SIMONE MARCIELI SARTORETTO

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA RESPOSTA VASODILATADORA E VASOCONSTRITORA EM AORTAS DE RATAS DIABÉTICAS E OS MECANISMOS ENVOLVIDOS

SIMONE MARCIELI SARTORETTO

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA RESPOSTA VASODILATADORA E VASOCONSTRITORA EM AORTAS DE RATAS DIABÉTICAS E OS MECANISMOS ENVOLVIDOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

SIMONE MARCIELI SARTORETTO

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA RESPOSTA VASODILATADORA E VASOCONSTRITORA EM AORTAS DE RATAS DIABÉTICAS E OS MECANISMOS ENVOLVIDOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Zuleica Bruno Fortes

Co-Orientadora: Dra. Eliana Hiromi Akamine

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Sartoretto, Simone Marcieli.
Estudo das alterações da resposta vasodilatadora e vasoconstritora em aortas de ratas diabéticas e os mecanismos envolvidos / Simone Marcieli Sartoretto. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Zuleica Bruno Fortes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Diabetes e reatividade vascular.

Versão do título para o inglês: Study of the alterations of the vasodilator and the vasoconstrictor responses in aortas of the diabetic female rats and the mechanisms involved.

Descritores: 1. Diabetes 2. Fêmeas 3. Reatividade vascular I. Fortes, Zuleica Bruno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0121/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Simone Marcieli Sartoretto.

Título da Dissertação: Estudo das alterações da resposta vasodilatadora e vasoconstritora em aortas de ratas diabéticas e os mecanismos envolvidos .

Orientador(a): Zuleica Bruno Fortes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

DEDICATÓRIA

À minha família:

Aos meus país, Luiz e Tânia Sartoretto, pelo inigualável apoio, dedicação e amor, que tornam a minha vida simplesmente maravilhosa e segura.

Ao meu querido irmão Juliano, o qual adimiro profundamente, por todo o seu apoio, amor e incentivo.

À pequena Tainarinha, minha querida irmã, pelo apoio, amor e companheirismo.

À Neuza, nossa segunda mãe, por todo o carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Zuleica Bruno Fortes, por ter me dado a oportunidade de fazer o mestrado, e pela orientação exemplar, que contribui muito para a minha formação.

A minha co-orientadora Dra. Eliana Hiromi Akamine, pela dedicação e paciência durante a realização deste trabalho, a qual não mediu esforços para me ensinar.

Ao meu orientador de iniciação científica Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman, meus mais sinceros agradecimentos por me ensinar os meus primeiros passos na carreira científica.

Às professoras do grupo de Hipertensão, Dra. Maria Helena C. de Carvalho, Dra. Dorothy Nigro e Dra. Rita de Cássia A. T. Passaglia, pelo apoio e estrutura dos laboratórios.

Às secretárias do departamento de Farmacologia, Selma e Julieta, pelo auxílio com os assuntos burocráticos e pela amizade.

Ao professores, funcionários e alunos do laboratório de inflamação da UEM muito obrigado pelos ensinamentos e pela amizade durante os quatro anos da minha iniciação científica.

Aos funcionários do laboratório de hipertensão: Martinha, Sônia, Ritinha, Manoel e Antônio, pela maravilhosa convivência e pelo auxílio prestado.

As minhas amigas Cida e Rosângela, muito obrigada pela ajuda não só no laboratório, mas por sempre estarem a disposição para ajudar em qualquer momento.

A Nubiazinha, uma pessoa simplesmente maravilhosa, que me acolheu desde o primeiro momento com seu carinho, e que não mede esforços para ajudar em qualquer momento. Ao Fernandinho, pela amizade e apoio. A este casal maravilhoso muitíssimo obrigado.

À Priscila e Renata, minhas amigas de casa, muito obrigada por estes dois anos de convivência.

As minhas queridas amigas, Karla, Suelen e Alessandra pelos maravilhosos momentos.

A minha amiga Graziela, muito obrigada por ter me acolhido em sua casa e pela ajuda e contribuição durante a realização deste trabalho.

