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas).



## 5 DISCUSSÃO

### Diabetes

---

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico que pode ser diagnosticado através da medida glicêmica (WHO, 2019). São considerados diabéticos os sujeitos que apresentam valores glicêmicos em jejum de 8 horas iguais ou superiores a 126 mg/dL, ou ainda, valores glicêmicos casuais, acompanhados de sintomas de hiperglicemia, iguais ou superiores a 200 mg/dL (ADA, 2020).

Os dois principais tipos de diabetes mellitus são o do tipo 1, com uma deficiência quase que absoluta de liberação de insulina devido à destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas (ORAM et al. 2015; ŽALIŇSKA et al., 2016), e o do tipo 2, com perda progressiva da adequada secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, frequentemente associada à diminuição da sensibilidade à ação da insulina (ADA, 2020). E, uma vez que ainda não se conhece a cura do diabetes, a utilização de modelos animais experimentais com intuito de aprofundar os conhecimentos mecanísticos dessa patologia para a busca de estratégias para sua cura e tratamento é necessária.

Um dos modelos em experimentação animal para estudar o diabetes é o da administração de STZ por via intraperitoneal que induz hiperglicemia em roedores (HERR; JAHNKE; ARGOUDELIS, 1967; JUNOD et al., 1967) e que foi o modelo usado para a condução desse trabalho. Em nosso estudo em ratas, classificamos como diabéticos os animais que apresentaram valores glicêmicos acima de 250 mg/dL (Figura 9), conforme a literatura (LIN et al., 2017; OZCAN et al., 2017; SIBA et al., 2017).

Além da hiperglicemia, também observamos outras manifestações clínicas do diabetes comumente percebidas na literatura, como perda de peso (KATOVICH; MELDRUM, 1993; LIN et al., 2017; OZCAN et al., 2017), polifagia (LIN et al., 2017), polidipsia e poliúria (KATOVICH; MELDRUM, 1993; KATOVICH; MELDRUM; VASSELLI, 1991). Essas manifestações são bastante importantes tanto para realizar o diagnóstico como para avaliar o controle e progressão da doença. Quando ocorre a descompensação do diabetes, tais manifestações são intensificadas, o que impacta diretamente na ocorrência e no desenvolvimento de complicações decorrentes do diabetes.

A indução de um estado hiperglicêmico em ratas que mimetiza o diabetes mellitus tipo 1 é explicada pela destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, conforme demonstrado por Junod et al. (1967), e revisado em 2008 por Lenzen (2008). Esses estudos demonstram que a STZ, por ser um análogo tóxico da glicose, entra nas células  $\beta$ -pancreáticas através do GLUT2

desencadeando a geração de EROs, como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e, por fim, radicais hidroxila, sendo estes os responsáveis pela morte das células  $\beta$ -pancreáticas.

Dessa forma, a observação das manifestações clínicas nas ratas diabéticas, no presente estudo, sugere que houve lesão das células  $\beta$ -pancreáticas nestas, com prejuízo na secreção de insulina, e consolida o fato de que conseguimos obter um estado de hiperglicemia nesses animais semelhante ao que é observado na clínica para o diabetes mellitus tipo 1, quando não tratado.

Na avaliação da pressão arterial, da frequência cardíaca e dos fluxos sanguíneos renal e do musculo esquelético de ratas controle e diabéticas, observamos que na primeira semana não houve diferença entre os grupos quando avaliados os valores basais dos parâmetros citados (Figura 12). Contudo, na quarta semana o grupo diabético apresentou menores valores basais para a PAM, a PAS, a PAD e o fluxo sanguíneo renal, quando comparados com os valores basais do grupo controle (Figura 13). Resultados semelhantes foram encontrados por Nagareddy et al. (2005) e demonstram que nas ratas diabéticas há um comprometimento das adaptações fisiológicas à diminuição natural da complacência arterial pela idade.

Em nosso estudo, observamos nas ratas diabéticas hiporresponsividade a agentes vasoconstritores e vasorrelaxantes. Dentre os diversos sistemas, o cardiovascular é significativamente impactado pelo estado de hiperglicemia crônico que se instaura no organismo dos acometidos pelo diabetes (KANNEL; MCGEE, 1979). Seja pelo desenvolvimento de doenças microvasculares (DCCT RESEARCH GROUP, 1993, 1994) como pelo desenvolvimento de doenças macrovasculares (NATHAN et al., 2003, 2005).

Através da mensuração da pressão arterial de animais anestesiados é possível verificar a capacidade responsiva a agentes vasoativos (ANTON et al., 2019). E, dentre os agentes vasoconstritores que induziram respostas pressoras diminuídas nas ratas diabéticas está a adrenalina. A adrenalina é um potente agonista adrenérgico não seletivo (ADEBOYE et al., 1988), isto é, possui afinidade tanto para os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos quanto para os receptores  $\beta$ -adrenérgicos (CHEN et al., 1993).

A administração de adrenalina elevou os valores pressóricos das ratas controle e diabéticas. No entanto, nos animais diabéticos foi possível observar já na primeira semana a diminuição da habilidade da adrenalina em elevar a PAM (AUC; Figura 15A) e PAS (delta e AUC; Figura 14B e Figura 15B, respectivamente), sem alterações sobre a elevação da PAD. A diminuição da resposta da adrenalina sobre a PAS (delta) foi mantida até a quarta semana após a indução do diabetes (Figura 14E). Dados da literatura mostram a diminuição da habilidade da adrenalina em elevar a PAM em ratos 4 semanas após a administração

intravenosa de STZ, numa dose de 60 mg/Kg (LEUNG; PANG, 2014). Esses resultados fornecem indícios de que há uma disfunção cardiovascular nesses animais decorrente do diabetes.

Na primeira semana, a adrenalina induziu um maior aumento na frequência cardíaca das ratas diabéticas, quando comparadas com as ratas do grupo controle (Figura 16). Por sua vez, a administração de adrenalina causou diminuição do fluxo renal nas ratas, sendo que essa diminuição foi menos robusta nas ratas diabéticas na primeira semana, sugerindo um menor aumento na resistência vascular periférica das ratas diabéticas quando comparado com o que foi induzido pela adrenalina nas ratas controle (Figura 17A e 17B). Se, por um lado, a frequência cardíaca influencia o débito cardíaco, por outro lado, a mensuração do fluxo sanguíneo fornece importantes informações com relação à resistência vascular periférica; esta e o débito cardíaco são os determinantes da pressão arterial (GUYTON, 1981; TITZE; LUFT, 2017). Assim, esses achados indicam que há um comprometimento vascular nas ratas diabéticas.

Corroborando com a nossa hipótese de que no diabetes há comprometimento vascular e prejuízo na irrigação da musculatura esquelética, observamos que o aumento do fluxo sanguíneo para a região de membros inferiores, induzido por adrenalina, está prejudicado na primeira semana em ratas diabéticas (Figura 18B). Estudos demonstram que anormalidades na distribuição do fluxo sanguíneo na musculatura esquelética estão envolvidas na gênese da doença vascular periférica (BUTCHER et al., 2013). Isso significa que essa diminuição da habilidade da adrenalina em aumentar o fluxo sanguíneo da musculatura esquelética na primeira semana após a indução do diabetes pode refletir um processo inicial de comprometimento desses vasos e sua função na musculatura esquelética, ainda que esse efeito não tenha sido observado na quarta semana.

Ainda sobre a adrenalina ocasionar um maior aumento na frequência cardíaca das ratas diabéticas na primeira semana, quando comparado com o grupo controle (Figura 16), os efeitos da adrenalina na frequência cardíaca podem ser da ativação de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos no coração. E esse maior aumento, observado nas ratas diabéticas após uma semana do tratamento com STZ, indica que no início do diabetes há uma maior regulação autonômica, possivelmente no intuito de manter a homeostasia. Contudo, não houve mais diferença no aumento da FC entre os grupos na quarta semana, o que sugere que, com o passar do tempo, a regulação autonômica passaria a não responder mais aos estímulos pressóricos (Figura 16).

Carillion et al. (2017), demonstram que ratos após 8 semanas do tratamento com STZ passam a exibir bradicardia. Os achados de Vinik e Ziegler (2007), apoiam esses achados, uma vez que, em fases tardias do diabetes, há um comprometimento da sinalização autonômica que pode culminar em uma neuropatia diabética autonômica. Dessa forma, nosso resultado parece corroborar com a ideia de que há uma elevada regulação autonômica inicial que, no decorrer do tempo, torna-se comprometida. Para melhor investigar a contribuição da ativação dos diferentes receptores do sistema nervoso autônomo, fizemos uso de agonistas alfa e beta adrenérgicos separadamente.

Assim, para prosseguirmos na avaliação vascular das ratas diabéticas, utilizamos a fenilefrina, um agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico ( $K_i = 6,1 \mu\text{M}$ ), com pouca ou nenhuma atividade sobre os receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $K_i = 13 \mu\text{M}$  para receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos) (CHEN et al., 1993; KIRK et al., 1986). Ao utilizarmos a fenilefrina, observamos um aumento nos valores pressóricos dos dois grupos experimentais, sendo que a fenilefrina foi menos eficaz para aumentar a pressão arterial de ratas diabéticas do que de ratas controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Ma et al. (2008), ao avaliarem as alterações funcionais nos estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis ao  $\text{IP}_3$  e à rianodina em ratos diabéticos, após 16 semanas da administração de STZ, por técnicas funcionais e moleculares. E isso sugere que a hiporresponsividade da musculatura lisa vascular a agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos é devido a alterações na via de liberação de cálcio sensível ao  $\text{IP}_3$  no retículo sarcoplasmático de animais diabéticos.

A diminuição da resposta pressora nas ratas diabéticas foi observada na primeira e na quarta semana, observada pelos valores da PAM, da PAS e da PAD (Figura 14 e Figura 15). Essa menor elevação na pressão arterial também foi associada a uma menor diminuição da frequência cardíaca nessas ratas diabéticas (Figura 16). O controle autonômico é um dos reguladores da frequência cardíaca (BERNTSON et al., 1997) e o diabetes é uma das principais causas de neuropatia autonômica (EWING, 1978; RUNDLES, 1945). Aliás, a neuropatia autonômica cardíaca figura como uma das principais complicações do diabetes (LEFRANDT et al., 2010; SCHÖNAUER et al., 2008; VINIK et al., 2003), está relacionada ao aumento da mortalidade em pacientes diabéticos (EWING; CAMPBELL; CLARKE, 1976). E nossos resultados sugerem uma redução do controle autonômico nos animais diabéticos.

A fenilefrina diminuiu o fluxo sanguíneo renal nas ratas controle e diabéticas. No entanto, na quarta semana foi mais eficaz na diminuição do fluxo sanguíneo renal nas ratas controle do que nas ratas diabéticas. Esses dados sugerem que a contração vascular induzida

por fenilefrina em ratas diabéticas está comprometida. Em um estudo desenvolvido por Sattar et al. (2008), não foram encontradas diferenças nas variações de fluxo sanguíneo renal de ratos diabéticos 1 semana após o tratamento com STZ quando artérias renais eram estimuladas com fenilefrina. Esses autores ainda evidenciaram a participação dos receptores  $\alpha_{1A}$ - e  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos na vasoconstrição renal, o que ocasiona a diminuição do fluxo sanguíneo. Possivelmente, a menor eficácia da fenilefrina em contrair a artéria renal das ratas diabéticas na quarta semana esteja relacionada à dessensibilização desses receptores, o que contribuiria para a menor redução do fluxo sanguíneo renal nesses animais.

Resultados semelhantes foram obtidos em artérias renais de cães diabéticos por Gebremedhin et al. (1989). Contudo, em condições experimentais onde o endotélio era removido, a fenilefrina apresentou maior contração nos anéis de artéria renal dos cães diabéticos. E esses achados corroboram com os nossos dados demonstrando que, com o tempo, os danos vasculares vão se intensificando frente ao diabetes descompensado, o que pode ser ainda mais agravado quando na presença de disfunções endoteliais.

A fenilefrina aumentou o fluxo sanguíneo da musculatura esquelética nas ratas (Figura 23). E, quando comparado esse efeito com o que foi encontrado para a adrenalina (Figura 18), percebemos que a fenilefrina ocasionou um aumento menor. O que corrobora com a literatura (ADEBOYE et al., 1988; CHEN et al., 1993; KIRK et al., 1986) ao demonstrar a grande importância dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nesse aumento do fluxo e apenas uma possível residual participação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Além disso, esse aumento no fluxo sanguíneo da musculatura esquelética induzido pela fenilefrina pode ser apenas um reflexo do aumento da resistência vascular periférica que desviaria o fluxo para a musculatura esquelética, semelhante ao que ocorre para o exercício físico (HEARON; DINENNO, 2016; MORTENSEN; SALTIN, 2014).

Agora quando comparamos entre as ratas do grupo controle e diabéticas, a fenilefrina foi menos eficaz em aumentar o fluxo sanguíneo da musculatura esquelética nas ratas diabéticas na quarta semana (Figura 23). Recentemente a literatura demonstrou que em pacientes diabéticos do tipo 2 a redução do fluxo sanguíneo na musculatura esquelética está associada a uma inadequada vasoconstrição mediada por ativação do sistema nervoso autônomo simpático com ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (BOCK et al., 2020), o que reforça os nossos achados e corrobora com as nossas interpretações. Todos esses achados, obtidos com a fenilefrina em nosso estudo, apontam ainda mais para uma disfunção vascular nesses animais diabéticos.

Por sua vez, o estímulo com isoprenalina ocasionou uma queda na pressão arterial das ratas. Quando comparado ao grupo controle, essa queda foi bem menor nas ratas diabéticas na primeira semana e na quarta semana para a PAM, a PAS e a PAD (Figura 24 e Figura 25). A isoprenalina, também denominada de isoproterenol, é um agonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo que, em estudos utilizando átrios isolados de cobaia, apresentou um valor de  $EC_{50}$  de  $0,03 \mu M$  para os receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos (KIRK et al., 1982). Como já mostrado na literatura (BOLTER; LEDSONE, 1976), essa queda na pressão arterial induzida por isoprenalina foi acompanhada por uma taquicardia reflexa nas ratas controle e nas ratas diabéticas (Figura 26).

Contudo, o aumento da frequência cardíaca ocasionada pela administração de isoprenalina foi menor entre as ratas diabéticas somente na primeira semana (Figura 26). Esse menor aumento da frequência cardíaca pode ser explicado pela menor queda na pressão arterial observada nessa primeira semana (Figura 24 e Figura 25). Por sua vez, os resultados obtidos na quarta semana nos permite inferir que as ratas diabéticas nessa semana estavam taquicárdicas, uma vez que o aumento da frequência cardíaca das ratas diabéticas foi semelhante ao das ratas controle apesar da queda da pressão arterial continuar diminuída, o que nos sugere uma possível hiperativação simpática, mas apenas para os receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos.

O monitoramento das variações da frequência cardíaca pode ser utilizado para subsidiar o diagnóstico da neuropatia autonômica diabética (BELLAVERE et al., 1992; EWING et al., 1985; EWING, 1978; MACKAY et al., 1980; VINIK; ZIEGLER, 2007). A variabilidade da frequência cardíaca está diminuída em diabéticos (SCHÖNAUER et al., 2008). Em fases mais tardias da doença, há ocorrência de taquicardia em repouso e frequência cardíaca fixa, isto é, prejuízo na capacidade de variar a frequência cardíaca, o que aumenta o risco de óbito (VINIK; ZIEGLER, 2007). E em nosso resultado, embora não tenhamos observado uma taquicardia basal nas ratas diabéticas (Figura 12 e Figura 13), já percebemos que parece haver um descontrole na variação da frequência cardíaca aos agentes vasoativos, o que pode contribuir para a ocorrência de uma perda na capacidade de variar a frequência cardíaca em fases mais avançadas do diabetes.

Observamos também que a diminuição do fluxo sanguíneo renal, ocasionada pela administração de isoprenalina, foi menor em ratas diabéticas na primeira semana, mas não na quarta semana (Figura 27). A diminuição no fluxo renal induzida por isoprenalina (WICKLER et al., 1984) pode ser uma consequência da diminuição da pressão arterial e da menor resistência vascular periférica oferecida.

O aumento do fluxo sanguíneo no músculo gastrocnêmio, das ratas diabéticas, induzido por isoprenalina foi semelhante ao do grupo controle na primeira semana (Figura 28A-28C). Curiosamente, na quarta semana, a maior dose de isoprenalina desencadeou uma resposta de magnitude maior nas ratas diabéticas (Figura 28D), que não pode ser explicada pelo efeito hipotensor gerado pela mesma dose, uma vez que o grupo apresentou uma menor queda na pressão arterial do que o grupo controle (Figura 25). Esse resultado reforça a nossa hipótese de que há uma disfunção vascular nas fases iniciais do diabetes que contribui para a má perfusão da musculatura esquelética.

A explicação para a ocorrência de complicações decorrentes do diabetes envolve a glicação proteica decorrente do estado crônico de hiperglicemia, o qual promove a formação dos produtos finais de glicosilação avançada (AHMED, 2005; BROWNLEE, 2001; PEPPA; URIBARRI; VLASSARA, 2003). Todavia, outros fatores também estão presentes, como, por exemplo, a diminuição na população de receptores de membrana. Diversas doenças estão associadas ao processo de taquifilaxia, como, por exemplo, a sepse, onde ocorre a *downregulation* de receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos (DAL-SECCO et al., 2017). No diabetes foi também observada *downregulation* de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos (CARILLION et al., 2017). Nossos resultados sugerem hiperestimulação  $\beta_1$ -adrenérgica (Figura 24, Figura 25 e Figura 26) que pode ocasionar, em fases posteriores do diabetes, uma diminuição na população de receptores.

Em portadores de diabetes tipo 1, mesmo sob tratamento com insulina, há uma diminuição de sensibilidade ao estímulo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos (BERLIN et al., 1986). E em animais, diversos estudos apresentam prejuízos vasculares ocasionados pela hiperglicemia não tratada, prejuízos positivamente correlacionados com o tempo de exposição. Por exemplo, Atkins, Dowell e Love (1985), não observaram diferença alguma na estimulação com isoprenalina nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos após duas semanas da administração de STZ em ratos; ao passo que, com quatro semanas, já perceberam uma resposta diminuída e anormalidades na contratilidade cardíaca desses animais. Por sua vez, Heyliger et al. (1982), observaram, com oito semanas após a indução do diabetes, menor ativação de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos, com diminuição de densidade desses receptores, sem alterações na afinidade deles com seus ligantes. Esses dados corroboram nossos achados de que, nas ratas diabéticas, um agonista  $\beta$ -adrenérgico induz um menor efeito biológico e também nossa hipótese de que estes sejam eventos primários às anormalidades observadas em fases tardias do diabetes.

A vasodilatação observada com a utilização de isoprenalina ocorre devido à estimulação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentes nas células do músculo liso vascular (BRAWLEY; SHAW; MACDONALD, 2000; CONTI et al., 2013; ORIOWO, 1995). Entretanto, também temos esses receptores expressos nas células endoteliais, promovendo o relaxamento via ativação de PKA, aumento do influxo de cálcio e consequente ativação da via do óxido nítrico/cGMP (IRANAMI et al., 1996).

As células endoteliais são de fundamental importância para regular os processos de relaxamento através da liberação do óxido nítrico (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). E, sabe-se que a disfunção endotelial está presente nos distúrbios metabólicos, como por exemplo, no diabetes (JAMWAL; SHARMA, 2018). E essa disfunção endotelial também foi observada em nosso estudo, onde obtivemos uma menor resposta hipotensora induzida por acetilcolina nas ratas diabéticas do que em ratas controle, tanto na primeira semana como na quarta semana após a administração da STZ ou veículo (Figura 29 e Figura 30). Resultados semelhantes foram encontrados por Foy e Lucas (1976), corroborando nossos achados e interpretações. Nossos resultados também apontam para um maior comprometimento do sistema biológico com o passar do tempo, onde os prejuízos endoteliais parecem se tornar mais robustos na quarta semana. Esses resultados foram acompanhados por um menor efeito de diminuição da frequência cardíaca (Figura 31) e do fluxo sanguíneo renal (Figura 32). Contudo, não observamos alterações no fluxo sanguíneo da musculatura esquelética (Figura 33), o que pode sugerir uma preservação endotelial na vasculatura que irriga esta região.

Também demonstramos que, nas ratas diabéticas, além da disfunção endotelial presente, a via de sinalização do óxido nítrico ou a própria musculatura lisa dos vasos sanguíneos se apresenta comprometida na primeira e na quarta semana, demonstrada pela menor eficácia do doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, em induzir a queda na pressão arterial (Figura 34 e Figura 35). Estudos em vasos isolados provenientes de animais diabéticos não demonstraram diminuição do efeito vasorrelaxante para o nitroprussiato de sódio (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006; SOTNÍKOVÁ et al., 1999; XAVIER et al., 2003). Contudo, em humanos, há uma maior diminuição na capacidade vasodilatadora induzida por nitroprussiato de sódio em pacientes diabéticos que já apresentavam complicações vasculares decorrentes do próprio diabetes, do que naqueles que ainda não haviam desenvolvido complicações vasculares (VOUILLARMET et al., 2019). Dessa forma, nossos resultados sugerem que as alterações na musculatura lisa vascular decorrentes da hiperglicemia crônica já estão presentes nas ratas diabéticas.



A acetilcolina (Figura 29 e Figura 30) e o nitroprussiato de sódio (Figura 34 e Figura 35) diminuíram o fluxo sanguíneo renal nas ratas controle, enquanto que nas diabéticas chegaram a induzir aumento na quarta semana. Em relação ao fluxo sanguíneo muscular, não houve diferença no aumento induzido por acetilcolina e nitroprussiato de sódio entre os grupos em nenhuma das semanas (Figura 33 e Figura 38). Ao utilizarem microesferas radioativas para avaliar o fluxo sanguíneo e a resistência vascular de ratos diabéticos, Granstam e Granstam (2003), encontraram resultados divergentes do nosso ao reportarem que os efeitos do óxido nítrico nos tecidos de ratos com diabetes em fases iniciais (4 semanas após a indução) eram semelhantes aos observados nos animais controle. Nossos resultados apontam para a direção de uma disfunção endotelial até em fases mais precoces do diabetes (1 semana após a indução).

A diminuição na frequência cardíaca ocasionada pela administração de acetilcolina foi menor apenas nas ratas diabéticas da quarta semana, quando comparadas com as ratas controle (Figura 31). Resultado semelhante foi encontrado por Bandrivska et al. (2020), que demonstraram tal prejuízo já a partir da segunda semana. Esses autores ainda demonstraram que a diminuição da sensibilidade dos receptores colinérgicos à ação da acetilcolina ocorre com maior intensidade nas ratas do que nos ratos diabéticos. Dessa forma, nossos resultados podem tanto estar refletindo essa atenuação dos efeitos colinérgicos sobre a frequência cardíaca em decorrência do diabetes, como também podem ser frutos de um controle autonômico prejudicado.

Cabe ressaltar que essa comparação entre sexos realizada por Bandrivska et al. (2020), é bastante válida. Pois em outros estudos utilizando apenas machos, por exemplo o de Yu e McNeill (1992), os ratos embora apresentassem menor efeito hipotensor para a acetilcolina, não apresentavam diferença na variação da frequência cardíaca, após 6 semanas da indução do diabetes. O que, juntamente com os nossos resultados, fornece fortes indícios de que esses prejuízos ocorrem mais cedo nas ratas diabéticas.

As pequenas alterações da frequência cardíaca em resposta à administração de nitroprussiato de sódio não foram diferentes entre os grupos (Figura 36). Resultados idênticos obtiveram Yu e McNeill (1992), que também não encontraram diferença na variação da frequência cardíaca entre os grupos controle e diabéticos após a administração de nitroprussiato de sódio em ratos conscientes.

Na patogênese do diabetes ocorre o aumento das EROs, responsáveis por ocasionar estresse oxidativo. Dentre as EROs, ressalta-se o ânion superóxido que reage com o óxido nítrico dando origem ao peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). A formação de peroxinitrito é responsável por

diminuir a biodisponibilidade de óxido nítrico e conduzir a uma disfunção endotelial e mitocondrial (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011; JAMWAL; SHARMA, 2018; WIDLANSKY; HILL, 2018). E em nosso estudo conseguimos demonstrar, de forma sistêmica, a ocorrência da disfunção endotelial nas ratas diabéticas, observada tanto na primeira como na quarta semana após o tratamento com STZ.

---

### Perfusão de Perna Isolada

Inicialmente, para podermos testar nossa hipótese de que há uma disfunção vascular generalizada no diabetes que pode contribuir para uma má perfusão da musculatura esquelética, padronizamos um novo método para avaliar a reatividade do leito vascular da musculatura esquelética, conforme apresentado no Apêndice A.

Com o objetivo de avaliar de forma isolada a função dos vasos que irrigam os membros posteriores, adaptamos o método de perfusão do *quadrante traseiro*. Tal adaptação possibilitou um estudo mais eficaz da vascularização da musculatura esquelética. E, para isso, utilizamos o sistema de perfusão de órgãos isolados, disponível no laboratório, que permite a avaliação do leito renal e do leito mesentérico (BERNARDELLI et al., 2016; SANT'HELENA et al., 2015), e, em vez de realizar a canulação da artéria aorta e da veia cava, realizamos a canulação da artéria femoral comum direita, ou esquerda, seguida pelo isolamento de toda a perna correspondente.

A primeira descrição de um método para estudar o leito vascular da musculatura esquelética foi realizada por Ruderman, Houghton e Hems (1971). O objetivo desses autores era estudar o metabolismo muscular e, para isso, amostras da perfusão eram coletadas. O método foi denominado de perfusão do “quadrante traseiro” (*hindquarter*, em inglês), uma vez que todo o quadrante posterior dos animais era utilizado. Basicamente, o método consistia na canulação da aorta e da veia cava para permitir que a circulação fosse realizada de modo artificial no quadrante traseiro dos animais, uma vez que os principais ramos abdominais dos grandes vasos eram ligados, permitindo o fluxo apenas para essa região de interesse. Para a realização da circulação artificial, utilizava-se um aparato de perfusão modificado especialmente para o experimento que permitia a recirculação da perfusão.

Termos como *hindlimb* (membro traseiro), ou, ainda, menos comum, *hindlegs* (pernas traseiras) aparecem associados ao método e algumas vezes até são utilizados como sinônimos. Por exemplo, Emeis (1983), no título do seu artigo adota a expressão “*hindlegs*”, contudo na descrição dos métodos descreve a perfusão do quadrante traseiro utilizando o termo “*hindquarter*”. Já Hespel et al. (1995), e Huei et al. (2017), utilizam o termo “*hindlimb*” para caracterizar a perfusão somente de um dos membros do quadrante traseiro, sendo o fluxo do

membro contralateral interrompido, o que não ocorre com Kurth-Kraczek et al. (1999), que adotam o termo “*hindlimb*” para a perfusão do quadrante traseiro, isto é, perfusão dos dois membros posteriores.

A técnica de perfusão do quadrante posterior dos animais serviu para atender a diversas finalidades de estudos, tais como a avaliação de metabólitos (RUDERMAN; HOUGHTON; HEMS, 1971), a perfusão de drogas por um determinado tempo para posterior avaliação dos tecidos perfundidos (WEBSTER; VIGNA; PAQUETTE, 1986) e o estudo da isquemia de membros posteriores (MINISTRO et al., 2019).

Essa técnica também chegou a ser utilizada para mensurar as variações de pressão no leito vascular decorrentes do uso de ferramentas farmacológicas, tanto utilizando transdutores de pressão, conectados a um polígrafo (HILGERS et al., 1993), como por outros meios de registro desses dados (CALAMA et al., 2005). Além de ser usada para avaliar alterações no fluxo sanguíneo através de uma sonda de fluxo posicionada ao redor da artéria femoral ou mesmo utilizando ultrassom aprimorado para contraste (HUEI et al., 2017). As modificações que realizamos permitiram o desenvolvimento de um novo método eficaz para o estudo da função vascular da musculatura esquelética, que utiliza todo o leito dessa região. Em suma, com nossa padronização demonstramos a viabilidade das preparações de pernas isoladas perfundidas num sistema de perfusão de órgãos isolados.

As preparações permitiram tanto o estudo de agentes vasoconstritores e vasorelaxantes, como também estudos utilizando ferramentas farmacológicas para estudo de receptores e vias de sinalização, como antagonistas de receptores adrenérgicos e inibidores enzimáticos. Nessas preparações também foi possível realizar protocolos de depleção de cálcio e assim conseguir estudar a mobilização e captação de cálcio.

Desse modo, o método que padronizamos nos permitiu estudar de forma eficaz a reatividade da vasculatura que irriga a musculatura esquelética com algumas vantagens em relação aos outros métodos já descritos na literatura e acima mencionados. Entre eles:

a) anteriormente utilizavam-se o animal inteiro (RUDERMAN; HOUGHTON; HEMS, 1971), ou retiravam-se pequenas partes, como o cólon (WEBSTER; VIGNA; PAQUETTE, 1986), para manter a preparação viável. Nós, ao utilizarmos o sistema de perfusão de órgãos isolados, tornamos possível trabalhar somente com a parte de interesse e mantê-la viável por mais de 3 horas; e

b) antes o líquido de perfusão era totalmente reciclado (WEBSTER; VIGNA; PAQUETTE, 1986) e posteriormente passou a ser desprezado (LOYAGA-RENDON et al., 2005). No nosso método o líquido de perfusão era desprezado uma vez que perfundia o leito e

a utilização do sistema de perfusão viabilizou a coadministração de ferramentas farmacológicas.

Com isso, conseguimos realizar o feito inédito de apresentar aqui um método mais eficaz para estudar a função dos vasos que irrigam a musculatura esquelética de animais, o qual, nós denominamos de “Perfusão de Perna Isolada”.

### **Função vascular da musculatura esquelética no diabetes precoce**

Após a padronização do método de medida da pressão de perfusão da musculatura esquelética em pernas isoladas de *Rattus norvegicus*, investigamos a função vascular dessa região em ratas diabéticas após 4 semanas da administração de STZ e em suas respectivas ratas controle. Estudar a função desse leito é importante para compreendermos melhor como ele pode precipitar a progressão da condição de pré-diabetes à instauração do diabetes mellitus tipo 2, uma vez que uma má perfusão na microcirculação desse leito prejudica a entrega tanto de insulina quanto de glicose à musculatura esquelética (WASSERMAN; WANG; BROWN, 2018). Além disso, possibilita também a melhor compreensão de como o estado hiperglicêmico crônico pode contribuir para a ocorrência de comorbidades nos membros inferiores (HICKS; SELVIN, 2019).

Em nosso estudo não observamos diferenças na resposta ao agente vasoativo fenilefrina no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas e controle. Esses dados sugerem que não parece haver disfunção na vasoconstrição mediada por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Por outro lado, o aumento na pressão de perfusão induzido por adrenalina, (quando mensurada como área sob a curva), foi menor nas preparações de perna isolada provenientes de ratas diabéticas do que nas de ratas controle (Figura 40). Como a adrenalina ativa receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos, podemos sugerir que há uma disfunção na resposta à ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Estudos realizados utilizando vasos isolados de ratos tratados com STZ, sejam em vasos de condutância (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006; TANG et al., 2011; XAVIER et al., 2003; SHAMSALDEEN et al., 2019; SOTNÍKOVÁ et al., 1999) ou de resistência (AGRAWAL; MCNEILL, 1987; UNGVARI et al., 1999), demonstram hiperresponsividade aos agentes vasoconstritores fenilefrina e noradrenalina. Isso sugere que em nosso estudo encontramos ainda a função vascular do leito da musculatura esquelética preservada à ação da fenilefrina, porém uma disparidade para a adrenalina onde encontramos foi indícios de uma hiporresponsividade no leito vascular da musculatura esquelética. Por sua vez, Brody e Dixon (1964), utilizando outro modelo de indução de diabetes, com administração de aloxana, e estudando o quadrante traseiro isolado e perfundido desses animais, também demonstraram hiperresponsividade para noradrenalina e

adrenalina após 4 semanas do tratamento dos animais. Esse modelo de indução do diabetes induzido por aloxana difere do nosso em vários aspectos, entre eles por apresentar um aumento nos níveis de ácidos graxos (MANSFORD; OPIE, 1968), e esses ácidos graxos livres possuem importante papel no desenvolvimento de disfunção endotelial (GHOSH et al., 2017).

No entanto, Johansen, Tripovic e Brock (2013), observaram menor reatividade a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos na artéria do metatarso plantar (que supre de sangue a pele dos dígitos da pata traseira) de ratos diabéticos com 12 semanas. Baseados nesses dados e nos nossos, podemos sugerir que os leitos vasculares que irrigam a musculatura esquelética apresentam prejuízos na resposta a agonistas adrenérgicos que podem ser indicativos da neuropatia autonômica.

Dentro de um contexto de disfunção endotelial os processos inflamatórios estão presentes e atuando. Tanto em roedores como em humanos observa-se elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, a IL-6 (GHOSH et al., 2017). E estudos em vasos isolados demonstram que, pelo menos parcialmente, o aumento da resposta contrátil para fenilefrina em vasos de condutância de animais diabéticos é dependente da presença da IL-6 (TANG et al., 2011). Todavia, um estudo que comparou a utilização de aloxana e STZ para a indução do diabetes, não revelou nenhuma alteração na sensibilidade dos vasos à noradrenalina em ambos os grupos diabéticos quando comparados com seus respectivos controles (CHRISTLIEB, 1974).

Esses dados da literatura indicam que ainda não está totalmente elucidado quando os prejuízos vasculares iniciam, nem a ordem de ocorrência. Contudo, em nossas condições experimentais levantamos a hipótese de que embora haja comprometimento vascular em animais diabéticos em fase precoce, esse comprometimento deve aparecer no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas mais tardiamente. Essa menor resposta à adrenalina pode ser um evento que contribua para uma má perfusão tecidual da musculatura esquelética em fases tardias do diabetes, onde ocorre, por exemplo, a doença arterial periférica e as úlceras do pé diabético (BANDYK, 2018; PARVIZI; KIM, 2010; TZOULAKI; FOWKES, 2017).

Em suma, percebemos que pode haver diferença de sensibilidade nos diferentes tecidos que compõem o sistema cardiovascular frente a um mesmo estímulo, diferença esta que, de acordo a literatura, parece depender do agente diabetogênico utilizado, mas também de forma mais preponderante dos tempos aos quais os animais são submetidos à exposição

hiperglicêmica, conforme demonstrado na introdução, tempo este que permitirá a progressão da doença e o desenvolvimento e estabelecimento de suas complicações.

Quando avaliamos o efeito da isoprenalina na pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética, observamos que a isoprenalina diminuiu a pressão de perfusão de modo semelhante entre os grupos de ratas (Figura 42C). Todavia, durante a condução dos experimentos, era nítida a demora do retorno aos valores basais quando administradas as doses nas preparações provenientes do grupo diabético (Figura 42A e 42B). Esses achados, juntamente com os resultados da adrenalina podem indicar uma maior sensibilização dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos resultando numa contínua liberação de segundos mensageiros, ou ainda que o *recycling* desses receptores no grupo diabético ocorra de forma mais lenta do que no controle, prolongando a resposta. Essa última linha de raciocínio já foi discutida um pouco anteriormente, quando discorreremos sobre a internalização de receptores, agora discutiremos a primeira linha de raciocínio.

Safi et al. (2018), demonstram que, além da isoprenalina ser capaz de reduzir significativamente a fosforilação de resíduos de serina de proteínas envolvidas na transcrição de proteínas inflamatórias, ela também é capaz de reduzir a apoptose e a geração de EROs. Desse modo, nessa linha de raciocínio pode ser que a isoprenalina no leito vascular diminua a geração de EROs, de modo a retardar o retorno da pressão de perfusão aos valores basais.

Como já mencionado anteriormente, a isoprenalina é conhecida como um agonista adrenérgico não seletivo, ativando tanto receptores  $\beta_1$  como  $\beta_2$  adrenérgicos. Olbrich et al. (1999), demonstraram que a ativação parcial de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos é capaz de reverter o dano endotelial provocado pela hiperglicemia. Utilizando o celiprolol por via oral, um antagonista  $\beta_1$ -seletivo com atividade agonista de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, perceberam que o tratamento foi capaz de prevenir o prejuízo na vasodilatação evocada pela acetilcolina em artérias mesentéricas de animais diabéticos. Um possível efeito do antagonismo dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos foi descartado, uma vez que o tratamento com metoprolol não foi capaz de impedir os prejuízos na dilatação das artérias. Esses resultados apoiam a hipótese de que uma maior vasodilatação é benéfica nas fases iniciais do diabetes.

Ainda, os achados de que a isoprenalina induziu vasodilatação nas preparações de perna isolada corroboram os nossos achados de que a isoprenalina sistêmica aumentou o fluxo sanguíneo no músculo esquelético, medido por Doppler (Figura 28). Desta maneira, e com base na literatura, podemos sugerir que a ativação de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos por isoprenalina favorece um maior aporte sanguíneo à musculatura esquelética nas fases iniciais do diabetes no intuito de manter a homeostase.

Em seus experimentos, Olbrich et al. (1999), ainda demonstraram que o celiprolol é capaz de aumentar a liberação de óxido nítrico induzida por ATP em células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose. Com base nesses resultados, além da possível redução das EROs anteriormente sugerida, o efeito vasorrelaxante mais duradouro observado no grupo diabéticas em nossos experimentos também pode ser devido a essa ação nas células endoteliais. Contudo, também pode ser que o cálcio e seus mecanismos de mobilização possam estar envolvidos, uma vez que a remoção desse íon do citosol é necessária para a vasodilatação induzida pela isoprenalina (YAMANAKA et al., 2003).

Observada pela ação da acetilcolina, a função endotelial no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas demonstrou-se preservada (Figura 41), embora de modo sistêmico já esteja presente a disfunção endotelial (Figura 29). Na gênese das complicações vasculares, percebe-se o importante envolvimento da disfunção endotelial induzida pelo diabetes (SHI; VANHOUTTE, 2017), que está constantemente presente em pacientes acometidos por essa patologia (MATHER; VERMA; ANDERSON, 2001; MCVEIGH et al., 1992; WARING et al., 2006). Em ratos diabéticos, também há evidências de disfunção vascular em vasos de condutância (KAMATA; MIYATA; KASUYA, 1989; KOBAYASHI; KAMATA, 2002; MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006; ÖZYAZGAN et al., 2000; SOTNÍKOVÁ et al., 1999), em vasos de resistência (UNGVARI et al., 1999) e no leito vascular coronário (KAMATA et al., 2008). Isso sugere que o prejuízo endotelial no leito vascular da musculatura esquelética ocorre mais tardiamente ao prejuízo dos demais vasos.

Também o relaxamento vascular de forma independente do endotélio no leito vascular da musculatura esquelética das ratas diabéticas não se apresentou alterado (Figura 41). De modo semelhante, em vasos isolados, a literatura mostra dados de que processos fisiológicos que culminam no relaxamento da musculatura lisa vascular independente da função endotelial estão preservados (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2006; SOTNÍKOVÁ et al., 1999; UNGVARI et al., 1999; XAVIER et al., 2003), o que também é observado em humanos portadores de diabetes tipo 1 (WARING et al., 2006), mas nem sempre nos portadores de diabetes tipo 2 (MCVEIGH et al., 1992). O que corrobora com nossos achados nesse leito vascular.

Se por um lado, a contração do leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas induzida por adrenalina, mas não por fenilefrina, se mostrou comprometida (Figura 40), o fluxo sanguíneo no músculo esquelético foi menor quando ambos os agonistas foram administrados sistemicamente (Figura 23 e Figura 18, respectivamente). Esses resultados sugerem uma menor disponibilidade de sangue para a musculatura esquelética de ratas

diabéticas, quando comparadas com o grupo controle. E sabemos que, muitas vezes, a alteração de alguns mecanismos existentes precedem a disfunção vascular. Por exemplo, muitas vezes o antecessor é a movimentação de cálcio, conhecida como “*calcium handling*” (SUTANTO et al., 2020), outras a disfunção endotelial (VANHOUTTE et al., 2017), ou mesmo problemas em receptores (FAULKNER; CHANTEMÈLE, 2019).

Em nosso estudo, quando o cálcio extracelular foi removido, observamos um aumento na pressão de perfusão apenas no grupo das ratas controle. Esse protocolo experimental foi estabelecido no final dos anos 70 do século passado por Karaki e colaboradores. De acordo com esses autores, esse aumento é decorrente da liberação de cálcio de estoques intracelulares (KARAKI; KUBOTA; URAKAWA, 1979). Desta maneira, podemos sugerir que a mobilização de cálcio intracelular no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas está prejudicada (Figura 43).

Também observamos resposta reduzida ao cálcio extracelular no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas quando estimulado previamente com fenilefrina (Figura 45). Ainda de acordo com Karaki e Weiss (1988), esses resultados sugerem que o influxo de cálcio extracelular induzido por ativação de receptores, ou ainda, que os mecanismos ativados pelo cálcio proveniente dessa fonte, estão prejudicados.

Em arteríolas de primeira ordem isoladas do músculo grácil de ratos diabéticos por 12 semanas, Ungvari et al. (1999), demonstraram haver uma hiperresponsividade ao aumento da concentração de cálcio extracelular e que o nível de influxo de cálcio em repouso é maior nas preparações provenientes de animais diabéticos, o que pode ser explicado pela hiperpermeabilidade que a membrana apresenta a esse cátion. Outro achado desses autores é que o diabetes provoca nesses vasos um aumento da constrição miogênica induzida por pressão, que parece ser independente do comprometimento endotelial e atrelado ao aumento da atividade dos canais de cálcio dependentes voltagem e/ou da proteína cinase C, ambos presentes na musculatura lisa arteriolar. Em suma, esse último achado pode significar aumento do tônus arteriolar e conseqüente redução da perfusão microvascular da musculatura esquelética *in vivo*. Esses achados juntamente com os nossos sugerem que a diminuição na mobilização e sensibilização ao cálcio observadas nas fases iniciais (4 semanas) contribuem para um aumento nesses processos em fases mais avançadas do diabetes (12 semanas).

Em artéria mesentérica superior de ratos com diabetes após 12 semanas da administração de STZ, o estudo conduzido por Agrawal e McNeill (1987), demonstrou que a resposta contrátil de todos os agentes vasoativos testados foram maiores do que as respostas observadas nos grupos controle. Entre esses agentes estavam a noradrenalina e a fenilefrina,



além do cloreto de potássio e do ativador dos canais de cálcio do tipo L, o BAY K 8644, o que sugere uma participação do cálcio na ocorrência desses eventos observados. Dados que reforçam a ideia que em fases mais avançadas do diabetes há uma maior sensibilidade, ou até mesmo um melhor uso, do cálcio disponível.

Ainda, o estudo do leito vascular coronário de ratos diabéticos, 9 meses após a indução, realizado por Kamata et al. (2008), demonstrou a diminuição das respostas contráteis para altas concentrações de potássio, para acetilcolina e para a endotelina 1 (ET-1). Além disso, esses autores também observaram aumento da resposta contrátil induzida por BAY K 8644, que ainda foi capaz de potencializar a vasoconstrição induzida pela acetilcolina nas preparações provenientes do grupo diabético. Esses dados sugerem que a movimentação do cálcio está alterada e ainda influencia os demais processos no diabetes.

A fenilefrina, em meio zero cálcio, induziu um maior aumento na pressão de perfusão de pernas isoladas das ratas diabéticas do que nas das ratas controle (Figura 44). De acordo com Karaki, Kubota e Urakawa (1979), esses dados sugerem que a mobilização de cálcio de estoques intracelulares ativados por receptor é maior no diabetes. Assim, este e os demais resultados reforçam que há uma desregulação na homeostasia do cálcio intracelular no diabetes.

Lee, Sun e Ko (2010), demonstraram que o influxo de cálcio induzido por cloreto de potássio e por fenilefrina em mioblastos cardíacos submetidos a altas concentrações de glicose está significativamente reduzido (quando incubado com glicose a 15 mM), ou mesmo quase nulos (quando incubado com glicose a 30 mM). Esses autores observaram que o pré-tratamento com um antioxidante, o tiron, foi capaz de prevenir a redução ocasionada pela glicose em ambas as concentrações.

Em nossos resultados, observamos que a vasoconstrição induzida por fenilefrina nas pernas isoladas medida como aumento de pressão de perfusão ou como área sob a curva não foi alterada em presença do antioxidante apocinina. Por outro lado, em presença de apocinina, os efeitos da adrenalina na vasoconstrição das pernas isoladas foram semelhantes entre os grupos (Figura 46).

Observamos que as EROs contribuem para o efeito vasoconstritor da adrenalina e da fenilefrina nas preparações de perna isolada (Figura 40 e Figura 46). E que a utilização do antioxidante apocinina normalizou a resposta para a adrenalina apenas no leito vascular da musculatura esquelética de ratas diabéticas (Figura 40D e Figura 46D). Esses resultados, além de demonstrarem a importância da contribuição das EROs para o efeito vasoconstritor de agonistas adrenérgicos, eles sugerem que a produção desses compostos químicos está

prejudicada no diabetes. Estudos para esclarecer melhor a participação das EROs ainda serão necessários.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 Sumário de resultados

1) Comparando com as ratas controle, observamos em ratas diabéticas:

a) que a adrenalina induziu menor aumento da pressão arterial, maior aumento na frequência cardíaca, menor redução do fluxo sanguíneo renal e menor aumento do fluxo sanguíneo no músculo esquelético na primeira semana; enquanto que na quarta semana, somente induziu menor elevação na pressão arterial;

b) que a fenilefrina induziu menor elevação da pressão arterial na primeira e na quarta semana; e, somente na quarta semana, induziu menor diminuição da frequência cardíaca, menor diminuição no fluxo sanguíneo renal e menor aumento do fluxo sanguíneo no músculo esquelético;

c) que a isoprenalina induziu menor diminuição da pressão arterial, menor aumento da frequência cardíaca, menor redução do fluxo sanguíneo renal e menor aumento do fluxo sanguíneo no músculo esquelético na primeira semana; enquanto que na quarta semana induziu somente menor diminuição na pressão arterial e maior aumento do fluxo sanguíneo no músculo esquelético;

d) que a acetilcolina induziu menor diminuição da pressão arterial na primeira e na quarta semana; e, somente na quarta semana, induziu menor diminuição da frequência cardíaca e menor diminuição no fluxo sanguíneo renal. Não foram encontradas diferenças para as alterações evocadas pela acetilcolina no fluxo sanguíneo do músculo esquelético em nenhuma das duas semanas avaliadas;

e) que o nitroprussiato de sódio, induziu menor diminuição da pressão arterial na primeira e na quarta semana; e, somente na quarta semana, induziu menor diminuição no fluxo sanguíneo renal. Também não foram encontradas diferenças para as alterações evocadas pelo nitroprussiato de sódio no fluxo sanguíneo do músculo esquelético em nenhuma das duas semanas avaliadas;

2) Comparando com o grupo controle, observamos nas preparações de pernas isoladas perfundidas de ratas diabéticas, após 4 semanas da administração de STZ:

a) que a resposta induzida por fenilefrina não foi diferente, nem quando na presença da apocinina, e que a adrenalina induziu menor aumento na pressão de perfusão que foi normalizado quando na presença da apocinina;

- b) que as respostas induzidas pelos agentes vasodilatadores acetilcolina e nitroprussiato de sódio não foram diferentes;
- c) que a queda na pressão de perfusão induzida por isoprenalina retornou mais lentamente aos valores basais;
- d) que a pressão de perfusão não aumentou quando o íon cálcio foi retirado do líquido de perfusão;
- e) que a pressão de perfusão apresenta maior aumento em resposta à perfusão com fenilefrina em meio sem cálcio;
- f) que a pressão de perfusão apresenta menor resposta de elevação quando realizada curva dose resposta para o íon cálcio em preparações estimuladas com fenilefrina em meio sem cálcio.

## 6.2 Conclusão

Assim com base em nossos resultados sugerimos que na fase precoce do diabetes, embora a pressão de perfusão das pernas isoladas não esteja comprometida, alguns processos isolados como a mobilização de cálcio intracelular e extracelular além de alterações na ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos já aparecem. Dessa forma, uma disfunção vascular no diabetes precoce parece contribuir para uma má perfusão da musculatura esquelética em ratas mais tardiamente.

O ineditismo deste trabalho consistiu em padronizar um novo método para o estudo do leito vascular da musculatura esquelética. Utilizando esse método, conseguimos correlacionar a disfunção vascular presente no diabetes precoce com as alterações da função vascular da musculatura esquelética, as quais podem contribuir para a ocorrência de uma má perfusão periférica no diabetes. Os resultados apontam para alterações vasculares periféricas antecessoras de um dano endotelial característico do diabetes. O significado clínico desses achados é a melhor compreensão dos processos presentes no diabetes precoce que podem estar envolvidos com os danos vasculares periféricos decorrentes de um diabetes descompensado. Estudos focados na melhor compreensão da influência do diabetes precoce sobre os receptores  $\beta$ -adrenérgicos e a movimentação de íons cálcio devem ser realizados para melhor compreensão dos processos envolvidos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATIF, A. A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in the mammalian iris smooth muscle: Historical perspectives and current status. **Life Science**, v. 45, n. 9, p. 757-786, 1989. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90170-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90170-7).
- ADA – American Diabetes Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. **Diabetes Care**, v. 41, n. 5, p. 917-928, May 2018. <https://doi.org/10.2337/dci18-0007>.
- ADA – American Diabetes Association. Standards of Medical Care in diabetes – 2020. **Diabetes Care**, v. 43, Supl. 1, p. S1-S212, Jan. 2020.
- ADEBOYE, A. et al. Syntheses and adrenergic activities of ring-fluorinated epinephrines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1972-1977, Oct. 1988. <https://doi.org/10.1021/jm00118a019>.
- ADVANCE – The ADVANCE Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 24, p. 2560-2572, June 2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802987>.
- AGRAWAL, D. K.; MCNEILL, J. H. Vascular responses to agonists in rat mesenteric artery from diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1484-1490, July 1987. <https://doi.org/10.1139/y87-232>.
- AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, n. 1, p. 3-21, Jan. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.09.004>.
- AKAMINE, T. et al. Accumulation of sorbitol in the sciatic nerve modulates circadian properties of diabetes-induced neuropathic pain hypersensitivity in a diabetic mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 1, p. 181-187, Sept. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.209>.
- AL-AHMAD, A. J. Comparative study of expression and activity of glucose transporters between stem cell-derived brain microvascular endothelial cells and hCMEC/D3 cells. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 313, n. 4, p. C421-C429, Oct. 2017. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00116.2017>.
- AL-AWAR, A. et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1-12, Aug. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>.
- ALTAN, N. et al. Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase activity in alloxan-induced diabetic rat hepatocytes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 22, n. 2-3, p. 95-98, Jan. 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0168-8227(94)90041-8).
- ANSARI, M.; GOPALAKRISHNAN, S.; KURIAN, G. A. Streptozotocin-induced type II diabetic rat administered with nonobesogenic high-fat diet is highly susceptible to myocardial ischemia–reperfusion injury: An insight into the function of mitochondria. **Journal of**

**Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 4104-4114, Apr. 2019.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.27217>.

ANTHONY, M. The evolution of diabetes knowledge in relation to the theory of scientific revolutions. **The Diabetes Educator**, v. 28, n. 5, p. 688-696, Sept./Oct. 2002.  
<https://doi.org/10.1177/014572170202800506>.

ANTON, E. L. et al. Bradykinin increases BP in endotoxemic rat: functional and biochemical evidence of angiotensin II AT 1 /bradykinin B 2 receptor heterodimerization. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 14, p. 2608-2626, July 2019. <https://doi.org/10.1111/bph.14685>.