A minha querida amiga Gisele, pelo companheirismo e otimismo constante.

A minha amiga Luciana, muito obrigada pelo seu carinho, atenção e amizade que foram essenciais para aliviar momentos difíceis.

A amiga Eveline que com seu jeito carinhoso e divertido alegra o nosso dia-dia.

A minha grande amiga e irmã Aline, pelo carinho, amizade e companheirismo o qual foi essencial durante a faculdade.

Ao meu grande amigo Gustavo, um dos grandes responsáveis pela minha vinda à São Paulo.

A minha querida madrinha Maíra, pelo carinho, amizade e pelos vários conselhos.

Aos meus grandes amigos de laboratório: Andréia, André, Beatriz, Graziela e Thiago, que tornam o dia no laboratório maravilhoso, e que a amizade e ajuda foram essenciais para a realização deste trabalho.

Muito obrigada aos amigos do laboratório de fisiologia: professora Luciana, Ana Paula, Camila, Gisele, Elane e Hildebrando, pela amizade e pelas técnicas que aprendi.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

RESUMO

SARTORETTO, S.M. **Estudo das alterações da resposta vasodilatadora e vasoconstritora em aortas de ratas diabéticas e os mecanismos envolvidos.** 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neste estudo avaliamos a resposta vasodilatadora e vasoconstritora de aortas de ratas diabéticas e os mecanismos envolvidos nas alterações encontradas. Trinta dias após a indução do diabetes, a resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio não diferiu entre animais controles e diabéticas. Em aortas de ratas diabéticas, a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio em resposta a agentes vasodilatadores ou a resposta do músculo liso ao NO não estão alterados. A inibição da síntese de óxido nitrico (NO) reduziu a resposta máxima (Rmáx) à acetilcolina de modo semelhante nos dois grupos, portanto a participação do NO deve ser semelhante. Em anéis de aorta com endotélio (E+) de ratas diabéticas, a Rmáx ao KCl foi reduzida, enquanto a resposta vasoconstritora à noradrenalina foi semelhante à de ratas controles. A retirada do endotélio (E-) potencializou a resposta vasoconstritora aos dois agentes, porém essa potencialização foi de menor magnitude em ratas diabéticas. Estes resultados mostram que aortas de ratas diabéticas apresentam alterações no aparato contrátil e o endotélio destes animais é capaz de manter a resposta à noradrenalina semelhante à de controles. A Rmáx à noradrenalina em aortas E+: não foi alterada após o seqüestro de ânion superóxido ou inibição da síntese de NO nas ratas diabéticas, enquanto que nas controles esta resposta foi reduzida e aumentada, respectivamente; foi reduzida de maneira semelhante com a inibição das ciclo-oxigenases ou bloqueio dos receptores para angiotensina II e foi reduzida apenas nas ratas diabéticas após o bloqueio dos receptores para endotelina. Assim, a redução da modulação do NO sobre a resposta à noradrenalina ou o aumento da liberação de endotelina podem ser os responsáveis pela manutenção da resposta contrátil à noradrenalina em aortas com endotélio de ratas diabéticas. Diferentemente, o ânion superóxido, a angiotensina II e os produtos da ciclo-oxigenase não parecem ser os responsáveis pela manutenção da resposta contrátil. Aorta de ratas diabéticas E+ e E- apresentaram menor participação tanto do Ca^{2+}

intracelular quanto do extracelular na resposta à noradrenalina, quando comparadas com as ratas controles. O bloqueio dos canais para Ca^{2+} reduziu a Rmáx à noradrenalina em aortas tanto de ratas controles quanto de ratas diabéticas, sendo que em ratas diabéticas a redução desta resposta foi menor. A espessura da parede das aortas de ratas diabéticas esta reduzida quando comparadas com a de controles. Nossos resultados mostram que as alterações no aparato contrátil podem ser decorrentes da menor mobilização do cálcio extracelular na resposta à noradrenalina em aortas de ratas diabéticas. A redução da espessura da parede da aorta pode ser indicativo de redução da camada de músculo liso e pode ser outro fator responsável pela redução da resposta contrátil em ratas diabéticas. A inibição da proteína cinase C (PKC) reduziu a Rmáx à noradrenalina em aorta E+ de ratas diabéticas e em aorta E- de ratas diabéticas e controles, indicando que a manutenção da resposta contrátil à noradrenalina pelo endotélio de ratas diabéticas também parece ser dependente da PKC.