ASMELASH, D. et al. Undiagnosed diabetes mellitus and associated factors among psychiatric patients receiving antipsychotic drugs at the University of Gondar Hospital, northwest Ethiopia. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, v. 28, n. 1, p. 3-10, Jan. 2018.  
<https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i1.2>.

ASO, Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 2957-2966, May 2007. <https://doi.org/10.2741/2285>.

ATKINS, F. L.; DOWELL, R. T.; LOVE, S.  $\beta$ -Adrenergic receptors, adenylate cyclase activity, and cardiac dysfunction in the diabetic rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 66-70, Jan./Feb. 1985. <https://doi.org/10.1097/00005344-198501000-00011>.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69-82, Jan. 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7).

AUGUSTIN, R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. **IUBMB Life**, v. 62, n. 5, p. 315-333, May 2010.  
<https://doi.org/10.1002/iub.315>.

BAIG, M. A.; PANCHAL, S. S. Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Neonatal Rats: An Insight into its Applications to Induce Diabetic Complications. **Current Diabetes Reviews**, v. 16, n. 1, p. 26-39, 2020. <https://doi.org/10.2174/1573399815666190411115829>.

BANDRIVSKA, O. O. et al. Heart reaction of male and female with streptozotocin induced diabetes on cholinergic impacts. **Wiadomości Lekarskie**, v. 73, n. 2, p. 224-228, 2020.  
<https://doi.org/10.36740/WLek202002103>.

BANDYK, D. F. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 31, n. 2-4, p. 43-48, June/Dec. 2018.  
<https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2019.02.001>.

BANTING, F. G. et al. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. **The Canadian Medical Association Journal**, v. 12, n. 3, p. 141-146, Mar. 1922.

BANTING, F. G. et al. The effect produced on diabetes by extracts of pancreas. **Transactions of the Association of American Physicians**, p. 337-347, 1922.

BARGIOTA, A. et al. Sexual dysfunction in diabetic women. **Hormones International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 196-206, July/Sept. 2011. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1309>.

BEAGLEY, J. et al. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2013 for the IDF Diabetes Atlas. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 150-160, Feb. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.001>.

BECKMAN, J. A. et al. Inhibition of Protein Kinase C $\beta$  Prevents Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation Caused by Hyperglycemia in Humans. **Circulation Research**, v. 90, n. 1, p. 107-111, Jan. 2002. <https://doi.org/10.1161/hh0102.102359>.

BELLAVERE, F. et al. Power Spectral Analysis of Heart-Rate Variations Improves Assessment of Diabetic Cardiac Autonomic Neuropathy. **Diabetes**, v. 41, n. 5, p. 633-640, May 1992. <https://doi.org/10.2337/diab.41.5.633>.

BEMBDE, A. S. A Study of Plasma Fibrinogen Level in Type-2 Diabetes Mellitus and its Relation to Glycemic Control. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 28, n. 2, p. 105-108, Apr./June 2012. <https://doi.org/10.1007/s12288-011-0116-9>.

BENNETT, R. A.; PEGG, A. E. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. **Cancer Research**, v. 41, n. 7, p. 2786-2790, July 1981.

BENSELLAM, M; JONAS, J. C.; LAYBUTT, D. R. Mechanisms of  $\beta$ -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. **Journal of Endocrinology**, v. 236, n. 2, p. R109-R143, Feb. 2018. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0516>.

BERLIN, I. et al. Decreased  $\beta$ -Adrenergic Sensitivity in Insulin-Dependent Diabetic Subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 63, n. 1, p. 262-265, July 1986. <https://doi.org/10.1210/jcem-63-1-262>.

BERNARD, C. De l'origine du sucre dans l'économie animale. **Archives Générales de Médecine**, Paris, t. 18, n. 4, p. 303-319, 1848.

BERNARD, C. **Introduction à l'Étude de la Médecine Expérimentale**. Paris: J. B. Baillière, 1865. 316 p.

BERNARD, C. Sur le mécanisme de la formation du sucre dans le foie. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, Paris, t. 41, n. 2, p. 461-469, juil./déc. 1855.

BERNARD, Claude. Sur le mécanisme physiologique de la formation du sucre dans le foie (Suite.). **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, Paris, t. 44, n. 1, p. 578-586, janv./juin 1857.

BERNTSON, G. G. et al. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. **Psychophysiology**, v. 34, n. 6, p. 623-648, Nov. 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1997.tb02140.x>.

- BERTERO, E.; MAACK, C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. **Circulation Research**, v. 122, n. 10, p. 1460-1478, May 2018. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.310082>.
- BIERHAUS, A. et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, p. 876-886, Nov. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0688-7>.
- BIR, S. C. et al. New Therapeutic Approach for Impaired Arteriogenesis in Diabetic Mouse Hindlimb Ischemia. **Circulation Journal**, v. 72, n. 4, p. 633-640, Apr. 2008. <https://doi.org/10.1253/circj.72.633>.
- BIZZARRI, M. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inositol(s) in health and disease. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 12, n. 10, p. 1181-1196, Oct. 2016. <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1206887>.
- BOCK, J. M. et al. Greater  $\alpha$ 1-adrenergic-mediated vasoconstriction in contracting skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, p. 319, n. 4, p. H797-H807, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00532.2020>.
- BOLTER, C. P.; LEDSOME, J. R. Inotropic and chronotropic responses of the in vivo denervated dog myocardium to dobutamine. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 618-621, Aug. 1976. <https://doi.org/10.1139/y76-085>.
- BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of Streptozotocin. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 512, n. 2-3, p. 121-134, Dec. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00044-3).
- BOUCHARDAT, A. **De la glycosurie ou diabète sucré: son traitement hygiénique**. Paris: Librairie Germer Baillière. 1875. 336 p.
- BOULTON, A. J. M. The 2017 Banting Memorial Lecture The diabetic lower limb - a forty year journey: from clinical observation to clinical science. **Diabetic Medicine**, v. 36, n. 12, p. 1539-1549, Dec. 2019. <https://doi.org/10.1111/dme.13901>.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Cadernos de Atenção Básica n. 36 - Diabetes mellitus: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 160 p.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Sistema de Vigilância em Saúde, Coordenação de Informações e Análises Epidemiológicas, DATASUS, Acesso à Informação, TABNET, Estatísticas Vitais, **Mortalidade – 1996 a 2018, pela CID-10**. 2020. Disponível em: <[www.datasus.saude.gov.br](http://www.datasus.saude.gov.br)>. Acesso em 15 ago. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME 2020**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 217 p.



BRAWLEY, L.; SHAW, A. M.; MACDONALD, A.  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- and atypical  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 4, p. 637-644, Feb. 2000. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703091>.

BRISTOW, M. R.  $\beta$ -Adrenergic Receptor Blockade in Chronic Heart Failure. **Circulation**, v. 101, n. 5, p. 558-569, Feb. 2000. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.5.558>.

BRODY, M. J.; DIXON, R. L. Vascular Reactivity in Experimental Diabetes Mellitus. **Circulation Research**, v. 14, n. 6, p. 494-501, 1964. <https://doi.org/10.1161/01.res.14.6.494>.

BROH-KAHN, R. H.; MIRSKY, I. A. Hexokinase Activity and Diabetes Mellitus. **Science**, v. 106, n. 2746, p. 148-149, Aug. 1947. <https://doi.org/10.1126/science.106.2746.148>.

BROWNE, D. et al. Endothelial dysfunction and pre-symptomatic atherosclerosis in type 1 diabetes — pathogenesis and identification. **The British Journal of Diabetes & Vascular Disease**, v. 3, n. 1, p. 27-34, Jan. 2003. <https://doi.org/10.1177/14746514030030010401>.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-152, July 2004. <https://doi.org/10.1172/jci22422>.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, Dec. 2001. <https://doi.org/10.1038/414813a>.

BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, June 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>.

BRUNNER, J. C. **Experimenta nova circa pancreas**: accedit diatriba de lympha & genuino pancreatis usu. v. 1, H. Westenium: Amstelædami, 1683. 168 p.

BULL, F. C.; BAUMAN, A. E. Physical Inactivity: The “Cinderella” Risk Factor for Noncommunicable Disease Prevention. **Journal of Health Communication**, v. 16, Supl. 2, p. 13-26, Sept. 2011. <https://doi.org/10.1080/10810730.2011.601226>.

BURG, M. B.; KADOR, P. F. Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 3, p. 635-640, Mar. 1988. <https://doi.org/10.1172/jci113366>.

BUTCHER, J. T. et al. Blunted temporal activity of microvascular perfusion heterogeneity in metabolic syndrome: a new attractor for peripheral vascular disease? **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 4, p. H547-H558, Feb. 2013. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00805.2012>.

CALLAGHAN, B. C. et al. Diabetic neuropathy: what does the future hold? **Diabetologia**, v. 63, n. 5, p. 891-897, May 2020. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05085-9>.

CARILLION, A. et al. Atorvastatin reduces  $\beta$ -Adrenergic dysfunction in rats with diabetic cardiomyopathy. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. 1-20, July 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180103>.

- CARVALHO, R. C. et al. Association between intra-hospital uncontrolled glycemia and health outcomes in patients with diabetes: A systematic review of observational studies. **Current Diabetes Reviews**, v. 17, n. 3, p. 304-316, 2021. <https://doi.org/10.2174/1573399816666200130093523>.
- CAWLEY, T. A Singular Case of Diabetes, Consisting Entirely in the Quality of the Urine; with an Inquiry into the Different Theories of That Disease. **The London Medical Journal**, v. 9, n. 3, p. 286-308, July 1788.
- CERNES, R.; ZIMLICHMAN, R.; SHARGORODSKY, M. Arterial Elasticity in Cardiovascular Disease: Focus on Hypertension, Metabolic Syndrome and Diabetes. **Advances in Cardiology**, v. 45, p. 65-81, Jan. 2008. <https://doi.org/10.1159/000115188>.
- CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239-2251, June 2017. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30058-2).
- CHEN, G. T. et al. Syntheses of 2,5- and 2,6-difluoronorepinephrine, 2,5-difluoroepinephrine, and 2,6-difluorophenylephrine: effect of disubstitution with fluorine on adrenergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 24, p. 3947-3955, 1993. <https://doi.org/10.1021/jm00076a024>.
- CHEUNG, N.; MITCHELL, P.; WONG, T. Y. Diabetic retinopathy. **The Lancet**, v. 376, n. 9735, p. 124-136, July 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62124-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3).
- CHEVREUL, M. E. Sur le sucre de diabètes. *In: Annales de Chemie*, v. 95, Paris, 1815. p. 319-320.
- CHRISTENSEN, A. A.; GANNON, M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 19, n. 1, p. 1-8, Aug. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1196-4>.
- CHRISTENSEN, K. L.; MULVANY, M. J. Location of Resistance Arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 38, n. 1, p. 1-12, Jan./Feb. 2001. <https://doi.org/10.1159/000051024>.
- CHRISTLIEB, A. R. Renin, Angiotensin, and Norepinephrine in Alloxan Diabetes. **Diabetes**, v. 23, n. 12, p. 962-970, Dec. 1974. <https://doi.org/10.2337/diab.23.12.962>.
- CONTI, V. et al. Adrenoreceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 321, p. 1-11, Nov. 2013. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00321>.
- COPPS, K. D.; WHITE, M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2565-2582, Oct. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>.
- CORCORAN, H. A. et al. Laser Doppler Imaging of Reactive Hyperemia Exposes Blood Flow Deficits in a Rat Model of Experimental Limb Ischemia. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 53, n. 6, p. 446-451, June 2009. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181a6aa62>.

CREVEL, R. V.; VIJVER, S. V. D.; MOORE, D. A. J. The global diabetes epidemic: what does it mean for infectious diseases in tropical countries? **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 5, n. 6, p. 457-468, June 2017. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30081-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30081-X).

DAL-SECCO, D. et al. Cardiac hyporesponsiveness in severe sepsis is associated with nitric oxide-dependent activation of G protein receptor kinase. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 1, p. H149-H163, July 2017. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00052.2016>.

DAS, A. K.; SHAH, S. History of diabetes: from ants to analogs. **Journal of the Association of Physicians of India**, Mumbai, v. 59, p. 6-7, Apr. 2011. Supl. 4.

DAVEL, A. P. C. et al. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 5, p. 629-639, July 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706749>.

DCCT RESEARCH GROUP – The Diabetes Control and Complications Trial. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 14, p. 977-986, Sept. 1993. <https://doi.org/10.1056/nejm199309303291401>.

DCCT RESEARCH GROUP – The Diabetes Control and Complications Trial. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. **The Journal of Pediatrics**, v. 125, n. 2, p. 177-188, Aug. 1994. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(94\)70190-3](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(94)70190-3).

DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 391, n. 10138, p. 2449-2462, June 2018. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31320-5).

DIMITRIADIS, G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, Supl. 1, p. S52–S59, Aug. 2011. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70014-6).

DOBSON, M. Experiments and observations on the urine in diabetes. In: A SOCIETY OF PHYSICIANS IN LONDON (Ed.). **Medical Observations and Inquiries**, v. 5., T. Cadell: London, p. 298-316, 1776. 429 p.

DONNELLY, R. et al. ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes. **The BMJ**, v. 320, n. 7241, p. 1062-1066, Apr. 2000. <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7241.1062>.

DU, X. et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 22, p. 12222-12226, Oct. 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.12222>.

DU, X. et al. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 4, p. 1071-1080, Apr. 2006. <https://doi.org/10.1172/JCI23354>.

DUNN, J. S.; MCLETCHIE, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **The Lancet**, v. 242, n. 6265, p. 384-387, Sept. 1943. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)87397-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)87397-3).

EBBELL, B. **The papyrus Ebers: The Greatest Egyptian Medical Document**. Copenhagen, Levin & Munksgaard: Denmark, 1937. 137 p.

EDMONDS, M. E.; ROBERTS, V. C.; WATKINS, P. J. Blood flow in the diabetic neuropathic foot. **Diabetologia**, v. 22, n. 1, p. 9-15, Jan. 1982. <https://doi.org/10.1007/bf00253862>.

EGAN, B. M.; GREENE, E. L.; GOODFRIEND, T. L. Nonesterified fatty acids in blood pressure control and cardiovascular complications. *Current Hypertension Reports*, v. 3, n. 2, p. 107-116, Apr. 2001. <https://doi.org/10.1007/s11906-001-0021-y>.

EKNOYAN, G. A History of Diabetes Insipidus: Paving the Road to Internal Water Balance. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 56, n. 6, p. 1175-1183, Dec. 2010. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.08.002>.

EKNOYAN, G.; NAGY, J. A History of Diabetes Mellitus or How a Disease of the Kidneys Evolved Into a Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12, n. 2, p. 223-229, Apr. 2005. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.01.002>.

ESLER, M.; KAYE, D. Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 35, n. 7, Supl. 4, p. S1-S7, 2000. <https://doi.org/10.1097/00005344-200000004-00001>.

EWING, D. J. Cardiovascular reflexes and autonomic neuropathy. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 55, n. 4, p. 321-327, Oct. 1978. <https://doi.org/10.1042/cs0550321>.

EWING, D. J. et al. The Value of Cardiovascular Autonomic Function Tests: 10 Years Experience in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 8, n. 5, p. 491-498, Sept. 1985. <https://doi.org/10.2337/diacare.8.5.491>.

EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; CLARKE, B. F. Mortality in diabetic autonomic neuropathy. **The Lancet**, v. 307, n. 7960, p. 601-603, Mar. 1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)90413-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)90413-X).

FARESE, R. V.; LEE, M. C.; SAJAN, M. P. Atypical PKC: a target for treating insulin-resistant disorders of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 18, n. 10, p. 1163-1175, Oct. 2014. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.944897>.

FAULKNER, J. L.; CHANTEMÈLE, E. J. B. Mineralocorticoid Receptor and Endothelial Dysfunction in Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 21, p. 1-5, Sept. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-0981-4>.

FISH, R. D. et al. Phorbol ester increases the dihydropyridine-sensitive calcium conductance in a vascular smooth muscle cell line. **Circulation Research**, v. 62, n. 5, p. 1049-1054, May 1988. <https://doi.org/10.1161/01.RES.62.5.1049>.

FLEMMING, B. et al. Oxygen and renal hemodynamics in the conscious rat. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 18-24, Jan. 2000. <https://doi.org/10.1681/ASN.V11118>.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>.

FOSKETT, J. K. et al. Inositol trisphosphate receptor  $Ca^{2+}$  release channels. **Physiological reviews**, v. 87, n. 2, p. 593-658, Apr. 2007. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2006>.

FOY, J. M.; LUCAS, P. D. Effect of experimental diabetes, food deprivation and genetic obesity on the sensitivity of pithed rats to autonomic agents. **British Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 229-234, June 1976. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1976.tb07472.x>.

FRANSEN, P. et al. Dissecting out the complex  $Ca^{2+}$ -mediated phenylephrine-induced contractions of mouse aortic segments. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1-17, Mar. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121634>.

FRIER, B. M. Hypoglycaemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 711-722, Dec. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.170>.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, Sept. 2011. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, Nov. 1980. <https://doi.org/10.1038/288373a0>

GABBAY, K. H. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston**, v. 288, n. 16, p. 831-836, Apr. 1973. <https://doi.org/10.1056/nejm197304192881609>.

GÆDE, P. et al. Multifactorial Intervention and Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 5, p. 383-393, Jan. 2003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021778>.

GALANTE, P. et al. Insulin-induced translocation of GLUT 4 in skeletal muscle of insulin-resistant Zucker rats. **Diabetologia**, v. 37, n. 1, p. 3-9, Jan. 1994. <https://doi.org/10.1007/BF00428770>.

GALICIA-GARCIA, U. et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1-34, Aug. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, v. 93, n. 1, p. 105-113, July 2004. <https://doi.org/10.1093/bja/ae163>.

GEBREMEDHIN, D. et al. Altered Responsiveness of Diabetic Dog Renal Arteries to Acetylcholine and Phenylephrine: Role of Endothelium. **Pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 177-184, 1989. <https://doi.org/10.1159/000138535>.

GHOSH, A. et al. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 1-15, July 2017. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0357-5>.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, Oct. 2010. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.

GLEASON, M. M.; FLAIM, S. F. Phorbol ester contracts rabbit thoracic aorta by increasing intracellular calcium and by activating calcium influx. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 138, n. 3, p. 1362-1369, Aug. 1986. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80433-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80433-8).

GONG, Q. et al. Morbidity and mortality after lifestyle intervention for people with impaired glucose tolerance: 30-year results of the Da Qing Diabetes Prevention Outcome Study. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 7, n. 6, p. 452-461, June 2019. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30093-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30093-2).

GRANSTAM, E.; GRANSTAM, S. O. Involvement of nitric oxide in the regulation of regional hemodynamics in streptozotocin-diabetic rats. **Physiological Research**, v. 52, n. 2, p. 159-169, 2003.

GREENE, D. A. et al. Sorbitol, Phosphoinositides, and Sodium-Potassium-ATPase in the Pathogenesis of Diabetic Complications. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital**, Boston, v. 316, n. 10, p. 599-606, Mar. 1987. <https://doi.org/10.1056/nejm198703053161007>.

GREWAL, A. S. et al. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 120-162, 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150909143737>.

GUYTON, A. C. The relationship of cardiac output and arterial pressure control. **Circulation**, v. 64, n. 6, p. 1079-1088, Dec. 1981. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.64.6.1079>.

HADAEGH, F. et al. High prevalence of undiagnosed diabetes and abnormal glucose tolerance in the Iranian urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. **BMC Public Health**, v. 8, n. 1, p. 1-7, May 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-8-176>.

HÆDERSDAL, S. et al. The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 2, p. 217-239, Feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.12.003>.

HAN, H. S. et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. 1-10, Mar. 2016. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>.

HE, J. et al. The aldose reductase inhibitor epalrestat exerts nephritic protection on diabetic nephropathy in db/db mice through metabolic modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, p. 86-97, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0043-5>.

HEAP, D. J.; GALTON, D. J. Sorbitol and other polyols in lens, adipose tissue and urine in diabetes mellitus. **Clinica Chimica Acta**, v. 63, n. 1, p. 41-47, Aug. 1975. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(75\)90376-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(75)90376-9).

HEARON, C. M. J.; DINENNO, F. A. Regulation of skeletal muscle blood flow during exercise in ageing humans. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 8, p. 2261-2273, Apr. 2016. <https://doi.org/10.1113/JP270593>.

HELLWIG, M.; HENLE, T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 39, p. 10316-10329, Sept. 2014. <https://doi.org/10.1002/anie.201308808>.

HERMAN, W. H. et al. Early Detection and Treatment of Type 2 Diabetes Reduce Cardiovascular Morbidity and Mortality: A Simulation of the Results of the Anglo-Danish-Dutch Study of Intensive Treatment in People With Screen-Detected Diabetes in Primary Care (ADDITION-Europe). **Diabetes Care**, v. 38, n. 8, p. 1449-1455, Aug. 2015. <https://doi.org/10.2337/dc14-2459>.

HERR, R. R.; JAHNKE, H. K.; ARGOUDELIS, A. D. Structure of streptozotocin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 18, p. 4808-4809, Aug. 1967. <https://doi.org/10.1021/ja00994a053>.

HEYDEMANN, A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1-14, July 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2902351>.

HEYLIGER, C. E. et al. Cardiac alpha- and beta-adrenergic receptor alterations in diabetic cardiomyopathy. **Basic Research in Cardiology**, v. 77, n. 6, p. 610-618, Nov. 1982. <https://doi.org/10.1007/BF01908314>.

HICKS, C. W.; SELVIN, E. Epidemiology of Peripheral Neuropathy and Lower Extremity Disease in Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 19, n. 10, p. 1-8, Aug. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1212-8>.

HIRSCH I. B.; BROWNLEE M. Should minimal blood glucose variability become the gold standard of glycemic control? **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 19, n. 3, p. 178-181, May/June 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2004.10.001>.

HOFFMAN, R. P. Vascular endothelial dysfunction and nutritional compounds in early type 1 diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 10, n. 3, p. 201-207, May 2014. <https://doi.org/10.2174/1573399810666140613124326>.

- HOME, P. (2003). The challenge of poorly controlled diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 101-109, Apr. 2003. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70015-0](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70015-0).
- HONG, F. et al. Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 510, n. 2, p. 135-146, June 2011. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2011.04.018>.
- HORAL, M. et al. Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: Involvement in diabetic teratogenesis. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 70, n. 8, p. 519-527, Aug. 2004. <https://doi.org/10.1002/bdra.20056>.
- HSUEH, W. A.; QUIÑONES, M. J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. **The American Journal of Cardiology**, v. 92, n. 4, Supl. 1, p. 10-17, Aug. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(03\)00611-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(03)00611-8).
- HUANG, D. et al. Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-9, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7839101>.
- HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease Models & Mechanisms**, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, Apr. 2009. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>.
- IDF – International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas Ninth edition 2019**, 9th edn. Brussels, Belgium: IDF, 2019. Disponível em: <<https://www.diabetesatlas.org>>.
- IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 656-662, Dec. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058>.
- IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec. 1987. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>.
- INAZU, M., SAKAI, Y., & HOMMA, I. Contractile responses and calcium mobilization in renal arteries of diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 203, n. 1, p. 79-84, Oct. 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90793-P](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90793-P).
- IRANAMI, H. et al. A Beta-adrenoceptor Agonist Evokes a Nitric Oxide-cGMP Relaxation Mechanism Modulated by Adenylyl Cyclase in Rat Aorta: halothane does not inhibit this mechanism. **Anesthesiology**, v. 85, n. 5, p. 1129-1138, Nov. 1996. <https://doi.org/10.1097/00000542-199611000-00022>.
- IRVINE, R. F. Inositol lipids in cell signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 212-219, Apr. 1992. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90035-B](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90035-B).
- IWABAYASHI, M. et al. Role of serotonin in angiogenesis: Induction of angiogenesis by sarpogrelate via endothelial 5-HT1B/Akt/eNOS pathway in diabetic mice. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 2, p. 337-342, Feb. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.042>.



IWASE, M. et al. Obesity Induced by Neonatal Monosodium Glutamate Treatment in Spontaneously Hypertensive Rats: An Animal Model of Multiple Risk Factors. **Hypertension Research**, v. 21, n. 1, p. 1-6, Jan./Mar. 1998. <https://doi.org/10.1291/hypres.21.1>.

JAKUŠ, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological Research**, v. 53, n. 2, p. 131-142, 2004.

JAMES, D. E. et al. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. **Nature**, v. 333, p. 183-185, May 1988. <https://doi.org/10.1038/333183a0>.

JAMWAL, S.; SHARMA, S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders. **Inflammation Research**, v. 67, n. 5, p. 391-405, Jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1129-8>.

JENSEN, M.; MEYTS, P. Molecular Mechanisms of Differential Intracellular Signaling From the Insulin Receptor. **Vitamins and Hormones**, v. 80, p. 51-75, 2009. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00603-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00603-1).

JOHANSEN, N. J.; TRIPOVIC, D.; BROCK, J. A. Streptozotocin-induced diabetes differentially affects sympathetic innervation and control of plantar metatarsal and mesenteric arteries in the rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 2, p. H215-H228, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00661.2012>.

JUNOD, A. et al. Studies of the Diabetogenic Action of Streptozotocin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 126, n. 1, p. 201-205, Oct. 1967. <https://doi.org/10.3181/00379727-126-32401>.

KAISER, N. et al. Differential Regulation of Glucose Transport and Transporters by Glucose in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. **Diabetes**, v. 42, n. 1, p. 80-89, Jan. 1993. <https://doi.org/10.2337/diab.42.1.80>.

KAMATA, K. et al. Effect of long-term streptozotocin-induced diabetes on coronary vasoconstriction in isolated perfused rat heart. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 5, p. 177-188, Oct. 2008. <https://doi.org/10.1540/jsmr.44.177>.

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. **British Journal of Pharmacology**, v. 97, n. 2, p. 614-618, June 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb11993.x>.

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. L. Diabetes and Cardiovascular Disease: The Framingham Study. **JAMA**, v. 241, n. 19, p. 2035-2038, May 1979. <https://doi.org/10.1001/jama.1979.03290450033020>.

KARAKI, H.; KUBOTA, H.; URAKAWA, N. Mobilization of stored calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 237-245, June 1979. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(79\)90176-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(79)90176-6).

KARAKI, H.; WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sciences**, v. 42, n. 2, p. 111-122, 1988. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(88\)90674-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90674-1).

KATOVICH, M. J.; MELDRUM, M. J. Effects of insulin and acarbose alone and in combination in the female streptozotocin-induced diabetic rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 12, p. 1209-1213, Dec. 1993. <https://doi.org/10.1002/jps.2600821205>.

KATOVICH, M. J.; MELDRUM, M. J.; VASSELLI, J. R. Beneficial effects of dietary acarbose in the streptozotocin-induced diabetic rat. **Metabolism**, v. 40, n. 12, p. 1275-1282, Dec. 1991. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(91\)90028-u](https://doi.org/10.1016/0026-0495(91)90028-u).

KATTOOR, A. J. et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 1, p. 1-11, Sept. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>.

KHAMAISSI M. et al. Cardiovascular disease in type 2 diabetics: epidemiology, risk factors and therapeutic modalities. **Israel Medical Association Journal**, Israel, v. 5, n. 11, p. 801-806, Nov. 2003.

KHAZAEI, M.; MOIEN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. **Pathophysiology**, v. 15, n. 1, p. 49-67, June 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2008.02.002>.

KING, H.; REWERS, M. Global Estimates for Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Adults. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 157-177, Jan. 1993. <https://doi.org/10.2337/diacare.16.1.157>.

KING, K. M.; RUBIN, G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. **British Journal of Nursing**, v. 12, n. 18, p. 1091-1095, Oct. 2003. <https://doi.org/10.12968/bjon.2003.12.18.11775>.

KIRK, K. L. et al. Syntheses and adrenergic agonist properties of ring-fluorinated isoproterenols. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 680-684, June 1982. <https://doi.org/10.1021/jm00348a014>.

KIRK, K. L. et al. Synthesis and adrenergic activity of ring-fluorinated phenylephrines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1982-1988, Oct. 1986. <https://doi.org/10.1021/jm00160a030>.

KNAPP, M.; TU, X.; WU, R. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, p. 1-8, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0042-6>.

KOBAYASHI, S. et al. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle: Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 30, p. 17997-18004, Oct. 1989.

KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Modulation by hydrogen peroxide of noradrenaline-induced contraction in aorta from streptozotocin-induced diabetic rat. **European Journal of**

**Pharmacology**, v. 441, n. 1-2, p. 83-89, Apr. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01370-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01370-5).

KOCHER, T. et al. Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. **Periodontology** 2000, v. 78, n. 1, p. 59-97, Oct. 2018. <https://doi.org/10.1111/prd.12235>.

KOLM-LITTY, V. et al. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 1, p. 160-169, Jan. 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI119875>.

KRUEGER, J. K. et al. Structures of calmodulin and a functional myosin light chain kinase in the activated complex: a neutron scattering study. **Biochemistry**, v. 36, n. 20, p. 6017-6023, May 1997. <http://dx.doi.org/10.1021/bi9702703>.

KULINA, G. R.; RAYFIELD, E. J. The role of glucagon in the pathophysiology and management of diabetes. **Endocrine Practice**, v. 22, n. 5, p. 612-621, May 2016. <https://doi.org/10.4158/ep15984.ra>.

LAAKSO, M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 5, p. 937-942, May 1999. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.5.937>.

LAGUESSE, G. E. Sur la formation des ilots de Langerhans dans le pancreas. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie**, France, t. 45, n. 1, p. 819-820, janv./déc. 1893.

LAKHTAKIA, R. The History of Diabetes Mellitus. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 13, n. 3, p. 368-370, Aug. 2013. <https://doi.org/10.12816/0003257>.

LANCEREAUX, E. Le diabète maigre: ses symptômes, son évolution, son pronostic et son traitement; ses rapports avec les altérations du pancréas. Etude comparative du diabète maigre et du diabète gras. Coup d'oeil rétrospectif sur les diabetes. **L'Union Médicale**, Paris, v. 29, n. 13, p. 161-167, janv. 1880.

LANCEREAUX, E. Le diabète maigre: ses symptômes, son évolution, son pronostic et son traitement; ses rapports avec les altérations du pancréas. Etude comparative du diabète maigre et du diabète gras. Coup d'oeil rétrospectif sur les diabetes. **L'Union Médicale**, Paris, v. 29, n. 16, p. 205-211, févr. 1880.

LANDSBERG, L.; MOLITCH, M. Diabetes and Hypertension: Pathogenesis, Prevention and Treatment. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, n. 7-8, p. 621-628, Nov. 2004. <https://doi.org/10.1081/CEH-200031945>.

LANGERHANS, P. **Beitrag zur mikroskopischen anatomie der bauchspeichel druse**. Inaugural-Dissertation, Berlin: Gustav Lange, 1869. 32 p.

LANNER, J. T. et al. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 11, p. 1-21, Nov. 2010. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>.

- LATIFPOUR, J.; MCNEILL, J. H. Cardiac autonomic receptors: effect of long-term experimental diabetes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 230, n. 1, p. 242-249, July 1984. [abstract]
- LEDOUX, J. et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, Feb. 2006. <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2005>.
- LEFRANDT, J. D. et al. Autonomic Dysfunction in Diabetes: a Consequence of Cardiovascular Damage. **Current Diabetes Reviews**, v. 6, n. 6, p. 348-358, Nov. 2010. <https://doi.org/10.2174/157339910793499128>.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216-226, Feb. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>.
- LEUNG, J. Y. T.; PANG, C. C. Y. Effects of nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, on cardiovascular function in 2 rat models of diabetes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 64, n. 1, p. 79-86, July 2014. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000093>.
- LEVICK, J. R. **An introduction to cardiovascular physiology**. London: Butterworth-Heinemann, 1991. 279p.
- LIN, C. H. et al. (-)-Epicatechin-3-O- $\beta$ -D-allopyranoside from *Davallia formosana* prevents diabetes and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic mice. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. 1-23, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173984>.
- LJUBKOVIC, M. et al. Disturbed fatty acid oxidation, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in left ventricle of patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 68, n. 10, p. 1924-1933, Oct. 2019. <https://doi.org/10.2337/db19-0423>.
- LOYAGA-RENDON, R. Y. et al. Mediators involved in decreasing peripheral vascular resistance with carbachol in the rat hind limb perfusion model. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 98, n. 3, p. 263-274, July 2005. <https://doi.org/10.1254/jphs.fp0050289>.
- LUCINI, D. et al. Early Progression of the Autonomic Dysfunction Observed in Pediatric Type 1 Diabetes Mellitus. **Hypertension**, v. 54, n. 5, p. 987-994, Nov. 2009. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140103>.
- LUNDER, M.; JANIĆ, M.; ŠABOVIČ, M. Prevention of Vascular Complications in Diabetes Mellitus Patients: Focus on the Arterial Wall. **Current Vascular Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 6-15, 2019. <https://doi.org/10.2174/1570161116666180206113755>.
- LYON, C. J.; HSUEH, W. A. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 in diabetes mellitus and cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**, v. 115, n. 8, Supl. 1, p. 62S-68S, Dec. 2003. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.08.014>.
- MA, L. et al. Abnormalities of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in aortic smooth muscle cells from streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 5-6, p. 568-573, May/June 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04832.x>.

MACCRACKEN, J.; HOEL, D. From ants to analogues: Puzzles and promises in diabetes management. **Postgraduate Medicine**, v. 101, n. 4, p. 138-150, 1997.  
<https://doi.org/10.3810/pgm.1997.04.195>.

MACKAY, J. D. et al. Diabetic autonomic neuropathy. The diagnostic value of heart rate monitoring. **Diabetologia**, v. 18, n. 6, p. 471-478, June 1980.  
<https://doi.org/10.1007/BF00261703>.

MAILLARD, L. C. Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, Paris, v. 154, n. 1, p. 66-68, janv./juin 1912.

MAJITHIYA, J. B.; BALARAMAN, R. Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 22, p. 2615-2624, Apr. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.020>.

MALTA, D. C. et al. Prevalence of diabetes mellitus as determined by glycated hemoglobin in the Brazilian adult population, National Health Survey. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v. 22, Supl. 2, p. 1-13, Oct. 2019.  
<https://doi.org/10.1590/1980-549720190006.supl.2>.

MARIC-BILKAN, C. Sex differences in micro- and macro-vascular complications of diabetes mellitus. **Clinical Science**, v. 131, n. 9, p. 833-846, May 2017.  
<https://doi.org/10.1042/CS20160998>.

MARINHO, F. et al. Burden of disease in Brazil, 1990-2016: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 392, n. 10149, p. 760-775, Sept. 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31221-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31221-2).

MATHER, K. J.; VERMA, S.; ANDERSON, T. J. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, n. 5, p. 1344-1350, Apr. 2001. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01129-9](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01129-9).

MCVEIGH, G. E. et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 35, p. 771-776, Aug. 1992. <https://doi.org/10.1007/BF00429099>.

MEIRELES, M. et al. Characterization and Modulation of Glucose Uptake in a Human Blood–Brain Barrier Model. **The Journal of Membrane Biology**, v. 246, n. 9, p. 669-677, Sept. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9583-2>.

MERING, J. V.; MINKOWSKI, O. Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 26, p. 371-387, Jan. 1890.  
<https://doi.org/10.1007/BF01831214>.

MEYER, J. D. Action de la sécrétion interne du pancréas sur différents organes et en particulier sur la sécrétion rénale. **Arch Int Physiol**, v. 7, p. 96-99, 1909.

MIKOSHIBA, K. IP3 receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts.

**Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 5, p. 1426-1446, Sept. 2007.

<http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04825.x>.

MINKOWSKI, O. Untersuchungen über den Diabetes mellitus nach Exstirpation des

Pankreas. **Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie**, v. 31, p. 85-189,

Apr. 1893. <https://doi.org/10.1007/BF01824780>.

MIRZAEI, M. et al. Epidemiology of diabetes mellitus, pre-diabetes, undiagnosed and

uncontrolled diabetes in Central Iran: results from Yazd health study. **BMC Public Health**, v.

20, n. 1, p. 1-9, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-8267-y>.

MISHRA, S. C. et al. Diabetic foot. **The BMJ**, v. 359, Supl. 1, p. 1-7, Nov. 2017.

<https://doi.org/10.1136/bmj.j5064>.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to

therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 61-74, Jan. 1999.

<https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0844>.

MONNIER, V. M.; CERAMI, A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. **Science**, v. 211, n. 4481, p. 491-493, Jan. 1981.

<https://doi.org/10.1126/science.6779377>.

MORTENSEN, S. P.; SALTIN, B. Regulation of the skeletal muscle blood flow in humans.

**Experimental Physiology**, v. 99, n. 12, p. 1552-1558, Dec. 2014.

<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.081620>.

MULVANY, M. J. Are vascular abnormalities a primary cause or secondary consequence of hypertension? **Hypertension**, v. 18, n. 3, Supl. 1, Sept. 1991.

[https://doi.org/10.1161/01.HYP.18.3\\_Suppl.I52](https://doi.org/10.1161/01.HYP.18.3_Suppl.I52). [abstract]

NAGAREDDY, P. R. et al. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes.

**American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5, p.

H2144-H2152, Nov. 2005. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00591.2005>.

NATH, S.; GHOSH, S. K.; CHOUDHURY, Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin

treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 84, p. 20-30, Mar./Apr. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.10.007>.

NATHAN, D. M. et al. Intensive Diabetes Therapy and Carotid Intima–Media Thickness in Type 1 Diabetes Mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 23, p. 2294-

2303, June 2003. <https://doi.org/10.1056/nejmoa022314>.

NATHAN, D. M. et al. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 25, p. 2643-2653,

Dec. 2005. <https://doi.org/10.1056/nejmoa052187>.

NAVARRO-PÉREZ, J. et al. Mortality and cardiovascular disease burden of uncontrolled diabetes in a registry-based cohort: the ESCARVAL-risk study. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 18, n. 1, p. 1-9, Sept. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0914-1>.

NAVEDO, M. F. et al. Constitutively active L-type Ca<sup>2+</sup> channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 31, p. 11112-11117, Aug. 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500360102>.

NELSON, M. T. et al. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. **Science**, v. 270, n. 5236, p. 633-637, Oct. 1995. <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.633>.

NICHOLLS, D. G. Mitochondria and calcium signaling. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 311-317, Sept./Oct. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.011>.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 787-790, Apr. 2000. <https://doi.org/10.1038/35008121>.

NISHIMURA, J.; BREEMEN, C. V. Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 163, n. 2, p. 929-935, Sept. 1989. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92311-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92311-5).

NISWENDER, K. D. Basal Insulin: Physiology, Pharmacology, and Clinical Implications. **Postgraduate Medicine**, v. 123, n. 4, p. 17-26, July 2011. <https://doi.org/10.3810/pgm.2011.07.2300>

OATES, P. J. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. **International Review of Neurobiology**, v. 50, p. 325-392, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(02\)50082-9](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(02)50082-9).

OLBRICH, A. et al. Different Effects of the  $\beta$ -Adrenoceptor Antagonists Celiprolol and Metoprolol on Vascular Structure and Function in Long-Term Type I Diabetic Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 193-203, Feb. 1999. <https://doi.org/10.1097/00005344-199902000-00004>.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. **Doenças cardiovasculares**. 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares>>. Acesso em: 13 mar. 2021.

ORAM, R. A. et al. Most People With Long-Duration Type 1 Diabetes in a Large Population-Based Study Are Insulin Microsecretors. **Diabetes Care**, v. 38, n. 2, p. 323-328, Feb. 2015. <https://doi.org/10.2337/dc14-0871>.

ORIOWO, M. A. Different atypical  $\beta$ -adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. **Life Sciences**, v. 56, n. 15, p. PL269-PL275, Mar. 1995. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00076-3).

OTTOLINI, M.; HONG, K.; SONKUSARE, S. K. Calcium signals that determine vascular resistance. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1-27, Sept./Oct. 2019. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1448>.

- OZCAN, M. F. et al. Trimetazidine has protective effects on spermatogenesis in a streptozotocin-induced diabetic rat model. **Andrologia**, v. 49, n. 10, p. 1-9, Dec. 2017. <https://doi.org/10.1111/and.12780>.
- ÖZTURAN, A. et al. Effect of inositol and its derivatives on diabetes: a systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 7, p. 1124-1136, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1392926>.
- ÖZYAZGAN, S. et al. Impaired Relaxation in Aorta from Streptozotocin-diabetic Rats: Effect of Aminoguanidine (AMNG) Treatment. **International Journal of Experimental Diabetes Research**, v. 1, n. 2, p. 145-153, Apr./June 2000. <https://doi.org/10.1155/EDR.2000.145>.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>.
- PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, June 1987. <https://doi.org/10.1038/327524a0>.
- PARVIZI, J.; KIM, G. K. Chapter 69 - Diabetic Foot. *In*: PARVIZI, J. **High Yield Orthopaedics**, 1. ed. Philadelphia: Saunders, 2010. p. 141-142. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-0236-9.00080-8>.
- PELIGOT, E. Recherches sur la Nature et la Propriétés Chimiques des Sucres, **Compt. Rendus**, v. 6, p. 232-236, 1838.
- PENG, W.; WONG, Y. C.; KRAINIC, D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics via lysosomal TRPML1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 32, p. 19266-19275, Aug. 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003236117>.
- PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. (2003). Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 4, p. 186-187, Oct. 2003. <https://doi.org/10.2337/diaclin.21.4.186>.
- PETERSEN, K. F. et al. Reversal of Nonalcoholic Hepatic Steatosis, Hepatic Insulin Resistance, and Hyperglycemia by Moderate Weight Reduction in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 3, p. 603-608, Mar. 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.3.603>.
- PETERSEN, K. F. et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 31, p. 12587-12594, July 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705408104>.
- PIYA, M. K.; MCTERNAN, P. G.; KUMAR, S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 1, p. T1-T15, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0498>.



POZZAN, T. et al. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 595-636, July 1994. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.595>.

PRADHAN, A. D. et al. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. **JAMA**, v. 286, n. 3, 327-334, July 2001. <https://doi.org/10.1001/jama.286.3.327>.

PREWITT, R. L.; REILLY, C. K.; WANG, D. H. Pressure-flow curves reflect arteriolar responses in perfused rat hindquarters. **Hypertension**, v. 23, n. 2, p. 223-228, Feb. 1994. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.23.2.223>.

PURANDARE, A.; PHALGUNE, D.; SHAH, S. Variability of Length of Small Intestine in Indian Population and Its Correlation with Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. **Obesity Surgery**, v. 29, n. 10, p. 3149-3153, Oct. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11695-019-03921-5>.

PUREWAL, T. S. et al. Lower limb venous pressure in diabetic neuropathy. **Diabetes Care**, v. 18, n. 3, p. 377-381, Mar. 1995. <https://doi.org/10.2337/diacare.18.3.377>.

QUONDAMATTEO, F. Skin and diabetes mellitus: what do we know? **Cell and Tissue Research**, v. 355, n. 1, p. 1-21, Jan. 2014. doi:10.1007/s00441-013-1751-2.

RAEYMAEKERS, L.; JONES, L. R. Evidence for the presence of phospholamban in the endoplasmic reticulum of smooth muscle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 882, n. 2, p. 258-265, June 1986. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90163-7).

RASMUSSEN, H. The Calcium Messenger System (First of Two Parts). **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 17, p. 1094-1101, Apr. 1986. <https://doi.org/10.1056/nejm198604243141707>.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, Dec. 1988. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>.

REMEDY, M. S.; EMFINGER, C. Pancreatic  $\beta$ -cell identity in diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 18, Supl. 1, p. 110-116, Sept. 2016. <https://doi.org/10.1111/dom.12727>.

ROLLO, J. Account of Two Cases of Diabetes Mellitus, with Remarks. In: **Annals of Medicine, for the Year ...** : Exhibiting a Concise View of the Latest and Most Important Discoveries in Medicine and Medical Philosophy, v. 2, p. 85-105, 1797.

ROLLO, J. **Cases of the Diabetes Mellitus, with the Results of the Trials of Certain Acids, and other Substances, in the Cure of the Lues Venerea**, 2nd ed., London: T. Gillet, 1798. 628 p.

RUBINO, F. et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. **Annals of Surgery**, v. 244, n. 5, p. 741-749, Nov. 2006. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000224726.61448.1b>.

RUDERMAN, N. B.; HOUGHTON, C. R. S.; HEMS, R. Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism. **Biochemical Journal**, v. 124, n. 3, p. 639-651, Sept. 1971. <https://doi.org/10.1042/bj1240639>.

RUNDLES, R. W. Diabetic Neuropathy General Review with Report of 125 Cases. **Medicine (Baltimore)**, v. 24, n. 2, p. 111-160, May 1945.

SAKURAI, S. et al. The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, Supl. 3, p. S259-S263, Aug. 2003. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000077414.59717.74>.

SALVETTI, A. et al. The Inter-Relationship between Insulin Resistance and Hypertension. **Drugs**, v. 46, Supl. 2, p. 149-159, Dec. 1993. <https://doi.org/10.2165/00003495-199300462-00024>.

SANTULLI, G. et al. Intracellular calcium release channels: an update. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 10, p. 3041-3051, May 2017. <https://doi.org/10.1113/JP272781>.

SARWAR, N. et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **The Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2215-2222, June 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60484-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60484-9).

SATTAR, M. A. et al.  $\alpha$ 1A- and  $\alpha$ 1D-adrenoceptors are the major functional subtypes of renal  $\alpha$ 1-adrenoceptors in streptozotocin-induced diabetic and normal Sprague–Dawley rats. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 1-10, Jan. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2007.00412.x>.

SAVARESE, J. J.; BERKOWITZ, B. A.  $\beta$ -Adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. **Life Sciences**, v. 25, n. 24-25, p. 2075-2078, Dec. 1979. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90200-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90200-5).

SCHADEWALDT, H. Paracelsus and the Sugar Disease. In: VON ENGELHARDT, D. (ed.) **Diabetes Its Medical and Cultural History**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 1989. p. 201-208. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-48364-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-48364-6_13).

SCHIFFRIN, E. L. Vascular Remodeling in Hypertension: Mechanisms and Treatment. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 367-374, Feb. 2012. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187021>.

SCHÖNAUER, M. et al. Cardiac autonomic diabetic neuropathy. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 5, n. 4, p. 336-344, Nov. 2008. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2008.047>.

SCHWANN, T. **Microscopical Researches into the Accordance in the Structure and Growth of Animals and Plants**. London: Sydenham Society, 1847. 268 p. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.17276>.

SELBY, N. M.; TAAL, M. W. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 22, n. S1, p. 3-15, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1111/dom.14007>.

SHAMSALDEEN, Y. A. et al. Dysfunction in nitric oxide synthesis in streptozotocin treated rat aorta and role of methylglyoxal. **European Journal of Pharmacology**, v. 842, p. 321-328, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.10.056>.

SHARPEY-SCHÄFER, E. A. **The endocrine organs: an introduction to the study of internal secretion**. London: Longmans, Green, and Co., 1916. 156p. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.1131>.

SHEN, X. et al. Protection of Cardiac Mitochondria by Overexpression of MnSOD Reduces Diabetic Cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 798-805, Mar. 2006. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1039>.

SHI, Y.; VANHOUTTE, P. M. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 9, n. 5, p. 434-449, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12521>.

SHIN, E. et al. Different effects of prolonged  $\beta$ -adrenergic stimulation on heart and cerebral artery. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 4, p. 204-210, Dec. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2014.10.002>

SIBA, I. P. et al. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 326, p. 173-186, May 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.008>.

SILVA, A. A. et al. Role of Hyperinsulinemia and Insulin Resistance in Hypertension: Metabolic Syndrome Revisited. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 36, n. 5, p. 671-682, May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.066>.

SILVA, R. C. V. A. F. et al. Hypotensive and diuretic effect of the butanolic soluble fraction of the hydroethanolic extract of bark of *Scutia buxifolia* Reissekinrats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 395-401, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.006>.

SIMMERMAN, H. K.; JONES, L. R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 4, p. 921-947, Oct. 1998. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.921>.

SIMMONS, R. A.; TEMPLETON, L. J.; GERTZ, S. J. Intrauterine Growth Retardation Leads to the Development of Type 2 Diabetes in the Rat. **Diabetes**, v. 50, n. 10, p. 2279-2286, Oct. 2001. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2279>.

SIMPSON, I. A.; CUSHMAN, S. W. Hormonal Regulation of Mammalian Glucose Transport. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 1059-1089, July 1986. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005211>.

SINGH, V. P. et al. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1-14, Feb. 2014. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1>.

SMANI, T. et al. Impact of Diabetes on Cardiac and Vascular Disease: Role of Calcium Signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 4166-4177, 2019. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170523140925>.

SOTNÍKOVÁ, R. et al. Streptozotocin diabetes-induced changes in aorta, peripheral nerves and stomach of Wistar rats. **General Physiology and Biophysics**, v. 18, focus issue, p. 155-162, Oct. 1999.

SRINIVAS, N. R. Strategies for preclinical pharmacokinetic investigation in streptozotocin-induced diabetes mellitus (DMIS) and alloxan-induced diabetes mellitus (DMIA) rat models: case studies and perspectives. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 40, (1), p. 1-12, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13318-014-0186-9>.

SRIVASTAVA, S. K. et al. Hyperglycemia-induced activation of human erythrocyte aldose reductase and alterations in kinetic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 870, n. 2, p. 302-311, Mar. 1986. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90234-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90234-7).

STEHOUWER, C. D. A.; HENRY, R. M. A.; FERREIRA, I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 527-539, Feb. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0918-3>.

STRAIN, W. D.; PALDÁNIUS, P. M. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 1, p. 1-10, Apr. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0703-2>.

SUN, Z. et al. miR-133b and miR-199b knockdown attenuate TGF- $\beta$ 1-induced epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SIRT1 in diabetic nephropathy. **European Journal of Pharmacology**, v. 837, p. 96-104, Oct. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.022>.

SUTANTO H. et al. Cardiomyocyte calcium handling in health and disease: Insights from in vitro and in silico studies. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 157, p. 54-75, Nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.02.008>.

SUZUKI, K.; KONO, T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 5, p. 2542-2545, May 1980. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2542>.

SWARUP, S. et al. Metabolic Syndrome, Nov. 2020. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, Jan. 2021.

SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546 Jan. 2001.

TANG, W. et al. Effect of interleukin-6 (IL-6) on the vascular smooth muscle contraction in abdominal aorta of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Chinese Journal of Physiology**, v. 54, n. 5, p. 318-323, Oct. 2011. <https://doi.org/10.4077/CJP.2011.AMM069>.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 85-96, Feb. 2006. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-1081, Dec. 2003. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F>.

THE NOBEL PRIZE. **Frederick G. Banting – Nobel Lecture**. Sept. 1925. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1923/banting/lecture/>>. Acesso em: 20 ago 2020.

THEVIS, M.; THOMAS, A.; SCHÄNZER, W. Insulin. *In*: THIEME, D.; HEMMERSBACH, P. (ed.). **Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis**. Handbook of Experimental Pharmacology, v. 195, Berlin: Springer, p. 209-226, 2010. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_10).

TITZE, J.; LUFT, F. C. Speculations on salt and the genesis of arterial hypertension. **Kidney International**, v. 91, n. 6, p. 1324-1335, June 2017. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.034>.

TOULIS, K. A. et al. Glucokinase activators for type 2 diabetes: challenges and future developments. **Drugs**, v. 80, p. 467-475, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01278-z>.

TRIPATHI, B. K.; SRIVASTAVA, A. K. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 7, p. RA130-RA147, July 2006.

TZOULAKI, I.; FOWKES, F. G. R. Peripheral Arterial Disease. *In*: QUAH, S. R. (ed.). **International Encyclopedia of Public Health**, 2. ed. Waltham: Elsevier, 2017. p. 449-453. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00328-3>.