Palavras–Chaves: Diabetes, Fêmeas, Reatividade Vascular.

ABSTRACT

SARTORETTO, S.M. **Study of the alterations of the vasodilator and the vasoconstrictor responses in aortas of the diabetic female rats and the mechanisms involved.** 2009. 119 f. Master thesis (Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In the present study, we evaluated the vasodilator and vasoconstrictor responses of isolated aortas from diabetic female rats and the mechanisms involved in the alterations. Thirty days after induction of diabetes the endothelium-dependent and independent vasodilation was similar between diabetics and controls. In aortas of diabetic female rats the release of endothelium-derived relaxing factor in response to vasodilator agents or the response of smooth muscle to NO did not differ from the control ones. The reduction of the maximum response (Rmax) to acetylcholine after nitric oxide (NO) synthesis inhibition was of the same magnitude in both groups, therefore the participation of NO should be similar. The vasoconstrictor responses to potassium chloride (KCl) and to noradrenaline were reduced in aortas without endothelium (E-) of the diabetic female rats, whereas in rings with endothelium (E+) reduced Rmax to KCl and no alteration of noradrenaline response were found. These results suggest that there are alterations of contractile apparatus and that the endothelium is capable of keeping the vasoconstrictor response to noradrenaline similar to controls, probably releasing a contractile factor. In aortas E+, the Rmax to noradrenaline was not altered by superoxide anion scavenger or NO synthesis inhibition in diabetic female rats, whereas in controls this response is reduced or increased, respectively. Reduction of Rmax to noradrenaline induced by the cyclooxygenase inhibition or the angiotensin II receptor blockade was not different between the groups whereas after endothelin receptor blockade the response was reduced only in diabetic female rats. The reduction of NO modulation upon the response to noradrenaline or the increased release of the endothelin can be the responsible for the maintenance of the contractile response to noradrenaline in E+ aortas of diabetic female rats. The superoxide anion, the angiotensin II and the cyclooxygenase products seem not to be involved in the phenomenon. In aortas E+ and E- of diabetic female rats the contribution of intracellular and extracellular calcium in the response to noradrenaline is reduced. The calcium channel blockade

reduced the Rmax to noradrenaline in aortas of diabetic and control female rats, however in diabetic rats the reduction was of a lower magnitude. The wall thickness of the aortas from diabetic female rats was reduced when compared with controls. Our results show that alterations in the contractile apparatus may be the result of a lower mobilization of extracellular calcium in response to noradrenaline in aortas of diabetic female rats. The reduction of the wall thickness of the aortas may indicate reduction of layer of smooth muscle and can be another factor responsible by reduction of the contractile response in diabetic female rats. Since the protein kinase C (PKC) inhibition reduced the Rmax to noradrenaline in aortas E+ of the diabetic female rats and in aortas E- of the diabetic and controls female rats, the maintenance of the contractile response to noradrenaline by the endothelium of the diabetic female rats may be dependent on PKC activity.

Key words: Diabetes, Female, Vascular Reactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do registro típico do estudo da participação do cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina..... 37

Figura 2. Representação esquemática da medida da espessura da parede em aortas de ratas controle e diabética.....39

Figura 3. Curva concentração-efeito e resposta máxima para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....42

Figura 4. Curva concentração-efeito e resposta máxima para histamina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....44

Figura 5. Curva concentração-efeito e resposta máxima para acetilcolina na presença de L-NAME em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....46

Figura 6. Curva concentração-efeito e resposta máxima para nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....49

Figura 7. Curva concentração-efeito e resposta máxima para nitroprussiato de sódio em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....50