UKPDS – 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). **The Lancet**, v. 352, n. 9131, p. 837-853, Sept. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07019-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07019-6).

UMPIERREZ, G.; KORYTKOWSKI, M. Diabetic emergencies — ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 4, p. 222-232, Apr. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.15>.

UNGVARI, Z. et al. Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels and protein kinase C. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 4, p. 1018-1028, Sept. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00106-6).

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22-96, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>.

VÁRKONYI, T.; KEMPLER, P. Sexual dysfunction in diabetes. In: ZOCHODNE, D. W.; MALIK, R. A. (ed.). **Handbook of Clinical Neurology**, China: Elsevier B.V., 2014. v. 126, cap. 16, p. 223-232. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00017-5>.

VERY, N. et al. Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 1-10, Oct. 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00602>.

VINIK, A. I. et al. Diabetic Autonomic Neuropathy. **Diabetes Care**, v. 26, n. 5, p. 1553-1579, May 2003. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.5.1553>.

VINIK, A. I.; ZIEGLER, D. Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. **Circulation**, v. 115, n. 3, p. 387-397, Jan. 2007. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.634949>.

VOUILLARMET, J. et al. Neurovascular Response to Pressure in Patients with Diabetic Foot Ulcer. **Diabetes**, v. 68, n. 4, p. 832-836, Apr. 2019. <https://doi.org/10.2337/db18-0694>.

WANG, Y. et al. Contribution of sustained Ca<sup>2+</sup> elevation for nitric oxide production in endothelial cells and subsequent modulation of Ca<sup>2+</sup> transient in vascular smooth muscle cells in coculture. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 10, p. 5647-5655, Mar. 1996. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5647>.

WARING, W. S. et al. Uric Acid Restores Endothelial Function in Patients With Type 1 Diabetes and Regular Smokers. **Diabetes**, v. 55, n. 11, p. 3127-3132, Nov. 2006. <https://doi.org/10.2337/db06-0283>.

WASSERMAN, D. H.; WANG, T. J.; BROWN, N. J. The Vasculature in Prediabetes. **Circulation Research**, v. 122, n. 8, p. 1135-1150, Apr. 2018. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.311912>.

WESTERBACKA, J.; YKI-JÄRVINEN, H. Arterial Stiffness and Insulin Resistance. **Seminars in Vascular Medicine**, v. 2, n. 2, p. 157-164, Apr./June 2002. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32039>.

WEXLER, D. J. et al. Prevalence of Hyper- and Hypoglycemia Among Inpatients With Diabetes: A national survey of 44 U.S. hospitals. **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. 367-369, Feb. 2007. <https://doi.org/10.2337/dc06-1715>.

WHO – World Health Organization. **Classification of diabetes mellitus 2019**. Geneva: WHO, 2019. 36 p. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/325182>>.

WHO – World Health Organization. Newsroom, Fact sheets, Detail, **The top 10 causes of death**. May 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 12 ago. 2020.

WICKLER, S. J. et al. Isoproterenol-induced blood flow in rats acclimated to room temperature and cold. **The American Journal of Physiology**, v. 246, n. 5, p. R747-P752, May 1984. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.246.5.R747>.

WIDLANSKY, M. E.; HILL, R. B. Mitochondrial Regulation of Diabetic Vascular Disease: An Emerging Opportunity. **Translational Research**, v. 202, p. 83-98, Dec. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.015>.

WILLIS, T. **Pharmaceutice rationalis sive Diatriba de Medicamentorum operationibus in humano corpore**. v. 2. Genevæ: Samvelem De Tovrnes, 1680. 333 p.

XAVIER, F. E. et al. Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. **Vascular Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 67-76, Jan. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(02\)00315-4](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00315-4).

YALCIN, S.; WINEGRAD, A. I. Defect in glucose metabolism in aortic tissue from alloxan diabetic rabbits. **American Journal of Physiology**, v. 205, n. 6, p. 1253-1259, Dec. 1963. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1963.205.6.1253>.

YAMANAKA, J. et al. An Important Role for the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger in the Decrease in Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Concentration induced by Isoprenaline in the Porcine Coronary Artery. **The Journal of Physiology**, v. 549, n. 2, p. 553-562, June 2003. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.037135>.

YAMAZAKI, D.; HITOMI, H.; NISHIYAMA, A. Hypertension with diabetes mellitus complications. **Hypertension Research**, v. 41, n. 3, p. 147-156, Mar. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41440-017-0008-y>.

YE, J. M.; COLQUHOUN, E. Q. Changes in functional expression of alpha-1 adrenoceptors in hindlimb vascular bed of spontaneously hypertensive rats and their effects on oxygen consumption. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 286, n. 2, p. 599-606, Aug. 1998.

YIP, J.; FACCHINI, F. S.; REAVEN, G. M. Resistance to Insulin-Mediated Glucose Disposal as a Predictor of Cardiovascular Disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 8, p. 2773-2776, Aug. 1998. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.8.5005>.

YU, Z.; MCNEILL, J. H. Blood pressure and heart rate response to vasoactive agents in conscious diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, n. 12, p. 1542-1548, Dec. 1992. <https://doi.org/10.1139/y92-221>.

ŻALIŃSKA, M. et al. Insulin secretion in the early phase of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and new hopes for maintaining it through therapy. **Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism**, v. 22, n. 3, p. 118-123, July/Sept. 2016. <https://doi.org/10.18544/PEDM-22.03.0059>.

ZHENG, J.; ZENG, X.; WANG, S. Calcium ion as cellular messenger. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 1, p. 1-5, Jan. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4795-y>.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, Dec. 2001. <https://doi.org/10.1038/414782a>.

ZOUNGAS, S. et al. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 57, n. 12, p. 2465-2474, Dec. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3369-7>.



## **APÊNDICES**

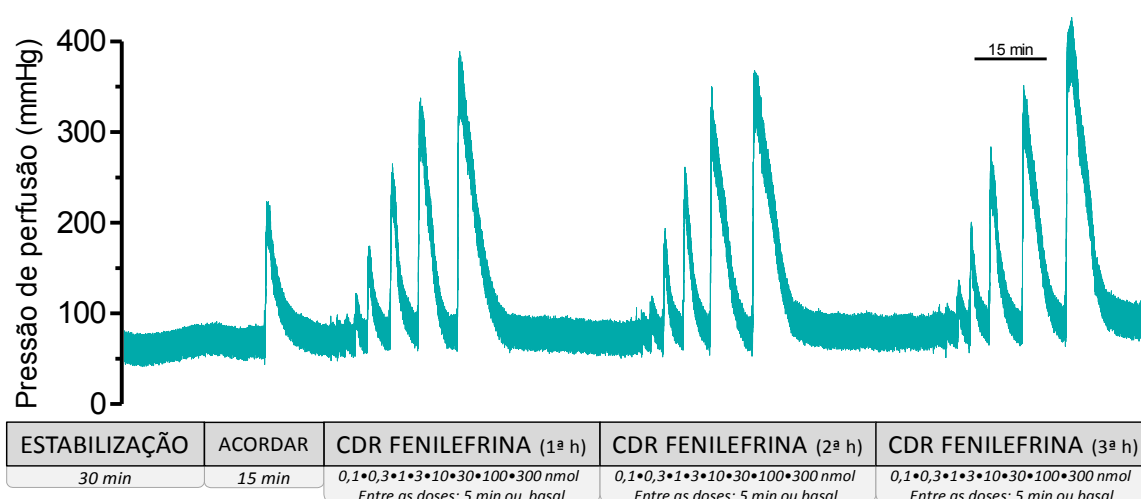


## APÊNDICE A – Padronização da Perfusão da Perna Isolada

Utilizando a perna isolada de ratas naïves acopladas a um sistema de perfusão, nós padronizamos a perfusão do leito vascular da musculatura esquelética em nosso laboratório, a fim de possibilitar a realização do estudo da reatividade vascular desse leito periférico. Após 30 min de estabilização, uma dose de fenilefrina (30 nmol) era administrada às preparações, para testar sua viabilidade, e então, após 15 min dessa administração, todos os protocolos eram iniciados. Por sua vez, ao executar os protocolos, entre as doses era respeitado sempre um intervalo de 5 min ou o retorno aos valores basais.

### A.1 Teste de viabilidade temporal

Com a finalidade de determinar a viabilidade das preparações no decorrer do tempo foi realizado um teste de viabilidade temporal com as pernas perfundidas. Após o período de estabilização e da administração inicial de fenilefrina, foi realizada uma curva dose resposta para fenilefrina dentro da primeira hora de perfusão. A curva foi então repetida dentro da segunda e da terceira hora. Esses experimentos foram realizados utilizando diferentes fluxos de perfusão: 2, 3, 4 e 5 mL/min, conforme demonstrado no Protocolo experimental 1.



**Protocolo experimental 1 – Protocolo utilizado para o teste de viabilidade temporal em preparações de perna isolada.** Após as preparações serem estabilizadas por 30 min e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), curvas dose resposta para fenilefrina eram realizadas nos tempos 1 h, 2 h, e 3 h. Sendo este protocolo repetido em preparações onde o leito vascular da musculatura esquelética era submetido a diferentes fluxos de perfusão, a saber, fluxos de 2, 3, 4 e 5 mL/min. Fonte: O autor.

### A.1.1 Preparações de perna isolada são estáveis sob determinados fluxos de perfusão

A viabilidade temporal das nossas preparações foi testada sob diferentes fluxos de perfusão. Para a perfusão do quadrante posterior através dos métodos anteriores a literatura traz diferentes taxas de fluxo de perfusão, por exemplo, enquanto Loyaga-Rendon et al., (2005), utilizaram uma taxa constante de 3,5 mL/min, Prewitt, Reilly e Wang (1994), utilizaram 10 mL/min para cada 100 g de tecido. Para a perfusão do leito renal e do leito mesentérico em nosso laboratório já havia sido padronizado um fluxo constante de 4 mL/min para a perfusão do leito renal (SANT'HELENA et al., 2015) e do leito mesentérico (BERNARDELLI et al., 2016). Dessa forma, a fim de encontrarmos o melhor fluxo de perfusão a ser adotado, testamos quatro diferentes fluxos.

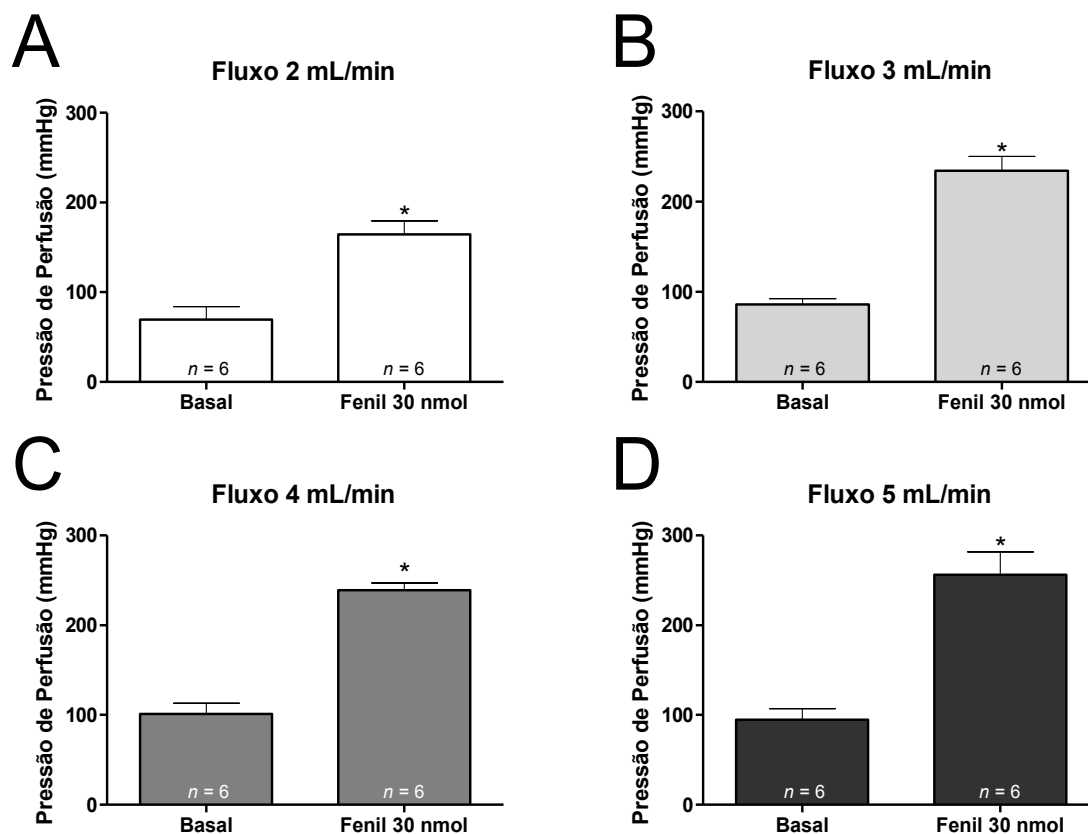
Após os 30 min iniciais de estabilização das preparações no sistema de perfusão, ao administrarmos fenilefrina (30 nmol) para testar a viabilidade do tecido verificamos que nos diferentes fluxos testados (2, 3, 4 e 5 mL/min) todas as preparações responderam à essa administração, observado através do aumento da pressão de perfusão decorrente da vasoconstrição do leito pela ativação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Figura 47).

Entre as resposta observadas na Figura 47 não houve diferença entre as pressões de perfusão basal exibida para os quatro diferentes fluxos testados. Todavia quando analisadas as respostas evocadas pela administração de fenilefrina (30 nmol), observamos que as respostas obtidas sob o fluxo de perfusão de 3 e 5 mL/min foram maiores do que a observada sob o fluxo de 2 mL/min para a mesma droga. A resposta para a fenilefrina (30 nmol) observada sob o fluxo de perfusão de 4 mL/min não apresentou diferença com nenhuma das respostas observadas para a mesma droga nos demais fluxos testados (análises não demonstradas).

Ao realizarmos curvas dose resposta para a fenilefrina, e sendo essas curvas repetidas a cada hora num período de 3h, e utilizando diferentes fluxos de perfusão (2, 3, 4 e 5 mL/min), tornou possível determinar o melhor fluxo de perfusão a ser utilizado nas preparações de perna isolada. Inicialmente já possível perceber que o fluxo de 2 mL/min não seria adequado para manter as preparações viáveis no decorrer do tempo (Figura 48A), uma vez que houve uma diminuição da eficácia nas respostas evocadas pela fenilefrina na segunda e terceira hora do experimento, provavelmente porque o fluxo utilizado era insuficiente para garantir o aporte necessário da solução fisiológica nutritiva aos tecidos.

A utilização de um fluxo de 5 mL/min foi o que mais ocasionou edema nas preparações (dados não mostrados) e por isso esse fluxo de perfusão também foi descartado junto com o fluxo de 2 mL/min, apesar de não haver diminuição na eficácia da resposta para a fenilefrina

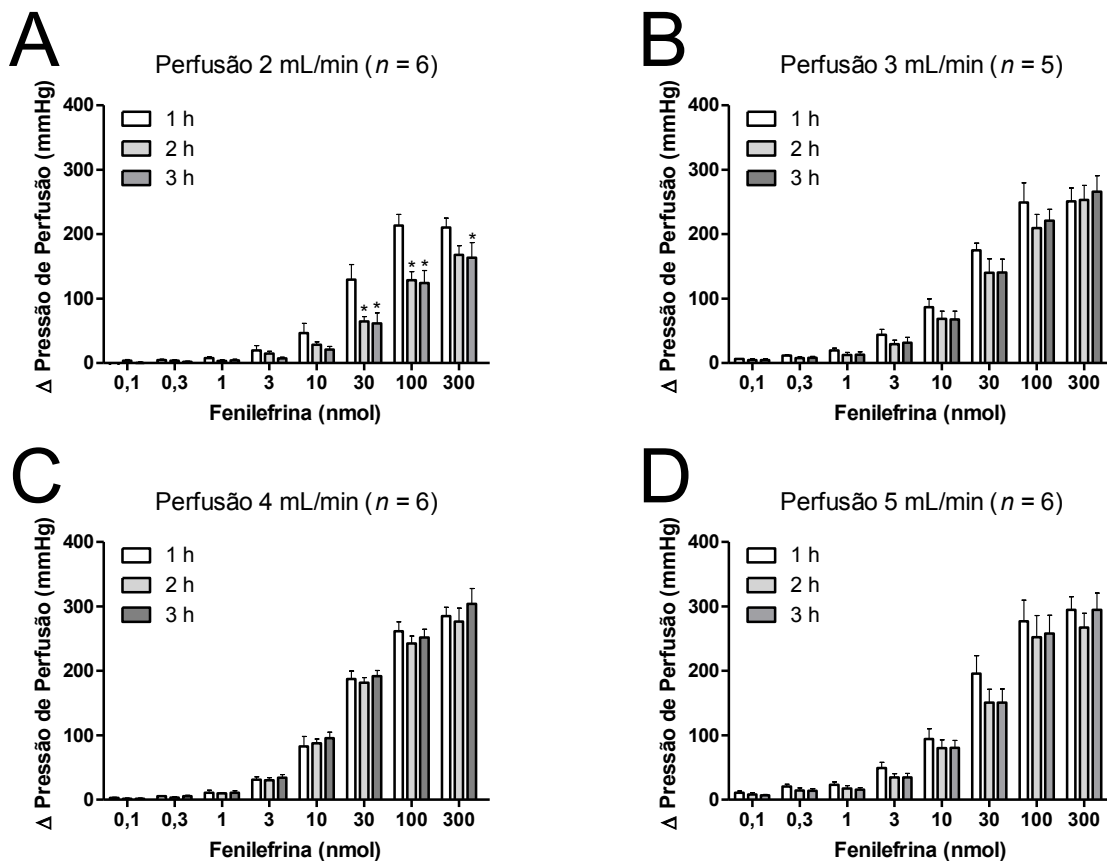
quando repetida as curvas dose resposta durante as três horas. Esta manutenção da eficácia também foi observada para os fluxos de 3 e 4 mL/min (Figura 48).



**Figura 47 – Aumento da pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas após a administração de fenilefrina (30 nmol) sob diferentes fluxos de perfusão.** Foram utilizados os seguintes fluxos de perfusão: 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D) mL/min. Fenil – fenilefrina. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença estatística existente entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Teste *t* de Student.

Dessa forma, como não houve diferença quando comparadas as respostas obtidas para as doses de fenilefrina no decorrer do tempo (1h, 2h e 3h), tanto quando utilizado o fluxo de perfusão de 3 mL/min (Figura 48B) como o de 4 mL/min (Figura 48C), resolvemos comparar se entre esses dois fluxos as respostas para a fenilefrina também seriam iguais.

Nesta análise foi observada que na terceira repetição da curva dose resposta para fenilefrina (no tempo 3h) a dose de 30 nmol num fluxo de 3 mL/min tinha uma menor eficácia quando comparada com a mesma dose num fluxo de 4 mL/min (análise não demonstrada). Assim, frente a esses resultados passamos a adotar o fluxo de perfusão constante de 4 mL/min em nossos protocolos experimentais.



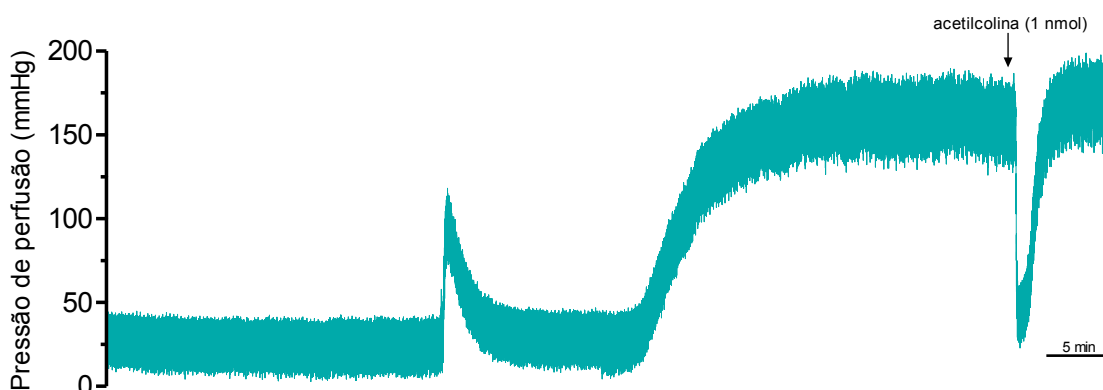
**Figura 48 – Curvas dose resposta para fenilefrina realizadas nas primeiras 3 horas de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas.** Ao final de cada hora uma curva dose resposta era realizada até a terceira hora de perfusão. São apresentados os deltas máximos de aumento da pressão de perfusão dos leitos vasculares utilizando os seguintes fluxos de perfusão: 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D) mL/min. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

As preparações de leito vascular da musculatura esquelética de pernas isoladas são estáveis durante 3 h de perfusão com fluxo de perfusão constante de 4 mL/min, fluxo este que foi capaz de garantir que não ocorresse hipoperfusão dos tecidos, muito menos uma hiperperfusão, gerando edemas que pudessem no decorrer do tempo vir a prejudicar a viabilidade das preparações. Assim, a partir desse momento, todas as perfusões de perna isolada foram realizadas utilizando um fluxo de perfusão de 4 mL/min, conforme resultados obtidos com a condução desses experimentos que visaram avaliar a viabilidade das preparações de perna isolada e determinar o fluxo de perfusão adequado.

## A.2 Padronização das curvas de relaxamento

Para determinar a viabilidade de se estudar o relaxamento do leito vascular da musculatura esquelética a partir de pernas isoladas de ratas, à solução fisiológica salina (líquido de perfusão) foram adicionadas diversas concentrações de fenilefrina, de forma exclusiva, para que cada preparação recebesse apenas uma concentração determinada, e adicionalmente, para fins de comparação, também realizado um grupo recebendo uma única concentração de adrenalina veiculada ao líquido de perfusão, conforme explicitado a seguir.

O protocolo consistiu na observação da resposta do leito vascular durante os trinta primeiros minutos após a troca do líquido de perfusão por um líquido de perfusão de mesma composição contendo a adição de um agente vasoconstritor. Foram utilizadas cinco concentrações de fenilefrina (3, 5, 7, 10 e 15  $\mu\text{M}$ ), sendo que cada preparação recebia apenas uma dessas concentrações, conforme Protocolo experimental 2.



ESTABILIZAÇÃO	ACORDAR	I) PERFUSÃO COM FENILEFRINA 3 $\mu\text{M}$ ou
30 min	15 min	II) PERFUSÃO COM FENILEFRINA 5 $\mu\text{M}$ ou
		III) PERFUSÃO COM FENILEFRINA 7 $\mu\text{M}$ ou
		IV) PERFUSÃO COM FENILEFRINA 10 $\mu\text{M}$ ou
		V) PERFUSÃO COM FENILEFRINA 15 $\mu\text{M}$ ou
		VI) PERFUSÃO COM ADRENALINA 3 $\mu\text{M}$
		30 min

**Protocolo experimental 2 – Protocolo utilizado para a padronização de curvas de relaxamento em preparações de perna isolada.** Após as preparações serem estabilizadas por 30 min e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), o líquido de perfusão era substituído por outro de igual composição contendo um dos vasoconstritores em suas respectivas concentrações listados de I a VI. Com 30 min da mudança de perfusão, as preparações perfundidas com fenilefrina receberam uma única dose de acetilcolina (1 nmol), indicada pela flecha no registro; por sua vez, nas preparações perfundidas com adrenalina foi realizada uma curva dose resposta para acetilcolina (1, 10 e 100 nmol), não representada no registro acima. Fonte: O autor.

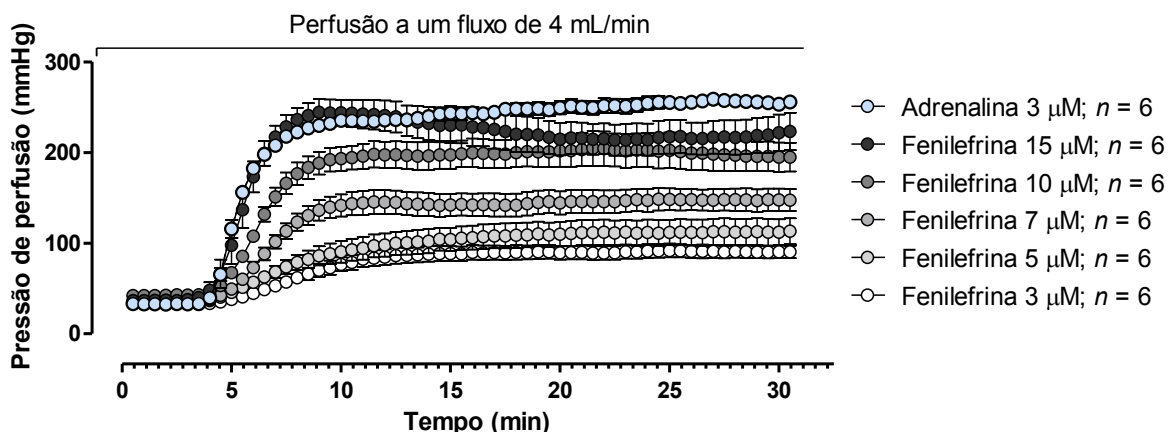
Após 30 min do início da perfusão com a fenilefrina, nas diversas concentrações utilizadas, uma única dose de acetilcolina (1 nmol) era administrada e seu efeito avaliado, conforme pode ser observado no Protocolo experimental 2.

Nas preparações que foram perfundidas com adrenalina (3  $\mu$ M), após 30 min do início da perfusão com esse vasoconstritor, uma curva dose resposta para acetilcolina (1, 10 e 100 nmol) era realizada. A adrenalina foi utilizada para testar a viabilidade de se utilizar outros vasoconstritores mais potentes que a fenilefrina, dessa forma sendo utilizada para a adrenalina a menor concentração testada para a fenilefrina no protocolo anterior.

#### A.2.1 É viável realizar curvas de relaxamento utilizando pernas perfundidas

A adição de agentes vasoconstritores na solução de perfusão das preparações de pernas isoladas foi capaz de ocasionar vasoconstrição de forma sustentada e dependente da dose, permitindo, sob o platô de constrição, a realização de curvas dose resposta.

As preparações partiram de um valor basal médio próximo a 35 mmHg para: 92 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 3  $\mu$ M; 113 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 5  $\mu$ M; 148 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 7  $\mu$ M; 204 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 10  $\mu$ M; 244 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 15  $\mu$ M; e 259 mmHg, nos grupos que receberam adrenalina 3  $\mu$ M (Figura 49).



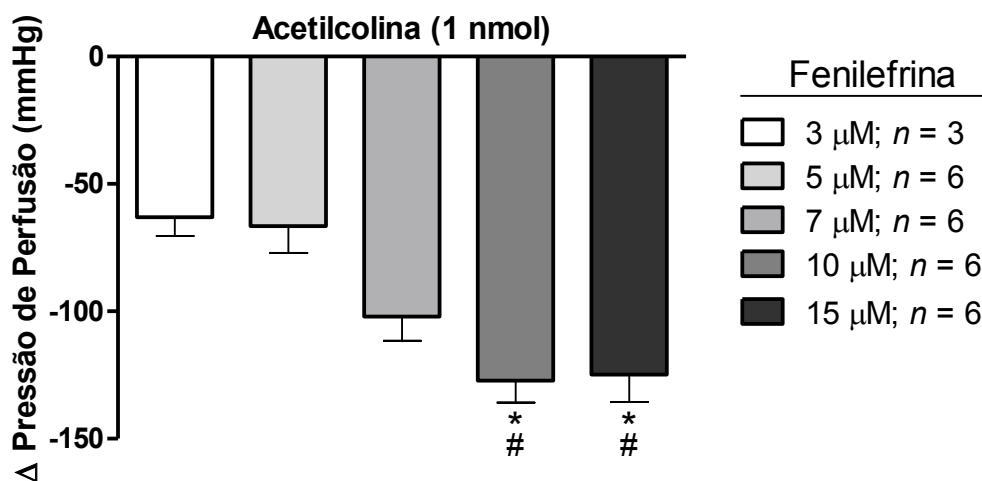
**Figura 49 – Elevação da pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratos submetida a várias concentrações de fenilefrina.** Uma concentração de adrenalina (3  $\mu$ M) foi utilizada para fins de comparação. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Apenas os grupos fenilefrina 3  $\mu$ M vs. fenilefrina 5  $\mu$ M; fenilefrina 5  $\mu$ M vs. fenilefrina 7  $\mu$ M; e fenilefrina 15  $\mu$ M vs. adrenalina 3  $\mu$ M não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si ( $p < 0,05$ ), todos os demais, quando comparados entre si, apresentaram diferença estatisticamente significante em pelo menos um ponto. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



Apenas os grupos fenilefrina 3  $\mu\text{M}$  vs. fenilefrina 5  $\mu\text{M}$ ; fenilefrina 5  $\mu\text{M}$  vs. fenilefrina 7  $\mu\text{M}$ ; e fenilefrina 15  $\mu\text{M}$  vs. adrenalina 3  $\mu\text{M}$  não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as elevações ocasionadas na pressão de perfusão dos leitos vasculares, conforme demonstrado na Figura 49.

Sobre o aumento da pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética ocasionado pela adição de diferentes concentrações de fenilefrina foi administrada uma dose de acetilcolina (1 nmol), a qual ocasionou quedas na pressão de perfusão em valores próximos a: 63 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 3  $\mu\text{M}$ ; 67 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 5  $\mu\text{M}$ ; 102 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 7  $\mu\text{M}$ ; 127 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 10  $\mu\text{M}$ ; e 125 mmHg, nos grupos que receberam fenilefrina 15  $\mu\text{M}$  (Figura 50).

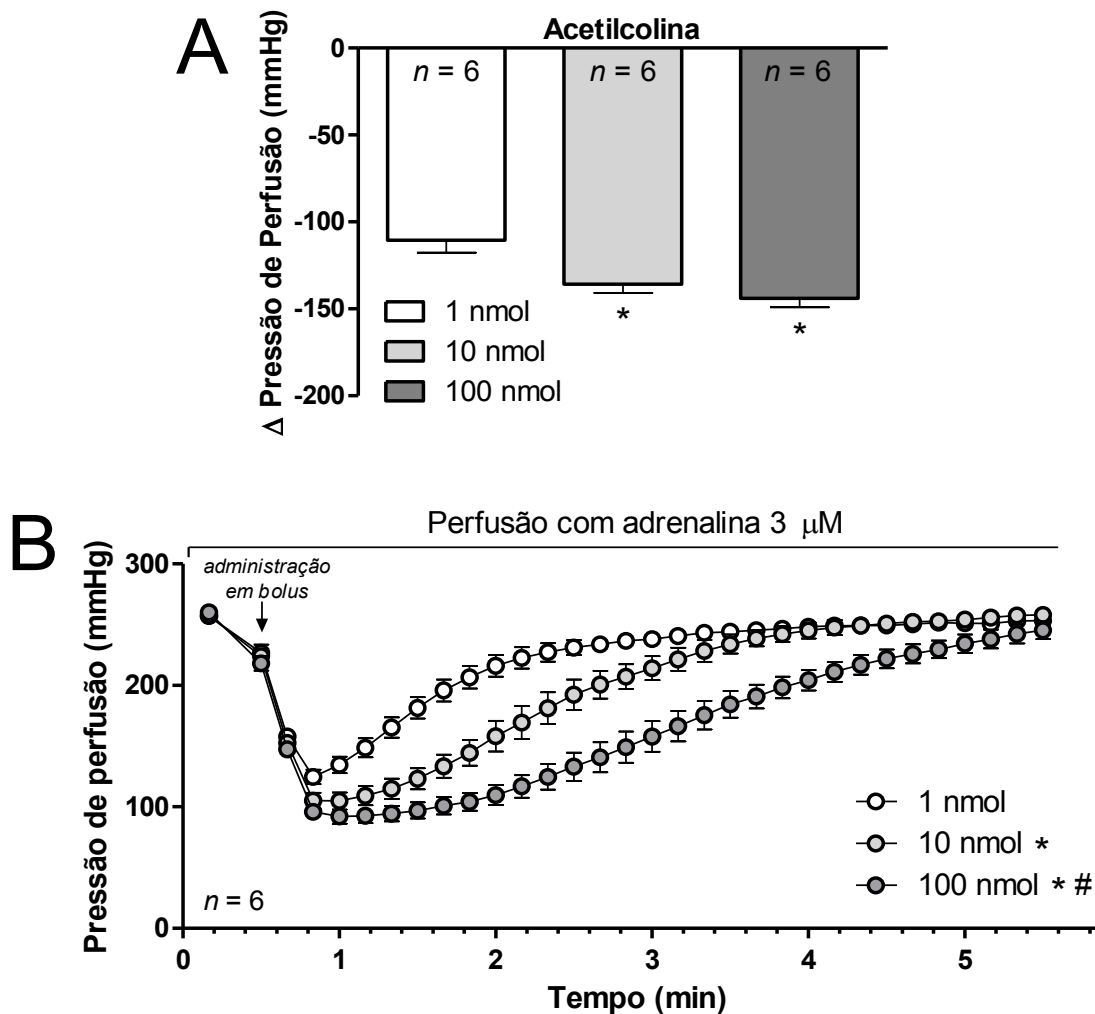
Somente os grupos que receberam a perfusão de fenilefrina nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  apresentaram, ambos, diferença estatisticamente significativa com os grupos que receberam perfusão de fenilefrina nas concentrações de 3  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , quando comparadas as quedas da pressão de perfusão ocasionadas pela dose de 1 nmol de acetilcolina, conforme observamos na Figura 50.



**Figura 50 – Delta do efeito máximo obtido com a administração de acetilcolina (1 nmol) nos leitos vasculares da musculatura esquelética de ratos submetidos a diversas concentrações de fenilefrina.** Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo fenilefrina 3  $\mu\text{M}$ . # representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo fenilefrina 5  $\mu\text{M}$ . ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

Quando realizada a curva dose resposta para acetilcolina sobre o platô ocasionado pela perfusão de adrenalina 3  $\mu\text{M}$ , observamos valores de queda na pressão de perfusão em torno de: 111 mmHg, para a dose de 1 nmol de acetilcolina; 136 mmHg, para a dose de 10 nmol de

acetilcolina; e 144 mmHg, para a dose de 100 nmol de acetilcolina. Quando analisado apenas o delta do efeito máximo, somente a dose de 1 nmol demonstrou-se diferente das demais doses, isto é, ocasionou menor queda (Figura 51A). Por sua vez, quando analisamos ponto a ponto, a cada 10 s, além de confirmarmos a diferença observada na análise anterior, também percebemos que o efeito ocasionado pela dose de 10 nmol de acetilcolina foi menor que o efeito ocasionado pela dose de 100 nmol de acetilcolina (Figura 51B).



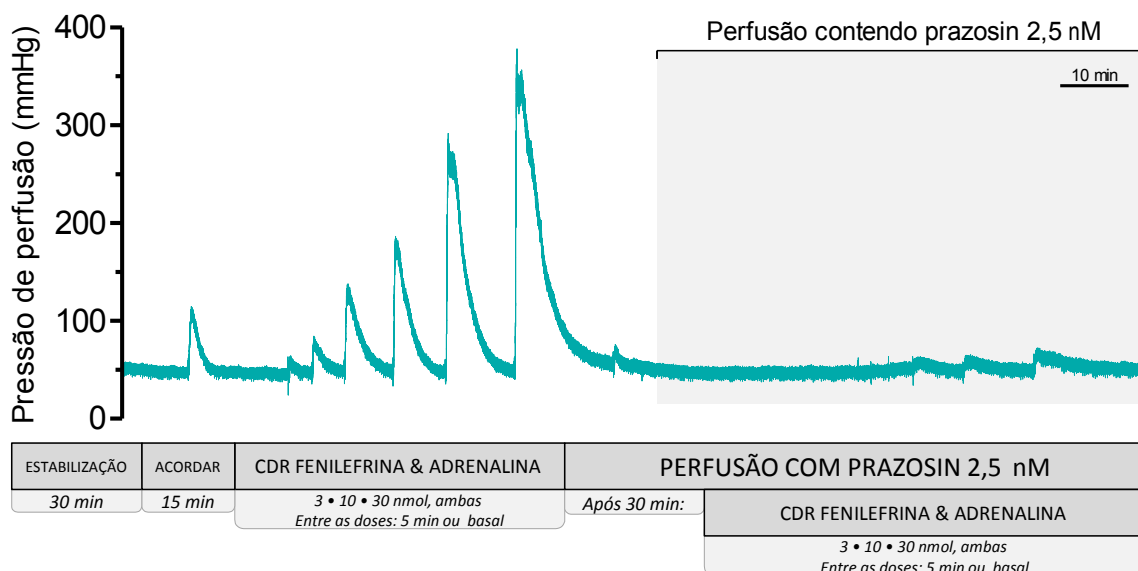
**Figura 51 – Curva dose resposta para acetilcolina realizada no leito vascular da musculatura esquelética de ratos estimulado com adrenalina (3  $\mu$ M).** Em A é demonstrado o delta e em B é apresentado a queda na pressão de perfusão a cada 10 s. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo 1 nmol. # representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo 10 nmol. Em A, ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Em B, ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

### **A.3 Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos**

A fim de caracterizarmos farmacologicamente os receptores envolvidos nas respostas evocadas pelos agonistas adrenérgicos nas preparações de leito vascular da musculatura esquelética, foram utilizados antagonistas de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos, conforme será explicitado a seguir.

#### Protocolo I: Envolvimento dos receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos nas respostas observadas para fenilefrina e adrenalina

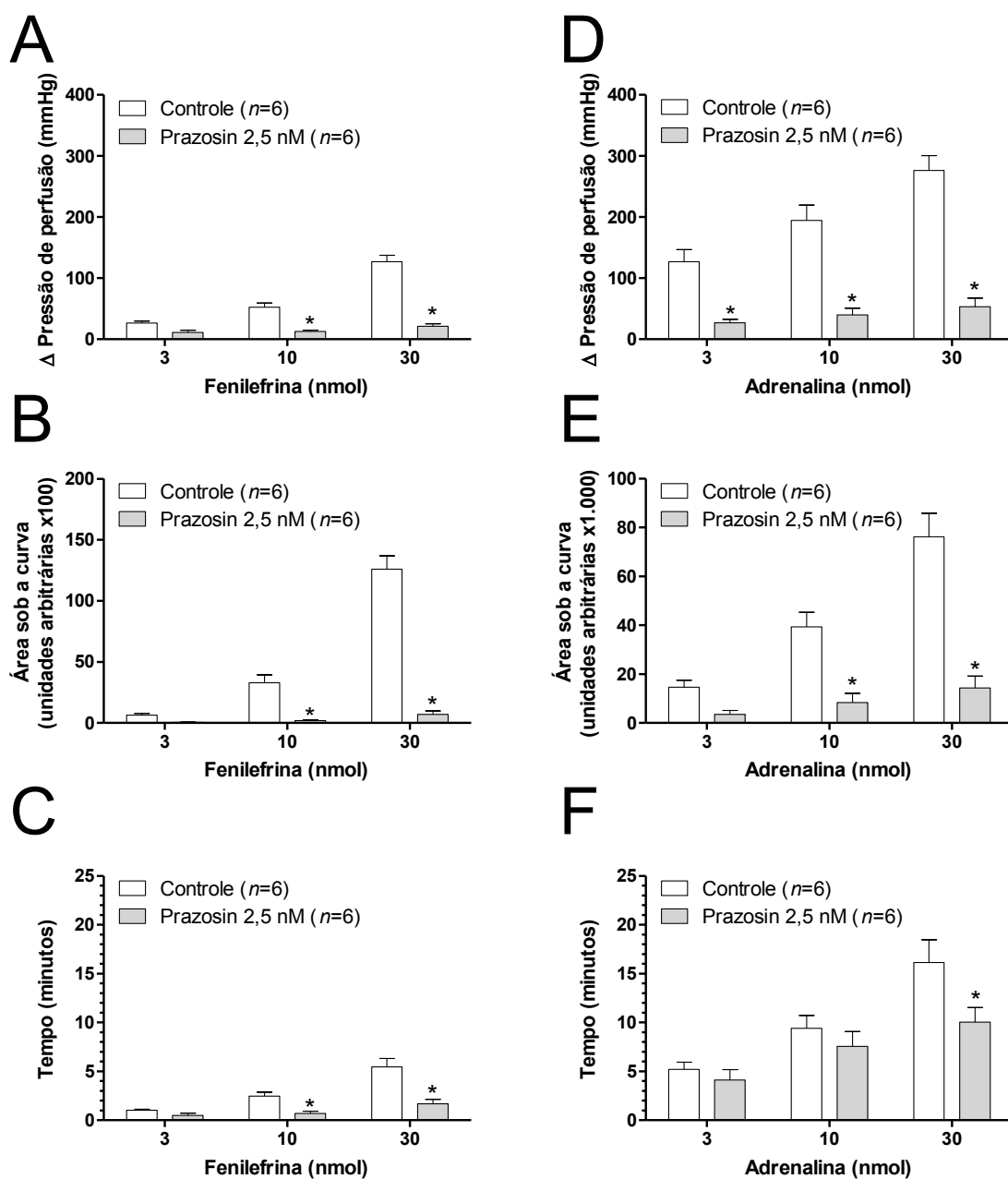
Para caracterizarmos a participação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico nas respostas evocadas pela administração de fenilefrina e adrenalina no leito vascular da musculatura esquelética foi realizada uma perfusão desses leitos com prazosin (2,5 nM). Essa concentração se mostrou efetiva em antagonizar receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos em membro posterior perfundido de ratos espontaneamente hipertensos e ratos Wistar Kyoto (YE; COLQUHOUN, 1998). O protocolo consistiu na realização de uma curva dose resposta para fenilefrina (3, 10, 30 nmol) seguida por uma curva dose resposta para adrenalina (3, 10, 30 nmol), ver Protocolo experimental 3.



**Protocolo experimental 3 – Protocolo utilizado para a avaliação da influência dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos nas respostas evocadas pela administração de fenilefrina e adrenalina em preparações de perna isolada.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), era realizada uma curva dose resposta para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol) seguida por outra curva para adrenalina (3, 10 e 30 nmol). Em seguida, o líquido de perfusão (Solução fisiológica salina) era trocado por outro de mesma composição contendo prazosin (2,5 nM). Após as preparações serem perfundidas com prazosin por 30 min, as curvas dose resposta para fenilefrina e adrenalina eram novamente realizadas. Fonte: O autor.

Logo em seguida a solução de perfusão era trocada por outra solução de perfusão de mesma composição contendo prazosin (2,5 nM). Após 30 min que as preparações eram perfundidas com prazosin, novas curvas dose resposta eram realizadas para fenilefrina e adrenalina (3, 10, 30 nmol, ambas).

Observamos que a inibição dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no leito vascular da musculatura esquelética utilizando como ferramenta farmacológica o prazosin (2,5 nM) foi capaz de inibir a resposta contrátil da fenilefrina e da adrenalina (Figura 52A e 52D).

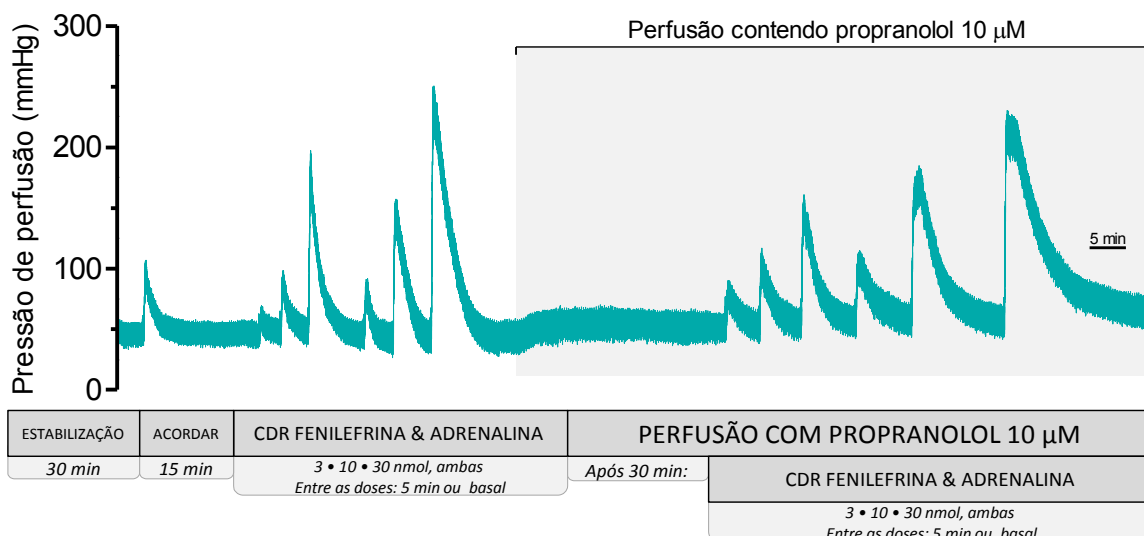


**Figura 52 – Inibição do efeito contrátil da fenilefrina e da adrenalina no leito vascular da musculatura esquelética de ratas, quando perfundido com prazosin (2,5 nM).** É apresentado o delta da elevação máxima da pressão de perfusão obtido para a administração de fenilefrina (A), assim como a área sob a curva dessa elevação (B) e o tempo de duração do efeito (C). Também é apresentado o delta da elevação máxima da pressão de perfusão obtido para a administração de adrenalina (D), assim como a área sob a curva dessa elevação (E) e o tempo de duração do efeito (F). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

Protocolo II: Influência dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas respostas observadas para fenilefrina e adrenalina

A participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas respostas evocadas pela administração de fenilefrina e adrenalina no leito vascular da musculatura esquelética foi avaliada através da realização de uma perfusão das pernas isoladas com propranolol (10  $\mu$ M). Essa concentração se mostrou efetiva em antagonizar receptores  $\beta$ -adrenérgicos em membro posterior perfundido de ratos espontaneamente hipertensos e ratos Wistar Kyoto (YE; COLQUHOUN, 1998). O protocolo consistiu na realização de uma curva dose resposta para fenilefrina (3, 10, 30 nmol) seguida por uma curva dose resposta para adrenalina (3, 10, 30 nmol).

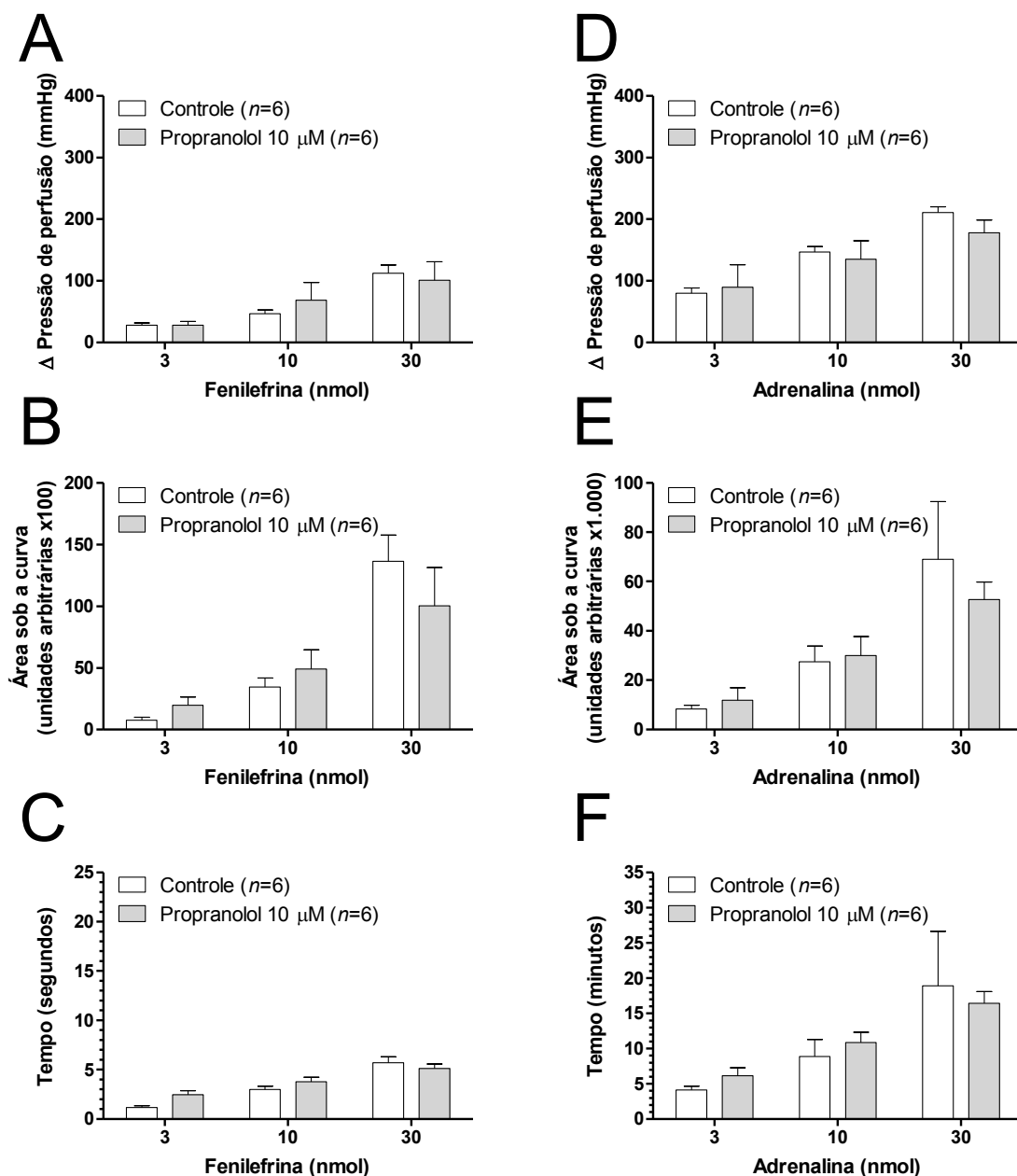
Logo em seguida a solução de perfusão foi trocada por outra solução de perfusão de mesma composição contendo propranolol (10  $\mu$ M). Após 30 min que as preparações foram perfundidas com propranolol, novas curvas dose resposta foram realizadas para fenilefrina e adrenalina (3, 10, 30 nmol, ambas), ver Protocolo experimental 4.



**Protocolo experimental 4 – Protocolo utilizado para a avaliação da influência dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas respostas evocadas pela administração de fenilefrina e adrenalina em preparações de perna isolada.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), era realizada uma curva dose resposta para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol) seguida por outra curva para adrenalina (3, 10 e 30 nmol). Em seguida, o líquido de perfusão (Solução fisiológica salina) era trocado por outro de mesma composição contendo propranolol (10  $\mu$ M). Após as preparações serem perfundidas com propranolol por 30 min, as curvas dose resposta para fenilefrina e adrenalina eram novamente realizadas. Fonte: O autor.

De forma totalmente esperada, a inibição dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no leito vascular da musculatura esquelética utilizando como ferramenta farmacológica o propranolol

(10  $\mu$ M) não inibiu as respostas contráteis evocadas pela fenilefrina e pela adrenalina (Figura 53). Isso observado tanto pelo delta da resposta máxima (Figura 53A e 53D), a área sob a curva (Figura 53B e 53E) e o tempo de duração do efeito (Figura 53C e 53F).