Figura 8. Curva concentração-efeito e resposta máxima para cloreto de potássio em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....53

Figura 9. Curva concentração-efeito e resposta máxima para cloreto de potássio em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....54

Figura 10. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....57

Figura 11. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....58

Figura 12. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de L-NAME em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....60

Figura 13. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de superóxido dismutase em anéis de aorta com endotélio de ratas controles.....63

Figura 14. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de superóxido dismutase em anéis de aorta com endotélio de ratas diabéticas.....65

Figura 15. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de indometacina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....68

Figura 16. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de NS-398 em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....70

Figura 17. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de losartan em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....72

Figura 18. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de tezosentan em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....74

Figura 19. Gráfico representando a contração à noradrenalina induzida pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabéticas..... 77

Figura 20. Gráfico representando a contração à noradrenalina induzida pelo influxo de cálcio em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabéticas..... 78

Figura 21. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de nifedipina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....80

Figura 22. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de calphostin C em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....83

Figura 23. Curva concentração-efeito e resposta máxima para noradrenalina na presença de calphostin C em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....85

Figura 24. Gráfico representando a morfometria de anéis de aorta de ratas controles e diabéticas.....87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros biológicos de ratas controles e diabéticas.....40

Tabela 2. Peso do útero total e seco de ratas controles e diabéticas.....41

Tabela 3. Concentração de progesterona e estradiol de ratas controles e diabéticas.....41

Tabela 4. Valores da resposta máxima e sensibilidade à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....43

Tabela 5. Valores da resposta máxima e sensibilidade à histamina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....45

Tabela 6. Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME sobre a resposta máxima à acetilcolina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....47

Tabela 7. Valores da resposta máxima e sensibilidade ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....51

Tabela 8. Valores da resposta máxima ao cloreto de potássio em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....55

Tabela 9. Valores da resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....59

Tabela 10. Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....61

Tabela 11. Efeito da incubação dos anéis de aorta com superóxido dismutase sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles.....64

Tabela 12. Efeito da incubação dos anéis de aorta com superóxido dismutase sobre a resposta máxima e sensibilidade à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas diabéticas.....66

Tabela 13. Efeito do bloqueio da enzima ciclo-oxigenase com indometacina sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....69

Tabela 14. Efeito do bloqueio da enzima ciclo-oxigenase 2 com NS-398 sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....71

Tabela 15. Efeito do bloqueio dos receptores de Angiotensina com losartan sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....73

Tabela 16. Efeito do bloqueio dos receptores de endotelina com Tezosentan sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....75

Tabela 17. Mobilização de cálcio na resposta contrátil induzida pela noradrenalina em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....79

Tabela 18. Efeito do bloqueio dos canais para cálcio dependente de voltagem com nifedipina sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....81

Tabela 19. Efeito do bloqueio da enzima PKC com Calphostin C sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.....84

Tabela 20 – Efeito do bloqueio da enzima PKC com Calphostin C sobre a resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles e diabéticas.....86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....24

2 MATERIAIS E MÉTODOS...... 31

2.1 Animais.....31

2.2 Indução do diabetes experimental tipo 1.....31

2.3 Caracterização das ratas diabéticas.....31

2.3.1 Determinação da glicemia.....31

2.3.2 Dosagem de insulina.....32

2.3.3 Ganho de peso corporal.....32

2.3.4 Consumo de água e ração.....32

2.3.5 Volume urinário e uroanálise.....32

2.4 Estudo do ciclo estral.....32

2.5 Peso do útero e dosagem hormonal.....33

2.6 Estudo *in vitro* da reatividade de anéis de aorta torácica isolada.....33

2.6.1 Avaliação da resposta vasodilatadora à Acetilcolina, Histamina e Nitroprussiato de sódio.....34

2.6.2 Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico (NO) sobre a resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina.....34

2.6.3 Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl).....35

2.6.4 Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina.....35

2.6.5 Efeito do bloqueio da síntese de NO, da produção de ânion superóxido, ciclo-oxigenase, dos receptores para angiotensina II e dos receptores para endotelina sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina.....35