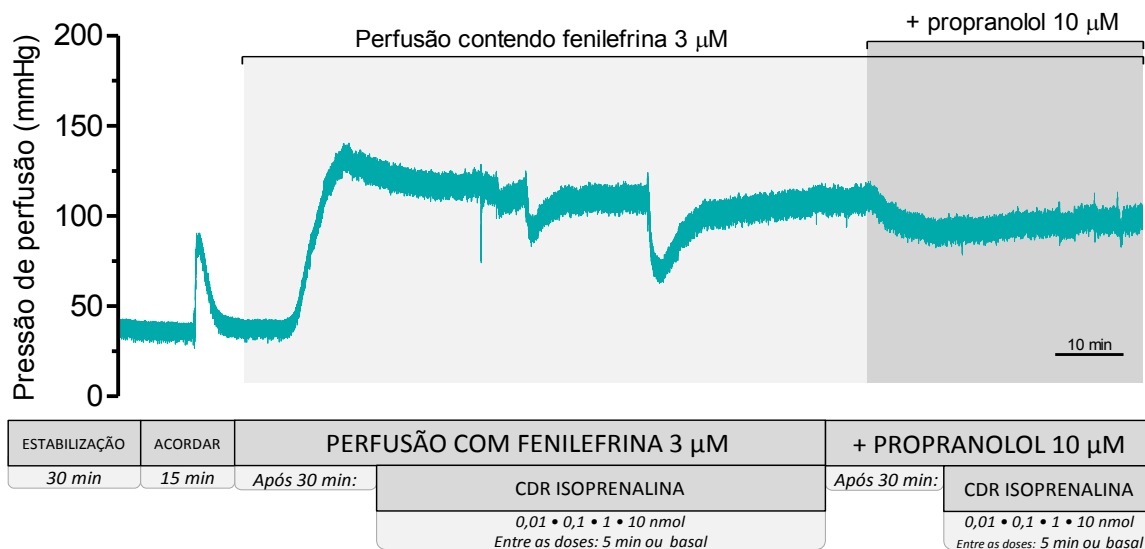


**Figura 53 – Bloqueio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos utilizando propranolol (10  $\mu$ M) não inibe os efeitos contráteis da fenilefrina e da adrenalina no leito vascular da musculatura esquelética de ratos.** É apresentado o delta da elevação máxima da pressão de perfusão obtido para a administração de fenilefrina (A), assim como a área sob a curva dessa elevação (B) e o tempo de duração do efeito (C). Também é apresentado o delta da elevação máxima da pressão de perfusão obtido para a administração de adrenalina (D), assim como a área sob a curva dessa elevação (E) e o tempo de duração do efeito (F). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas).

### Protocolo III: Influência dos receptores $\beta$ -adrenérgicos nas respostas observadas para isoprenalina

Por fim, também avaliamos a participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas respostas evocadas pela administração de isoprenalina no leito vascular da musculatura esquelética utilizando propranolol.

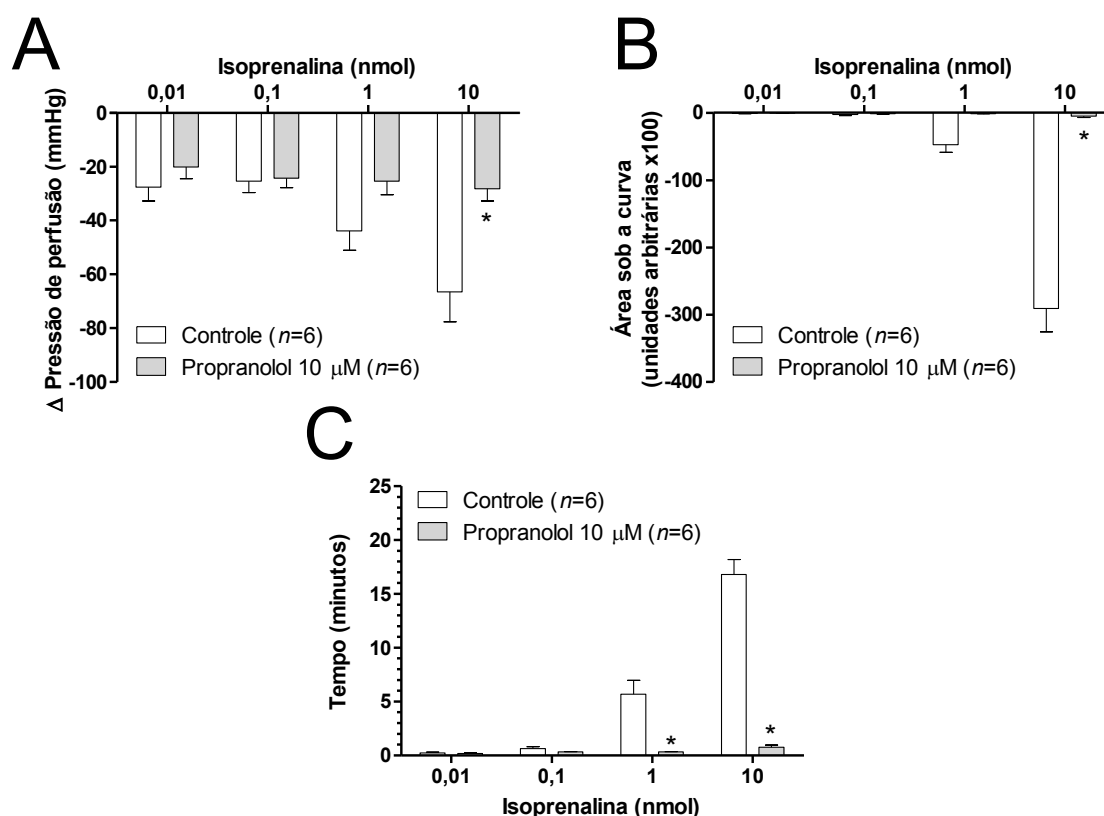
O protocolo consistiu na mudança do líquido de perfusão por um contendo fenilefrina 3  $\mu$ M. Após 30 min que este novo líquido de perfusão havia sido trocado, uma curva dose resposta para isoprenalina (0,01, 0,1, 1, 10 nmol) foi realizada. Logo em seguida, o líquido de perfusão era trocado por um contendo fenilefrina 3  $\mu$ M + propranolol 10  $\mu$ M. Novamente, após 30 min do início dessa nova perfusão, uma segunda curva dose resposta para isoprenalina era realizada utilizando as mesmas doses, conforme Protocolo experimental 5.



**Protocolo experimental 5 – Protocolo utilizado para a avaliação da influência dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos na resposta evocada pela administração de isoprenalina em preparações de perna isolada.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), o líquido de perfusão (Solução fisiológica salina) era trocado por outro de mesma composição contendo fenilefrina (3  $\mu$ M). Após 30 min da perfusão com fenilefrina era realizada uma curva dose resposta para isoprenalina (0,01, 0,1, 1 e 10 nmol). Logo em seguida o líquido de perfusão era trocado por outro contendo fenilefrina (3  $\mu$ M) + propranolol (10  $\mu$ M). Após as preparações serem perfundidas com este novo líquido de perfusão por 30 min, a curva dose resposta para isoprenalina foi realizada novamente utilizando as mesmas doses. Fonte: O autor.

A dose de propranolol (10  $\mu$ M) foi capaz de inibir o efeito vasorrelaxante da isoprenalina no leito vascular da musculatura esquelética (Figura 54).





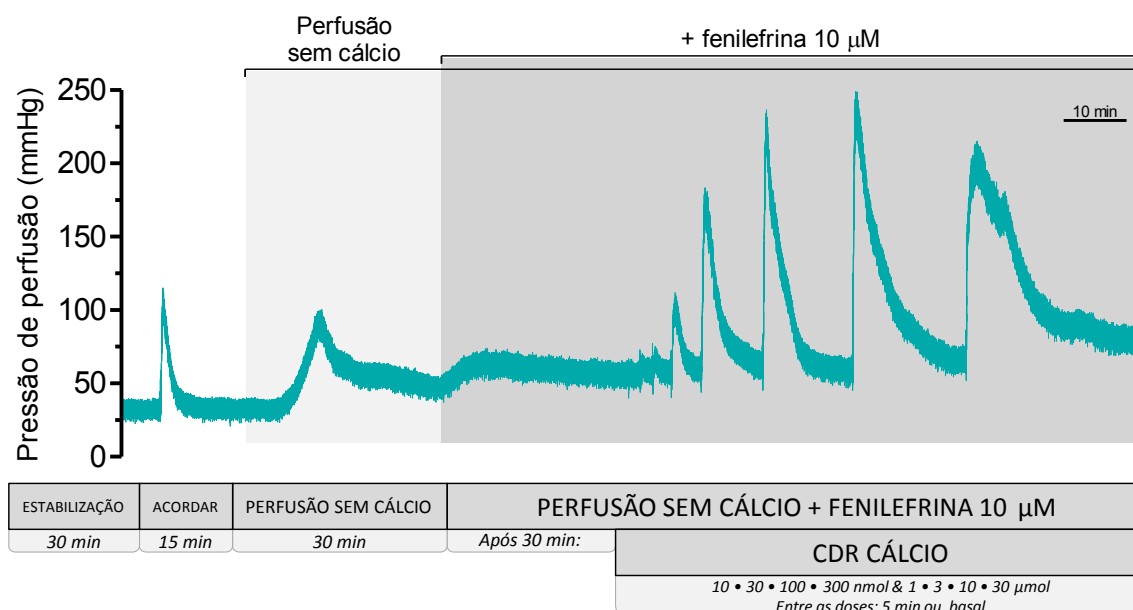
**Figura 54 – Inibição do efeito vasorrelaxante da isoprenalina no leito vascular da musculatura esquelética de ratas, quando perfundido com propranolol (10 μM).** É apresentado o delta da elevação máxima da pressão de perfusão obtido para a administração de isoprenalina (A), assim como a área sob a curva dessa elevação (B) e o tempo de duração do efeito (C). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. \* representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### A.4 Avaliação da captação de cálcio pelo leito vascular da musculatura esquelética

Para avaliarmos a exequibilidade de se estudar a captação e a mobilização de cálcio utilizando as preparações de perna isolada, dois protocolos experimentais foram padronizados. Ambos foram realizados utilizando-se soluções sem cálcio. Contudo, enquanto que no primeiro foi utilizado um agente vasoconstritor para possibilitar a realização da curva dose resposta para o cálcio, no segundo, utilizamos uma solução despolarizante.

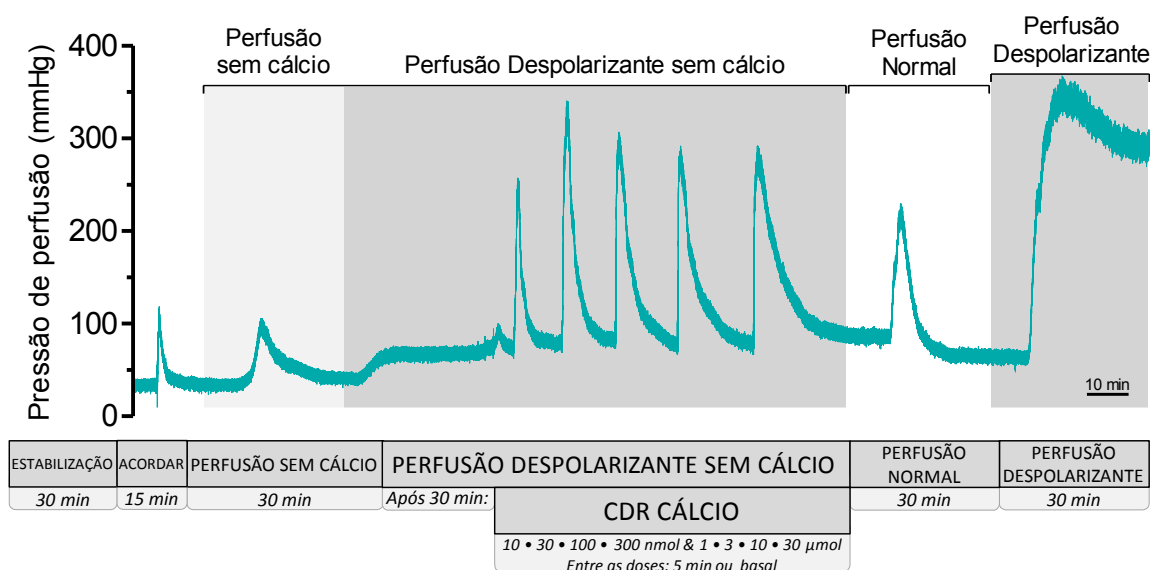
Dessa forma, o primeiro protocolo consistiu na retirada do cálcio do líquido de perfusão, e isso foi possível mediante a troca do líquido de perfusão (solução fisiológica nutritiva) por outro de mesma composição, porém sem cálcio (solução fisiológica nutritiva sem cálcio). Após 30 min do início da perfusão com a solução fisiológica nutritiva sem cálcio, novamente o líquido de perfusão era trocado, agora por uma Solução fisiológica nutritiva sem cálcio contendo fenilefrina (10 μM). Após 30 min do início dessa segunda troca, uma curva

dose resposta para o cálcio (10, 30, 100 e 300 nmol e 1, 3, 10 e 30  $\mu$ mol) era realizada, conforme observamos no Protocolo experimental 6.



**Protocolo experimental 6 – Protocolo utilizado para a avaliação da mobilização e captação de cálcio em preparações de perna isolada estimuladas com fenilefrina.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), o líquido de perfusão era substituído por outro de igual composição sem cálcio durante 30 min. Logo após esse período, novamente o líquido de perfusão era trocado por um contendo fenilefrina 10  $\mu$ M. Após 30 min do início dessa segunda perfusão, uma curva dose resposta para o cálcio (10, 30, 100 e 300 nmol e 1, 3, 10, 30  $\mu$ mol) era realizada. Fonte: O autor.

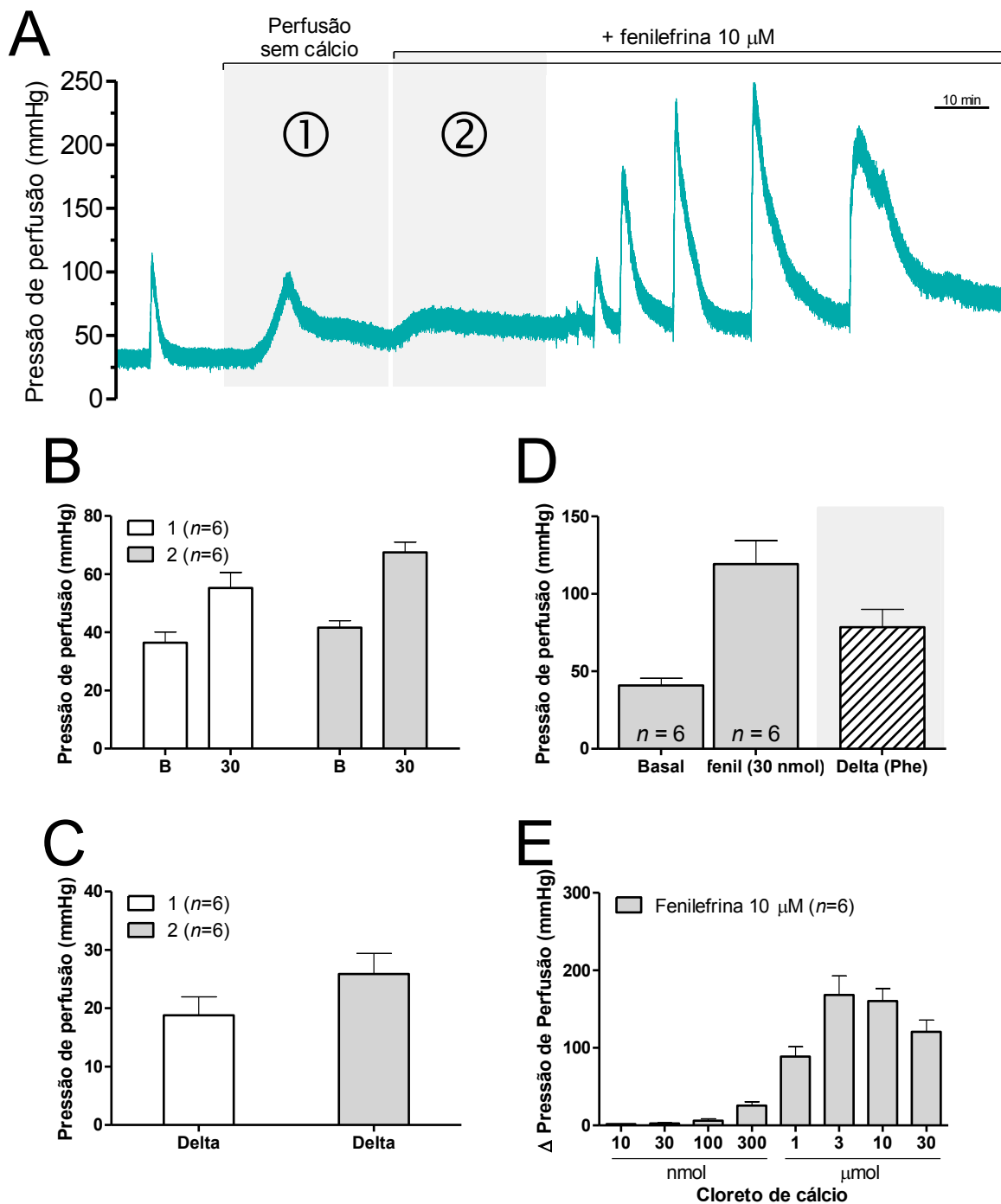
Por sua vez, o segundo protocolo consistiu na retirada do cálcio do líquido de perfusão, utilizando uma solução fisiológica nutritiva sem cálcio durante 30 min. Logo em seguida, a solução fisiológica nutritiva sem cálcio era trocada pela solução fisiológica despolarizante sem cálcio. Após 30 min do início deste último líquido de perfusão, uma curva dose resposta para o cálcio (10, 30, 100 e 300 nmol e 1, 3, 10 e 30  $\mu$ mol) era realizada. Ao finalizar a curva para o cálcio, o líquido de perfusão era trocado pela solução fisiológica nutritiva durante 30 min e logo em seguida pela solução fisiológica despolarizante, a qual também perfundiu por 30 min as preparações, conforme demonstrado no Protocolo experimental 7.



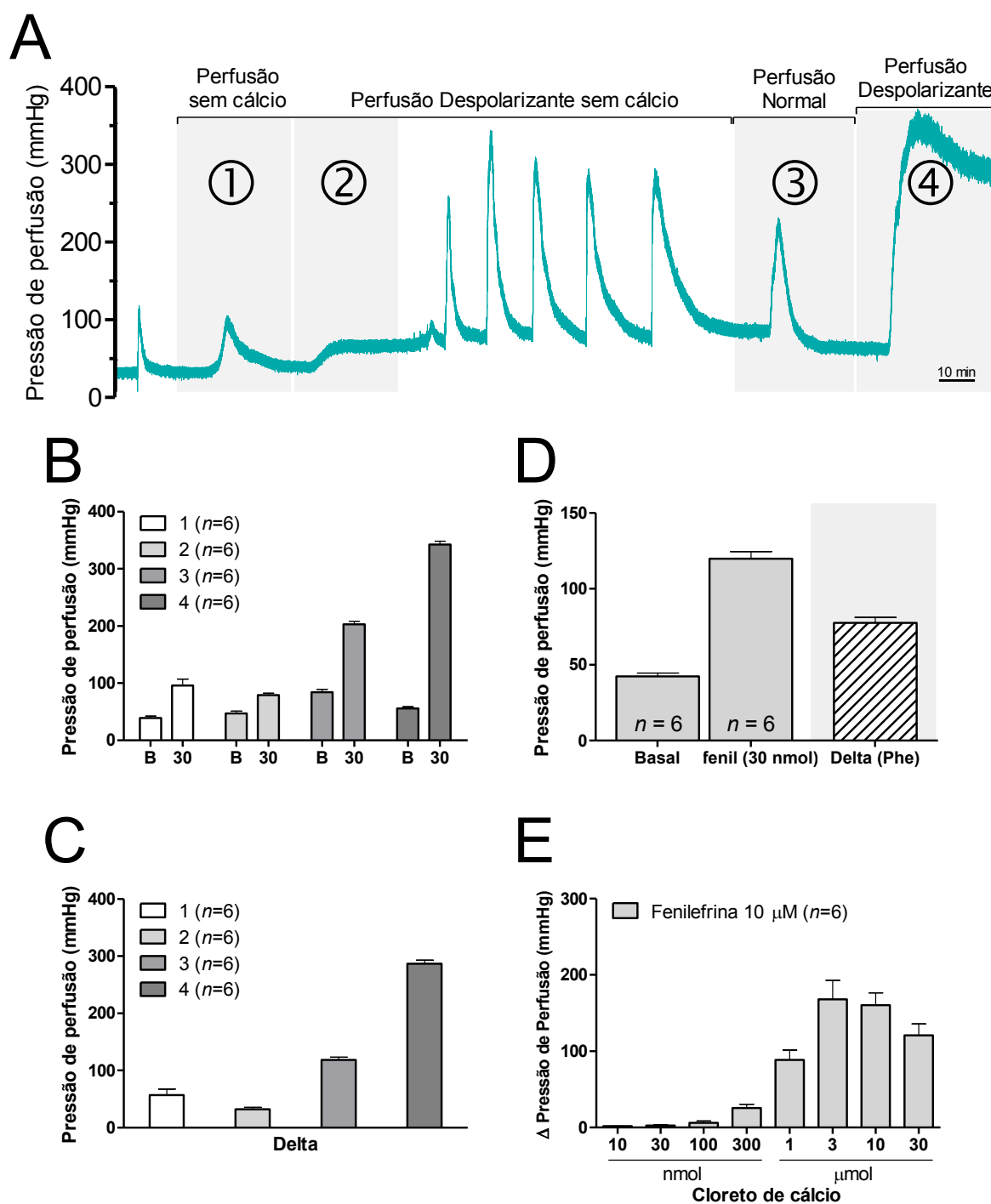
**Protocolo experimental 7 – Protocolo utilizado para a avaliação da mobilização e captação de cálcio em preparações de perna isolada estimuladas com solução despolarizante.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), o líquido de perfusão era substituído por outro de igual composição sem cálcio durante 30 min. Logo após esse período, novamente o líquido de perfusão era trocado por uma Solução fisiológica despolarizante (KCl 60 mM) sem cálcio. Após 30 min do início dessa segunda perfusão, uma curva dose resposta para o cálcio (10, 30, 100 e 300 nmol e 1, 3, 10, 30 µmol) era realizada. Imediatamente após o final da curva para o cálcio retornava-se à perfusão com Solução fisiológica nutritiva durante 30 min, sendo trocado novamente o líquido de perfusão por Solução fisiológica despolarizante (KCl 60 mM) durante 30 min. Fonte: O autor.

A realização do protocolo utilizando como estímulo para a depleção intracelular de cálcio a fenilefrina (10 µM) para viabilizar a avaliação da captação de cálcio através da realização de uma curva dose resposta para o cálcio nos permitiu observar que é possível avaliar tanto a captação quanto a mobilização de cálcio no leito vascular da musculatura esquelética (Figura 55).

De forma semelhante também observamos que a realização do mesmo protocolo, porém agora utilizando Solução fisiológica despolarizante (KCl 60 mM) sem cálcio também propicia este estudo (Figura 56).



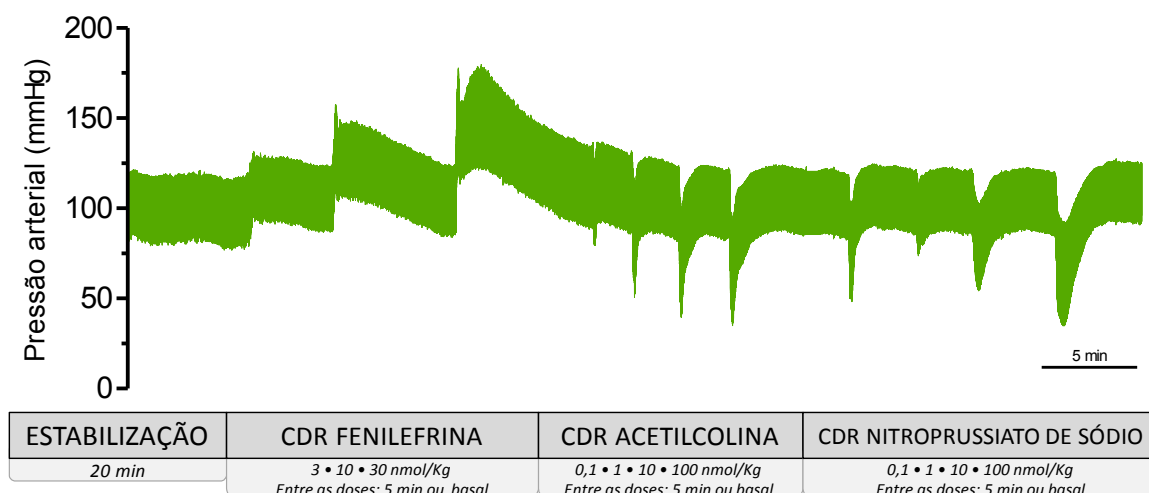
**Figura 55 – Elevações da pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas devido à depleção de cálcio extracelular e da estimulação  $\alpha_1$ -adrenérgica seguida pela realização da curva dose resposta para o cálcio.** Em ① é realizada a retirada do cálcio do meio extracelular (líquido de perfusão) durante 30 min e em ② é adicionada fenilefrina (10  $\mu$ M) à solução de perfusão para depois de realizar uma curva dose resposta para cálcio (A). Em B é apresentada a pressão de perfusão basal e o aumento máximo da pressão de perfusão durante os 30 min após a mudança no líquido de perfusão demonstrada em ① e em ②, enquanto que em C é apresentado o delta da elevação na pressão de perfusão observada em ① e em ②. Em D é apresentada a variação obtida para a administração inicial de fenilefrina (30 nmol), realizada para testar a viabilidade das preparações. Em E é apresentada a curva dose resposta obtida para o cálcio nas preparações perfundidas sem cálcio no líquido de perfusão e estimuladas com fenilefrina (10  $\mu$ M). B – Basal. 30 – 30 min após a mudança do líquido de perfusão. fenil – fenilefrina. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.



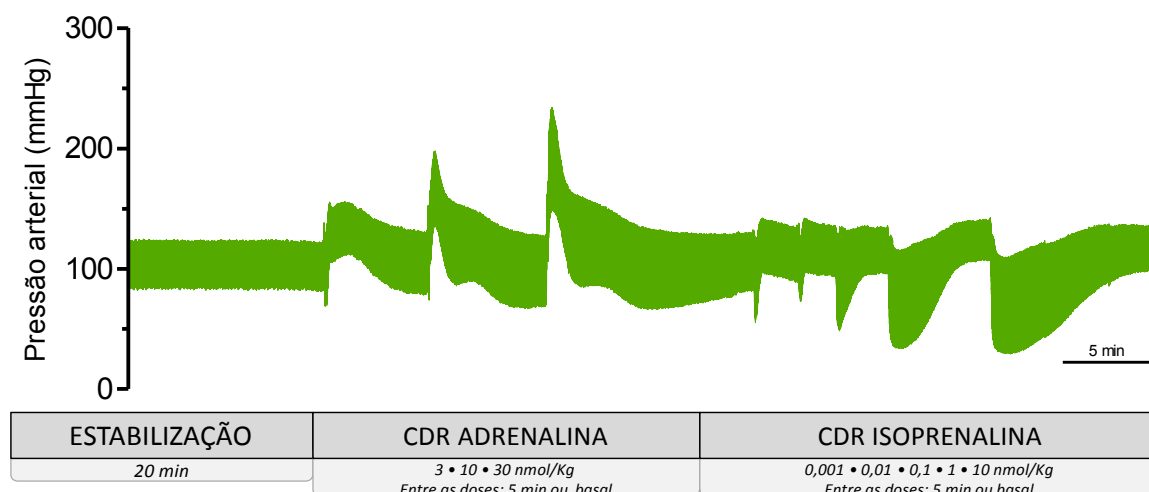
**Figura 56 – Elevações da pressão de perfusão do leito vascular da musculatura esquelética de ratas devido à depleção de cálcio extracelular e da estimulação com líquido despolarizante sem cálcio seguida pela realização da curva dose resposta para o cálcio.** Em ① é realizada a retirada do cálcio do meio extracelular (líquido de perfusão) durante 30 min, em ② o líquido de perfusão é substituído por uma Solução despolarizante (KCl 60 mM) sem cálcio para depois ser realizada uma curva dose resposta para cálcio, em ③ o líquido de perfusão normal (com cálcio) é retornado por 30 min e logo em seguida, em ④, é substituído por Solução despolarizante (KCl 60 mM) durante 30 min (A). Em B é apresentada a pressão de perfusão basal e o aumento máximo da pressão de perfusão durante os 30 min após as mudanças nos líquidos de perfusão demonstradas em ①, ②, ③ e ④, enquanto que em C é apresentada os deltas dessas variações observadas em ①, ②, ③ e ④. Em D é apresentada a variação obtida com a administração inicial de fenilefrina (30 nmol), realizada para testar a viabilidade das preparações. Em E é apresentada a curva dose resposta obtida para o cálcio nas preparações perfundidas com Solução despolarizante (60 mM) sem cálcio. B – Basal. 30 – 30 min após a mudança do líquido de perfusão. fenil – fenilefrina. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.



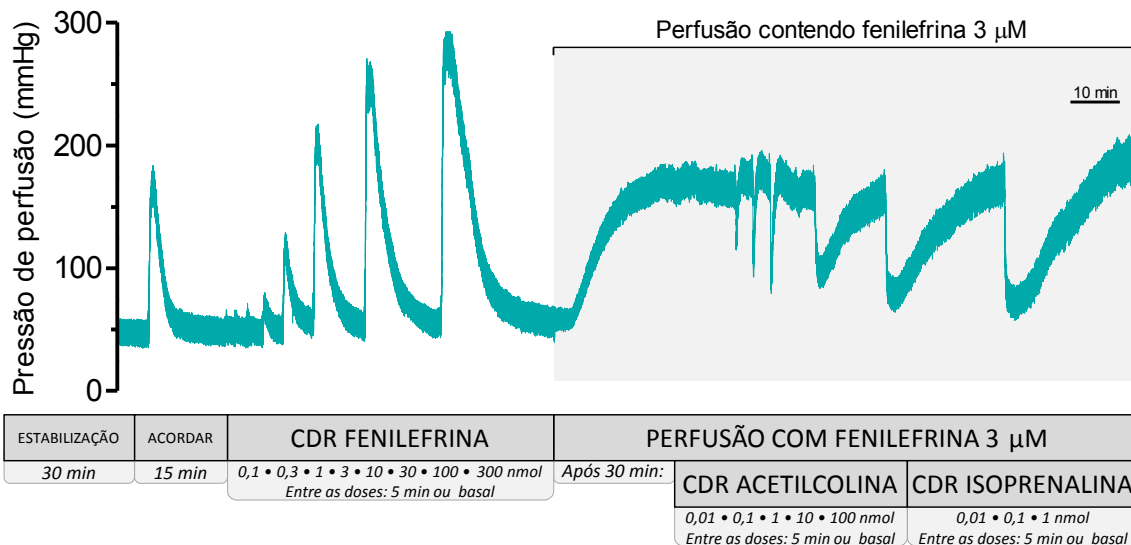
## APÊNDICE B – Registro de experimentos e seus respectivos protocolos experimentais



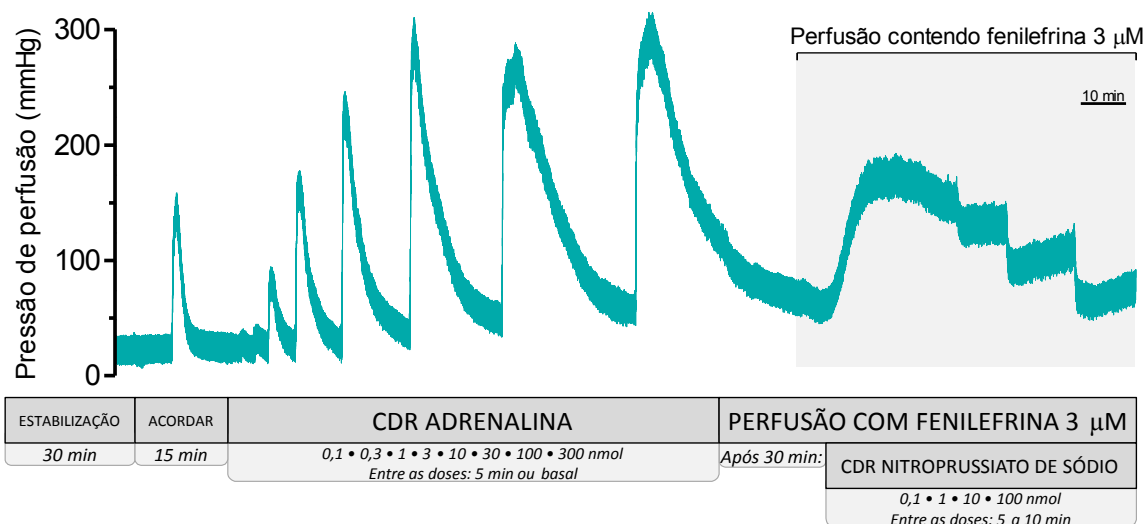
**Protocolo experimental 8 – Protocolo I utilizado para a avaliação da reatividade vascular de ratas diabéticas utilizando o método de medida direta da pressão arterial em animais anestesiados.** Após o fim dos procedimentos cirúrgicos aguardava-se um período de 20 min para dar início ao protocolo. O protocolo consistia na realização de uma curva dose resposta (CDR) para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg), seguida pela CDR para acetilcolina (0,1, 1, 10 e 100 nmol/Kg) e uma CDR para nitroprussiato de sódio (0,1, 1, 10 e 100 nmol/Kg). Fonte: O autor.



**Protocolo experimental 9 – Protocolo II utilizado para a avaliação da reatividade vascular de ratas diabéticas utilizando o método de medida direta da pressão arterial em animais anestesiados.** Após o fim dos procedimentos cirúrgicos aguardava-se um período de 20 min para dar início ao protocolo. O protocolo consistia na realização de uma curva dose resposta (CDR) para adrenalina (3, 10 e 30 nmol/Kg), seguida pela CDR para isoprenalina (0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 nmol/Kg). Fonte: O autor.

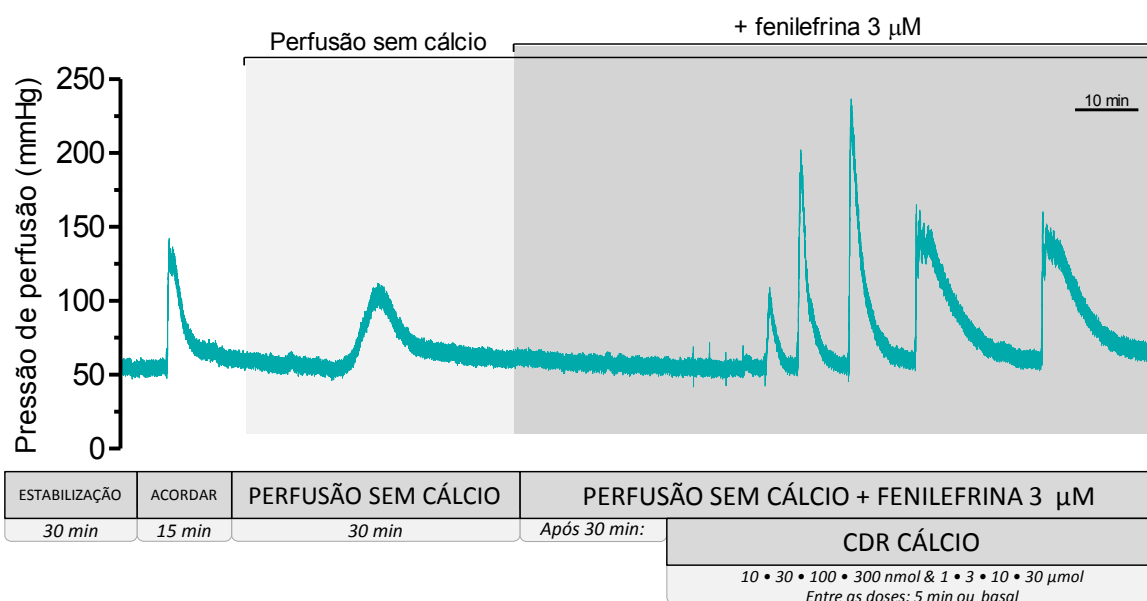


**Protocolo experimental 10 – Protocolo utilizado para a avaliação da reatividade vascular à fenilefrina, acetilcolina e isoprenalina em preparações de perna isolada de ratas diabéticas.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), uma curva dose resposta para fenilefrina era realizada (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol). Logo em seguida a Solução fisiológica nutritiva (líquido de perfusão) era substituída por Solução fisiológica nutritiva contendo fenilefrina a 3 µM. Após 30 min do início dessa perfusão com fenilefrina uma curva dose resposta para acetilcolina (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 nmol) e outra para isoprenalina (0,01, 0,1 e 1 nmol) eram realizadas. Fonte: O autor.

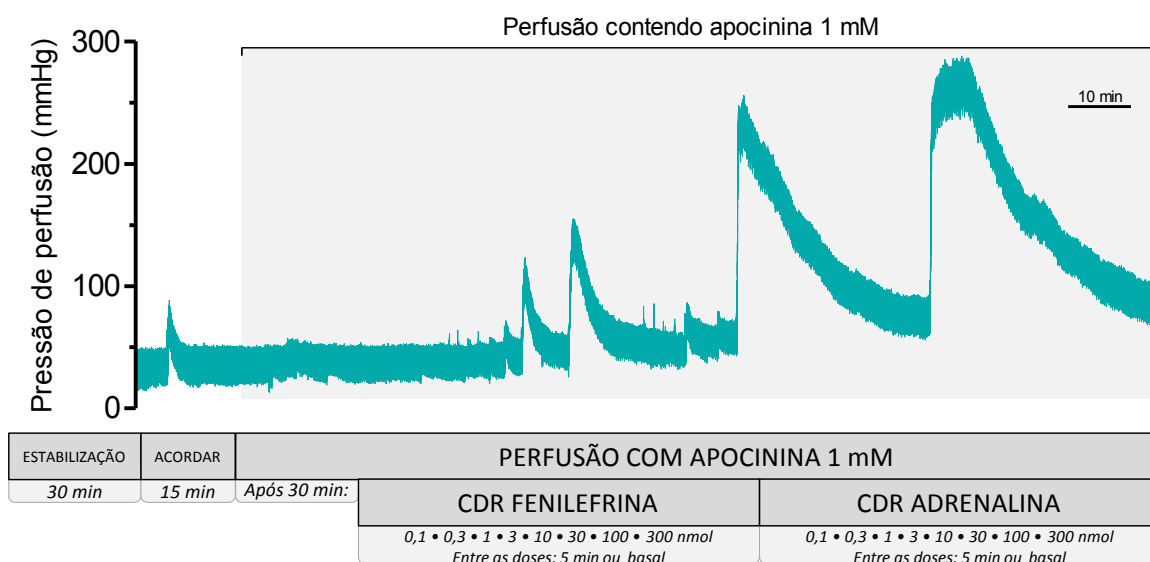


**Protocolo experimental 11 – Protocolo utilizado para a avaliação da reatividade vascular à adrenalina e nitroprussiato de sódio em preparações de perna isolada de ratas diabéticas.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), uma curva dose resposta para adrenalina era realizada (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol). Logo em seguida a Solução fisiológica nutritiva (líquido de perfusão) era substituída por Solução fisiológica nutritiva contendo fenilefrina a 3 µM. Após 30 min do início dessa perfusão com fenilefrina uma curva dose resposta para o nitroprussiato de sódio (0,1, 1, 10 e 100 nmol) era realizada. Fonte: O autor.





**Protocolo experimental 12 – Protocolo utilizado para a avaliação da mobilização e captação de cálcio em preparações de perna isolada de ratas diabéticas estimuladas com fenilefrina.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), o líquido de perfusão (Solução fisiológica nutritiva) era substituído por outro de igual composição sem cálcio durante 30 min. Logo após esse período, novamente o líquido de perfusão era trocado, agora por uma Solução fisiológica nutritiva sem cálcio contendo fenilefrina a 3 µM. Após 30 min do início dessa segunda perfusão, uma curva dose resposta para o cálcio (10, 30, 100 e 300 nmol e 1, 3, 10, 30 µmol) era realizada. Fonte: O autor.



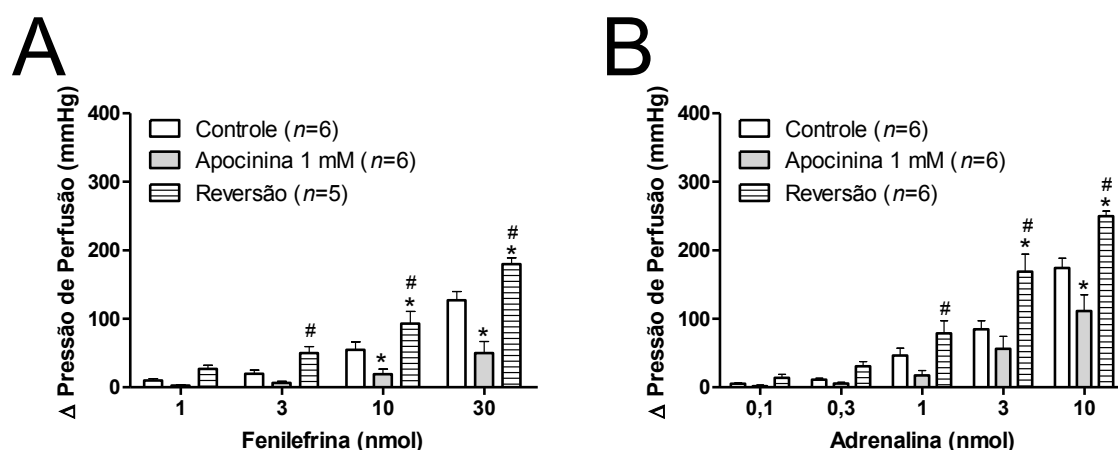
**Protocolo experimental 13 – Protocolo utilizado para a avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio na constrição evocada pela fenilefrina e adrenalina em preparações de perna isolada de ratas diabéticas.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), o líquido de perfusão (Solução fisiológica nutritiva) era trocado por uma Solução fisiológica nutritiva contendo apocinina (1 mM). Após 30 min do início da perfusão com apocinina, uma curva dose resposta para fenilefrina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) e outra para adrenalina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) eram realizadas. Fonte: O autor.



### APÊNDICE C – Avaliação de possível interferência do DMSO no efeito obtido com a perfusão com apocinina nas preparações de pernas isoladas

Para verificar se a quantidade de total de DMSO presente no líquido de perfusão (1 mL de DMSO para cada 1 L de solução de perfusão), quantidade esta utilizada para diluir a apocinina a 1 mM, teria ocasionado algum dano ao leito vascular da musculatura esquelética durante a condução dos experimentos realizados com esta droga, em metade dos experimentos, ao finalizarmos o protocolo experimental descrito no tópico 3.4.3, a perfusão com a Solução fisiológica nutritiva era retornada. E, após 30 min desse retorno, algumas doses de fenilefrina (1, 3, 10 e 30 nmol) e adrenalina (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 nmol) eram administradas novamente nas preparações de perna perfundida.

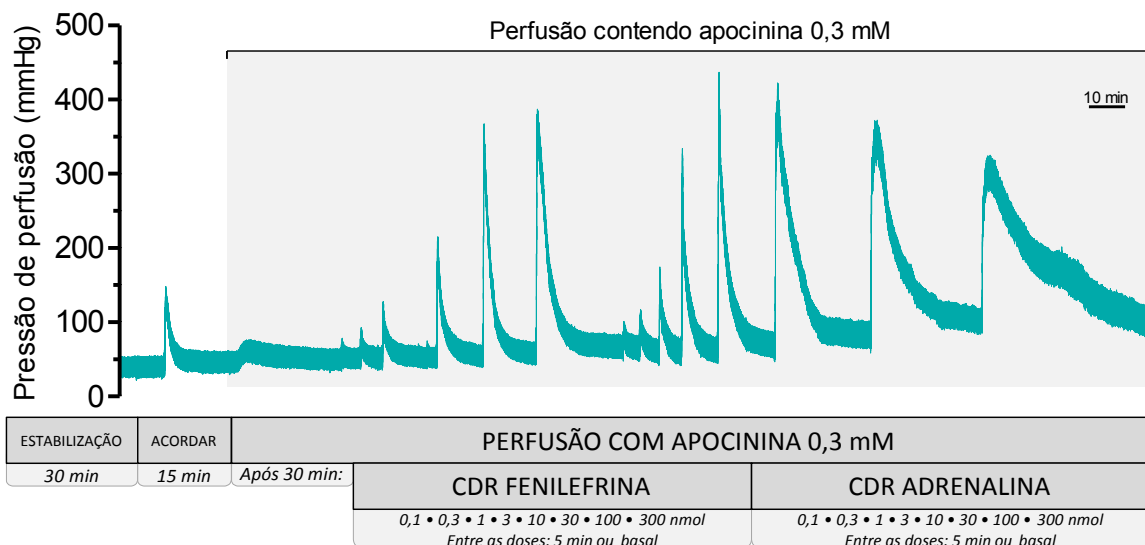
E o resultado obtido, além de demonstrar a preservação da integridade do leito vascular, nos chamou a atenção devido à obtenção de uma resposta do leito com maior responsividade aos agentes vasoconstritores fenilefrina (Figura 57A) e adrenalina (Figura 57B). Para composição desses resultados e para respeitar os 3 R, optamos por não fazer um novo *set* de experimentos com a apocinina 1 mM e utilizar os dados já disponíveis. Assim, embora demonstrado apenas os dados referentes ao grupo controle, no grupo diabético também ocorria de modo semelhante ao demonstrado abaixo.



**Figura 57 – Aumento da resposta contrátil do leito vascular da musculatura esquelética após a exposição das preparações à apocinina 1 mM.** O aumento da resposta vasoconstritora da fenilefrina no leito vascular é demonstrado em A, enquanto que o da adrenalina é demonstrado em B. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. \* representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. # representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo apocinina 1 mM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

Contudo, para melhor investigar se o DMSO (veículo utilizado para a reconstituição da droga) causava dano às preparações e se o efeito apresentado pela apocinina sobre a resposta vasoconstritora da fenilefrina e da adrenalina era dose dependente, decidimos utilizar o mesmo volume de DMSO (1 mL para cada 1 L de solução de perfusão) para diluir a apocinina na concentração de 0,3 mM que seria utilizada em outro *set* de experimentos, os quais foram realizados para demonstrar que doses menores de apocinina poderiam provocar uma menor inibição nas respostas contráteis da fenilefrina e da adrenalina no leito vascular da musculatura esquelética.

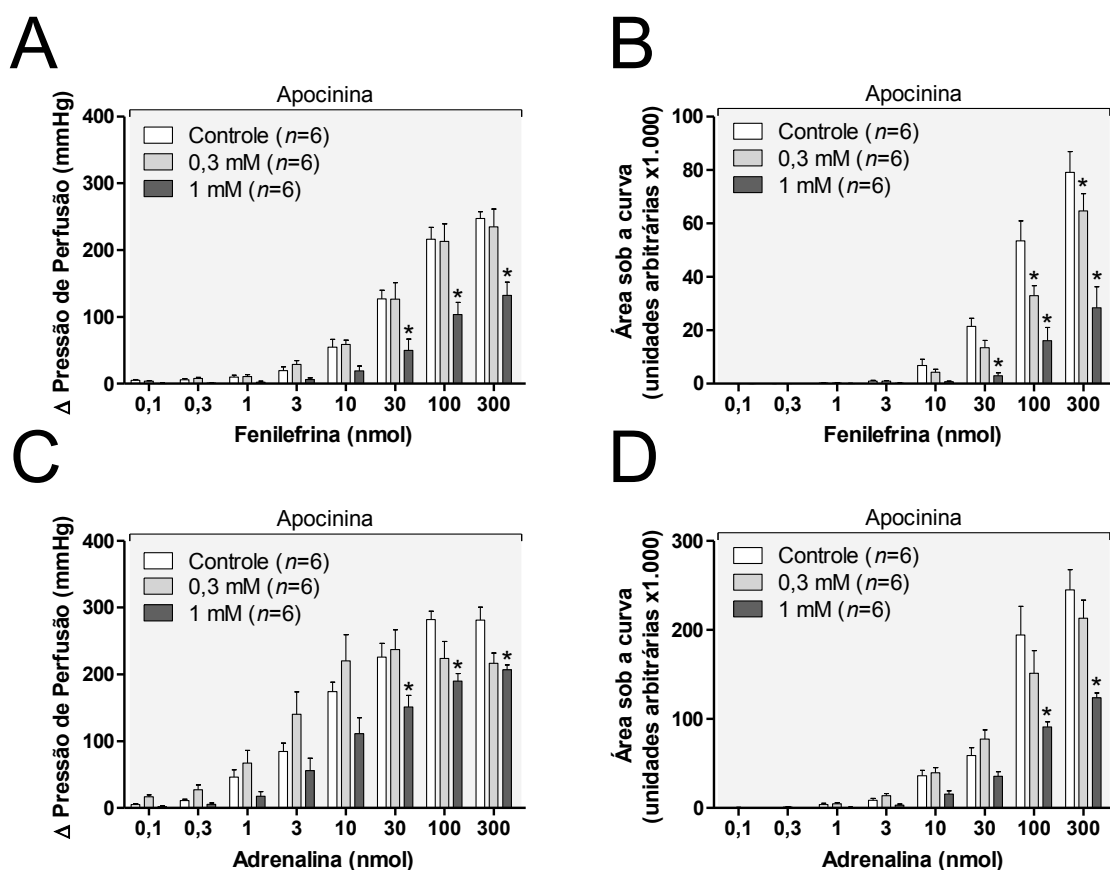
Com as preparações prontas para o início do experimento, o protocolo consistiu na realização da troca da solução fisiológica nutritiva (líquido de perfusão) por uma solução fisiológica nutritiva contendo apocinina (0,3 mM). Após 30 min do início da perfusão com apocinina (0,3 mM), uma curva dose resposta para fenilefrina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) e outra para adrenalina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) foram realizadas, conforme demonstrado no Protocolo experimental 14.



**Protocolo experimental 14 – Protocolo utilizado para a avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio na constrição evocada pela fenilefrina e adrenalina no leito vascular da musculatura esquelética.** Após as preparações serem estabilizadas e testadas as suas viabilidades com uma dose de fenilefrina (30 nmol), o líquido de perfusão era trocado por uma Solução fisiológica nutritiva contendo apocinina (0,3 mM). Após 30 min do início da perfusão com apocinina, uma curva dose resposta para fenilefrina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) e outra para adrenalina (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) eram realizadas. Fonte: O autor.

Com esse novo *set* de experimentos demonstramos que o efeito de diminuição da resposta constritora é dependente da dose e que o veículo utilizado demonstrou-se inócua para a reatividade vascular das drogas utilizadas (Figura 58).

Uma vez que aqueles experimentos com os animais diabéticos ocorreram conjuntamente com estes experimentos no quais utilizamos apocinina a 0,3 mM, decidimos reapresentar aqui também os dados obtidos nos animais controles no momento que tiveram seus leitos vasculares da musculatura esquelética perfundidos com apocinina (1 mM; ver tópico 3.4.3, Protocolo IV) para também compor o resultado desta seção e assim demonstrar que o efeito desempenhado pela apocinina nas preparações era dependente da dose e independente da quantidade de veículo utilizada. Dessa forma conseguimos reduzir o número de animais que seriam necessários para repetir os mesmos experimentos que já estavam sendo realizados.



**Figura 58 – Diminuição da resposta aos agentes vasoconstritores no leito vascular da musculatura esquelética de ratas ocasionada pela ação da perfusão com apocinina.** A diminuição da resposta vasoconstritora da fenilefrina no leito vascular é demonstrada em A e B, enquanto que da adrenalina é demonstrada em C e D. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.