2.6.6 Análise do papel do cálcio intracelular e extracelular na resposta

vasoconstritora à noradrenalina.....36

2.6.7 Efeito do bloqueio dos canais para cálcio voltagem dependente tipo L sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina.....37

2.6.8 Efeito do bloqueio da proteína cinase C (PKC) sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina.....38

2.7 Morfometria da aorta torácica.....38

2.7.1 Coloração com hematoxilina-eosina.....38

2.7.2 Medida da espessura da parede.....39

2.8 Análise estatística.....39

2.9 Drogas utilizadas.....39

3 RESULTADOS.....40

3.1 Caracterização de ratas diabéticas.....40

3.1.1 Parâmetros biológicos.....40

3.1.2 Peso do útero e dosagem hormonal.....41

3.2 Avaliação da Resposta Vasodilatadora.....42

3.2.1 Resposta Vasodilatadora à Acetilcolina.....42

3.2.2 Resposta Vasodilatadora à Histamina.....44

3.2.3 Participação do Óxido Nítrico na Modulação da Resposta Vasodilatadora à Acetilcolina.....46

3.2.4 Resposta Vasodilatadora ao Nitroprussiato de Sódio.....48

3.3 Avaliação da Resposta Vasoconstritora.....52

3.3.1 Resposta Vasoconstritora ao Cloreto de Potássio.....52

3.3.2 Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....56

3.3.2.1 Participação do Óxido Nítrico na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....60

3.3.2.2 Participação do Ânion Superóxido na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....62

3.3.2.3 Participação dos Produtos da Ciclo-oxigenase na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....67

3.3.2.4 Participação da Angiotensina II na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....72

3.3.2.5 Participação da Endotelina na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....74

3.3.2.6 Participação da Mobilização de Cálcio na Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....76

3.3.2.7 Participação dos Canais para Cálcio Dependente de Voltagem Tipo L na Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....80

3.3.2.8 Participação da PKC na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina.....82

3.4 Morfologia da parede do vaso.....87

4 DISCUSSÃO.....88

5 CONCLUSÕES.....101

6 REFERÊNCIAS.....102

1 INTRODUÇÃO

O diabetes é uma desordem metabólica de etiologias múltiplas, caracterizada pela hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gordura e proteínas, resultado de um defeito da secreção ou ação da insulina nos tecidos. O diabetes tipo 1 é caracterizado pela ausência completa da produção endógena de insulina. Já no diabetes tipo 2, o aumento da glicose sanguínea resulta de uma combinação de fatores genéticos, dieta inadequada, falta de exercício físico e um aumento de peso, resultando em um processo fisiopatológico complexo (RYDÉN et al., 2007).

A Federação Internacional do Diabetes estima que 246 milhões de pessoas no mundo têm diabetes. A estimativa é que no ano 2025 esse número chegue a 380 milhões. O diabetes é responsável por 6% da mortalidade global, sendo que 50% das mortes associadas ao diabetes são atribuídas às doenças cardiovasculares (HORTON, 2008).

Doenças microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (cardíacas, cerebrovasculares e vasculares periféricas) são freqüentemente as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes tipo 1 e 2. Um fator crítico no desenvolvimento das doenças vasculares no diabético parece ser a perda da função do endotélio.

A perda da função do endotélio é refletida em redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e também um aumento da resposta vasoconstritora nos vasos.

De fato, redução da vasodilatação dependente do endotélio foi descrita na aorta (TESFAMARIAM et al., 1989; TESFAMARIAM et al., 1993; HATTORI et al., 1991; CAMERON e COTTER, 1992; PIEPER e PELTIER, 1995; NASSAR et al., 2002; SCHÄFER et al., 2008), no leito vascular mesentérico *in vitro* (HEYGATE et al., 1995; LINDSAY et al., 1997; KEEGAN et al., 2000; PANNIRSELVAM et al., 2002) e *in vivo* (FORTES et al., 1983a, b, 1984, 1989; AKAMINE et al., 2003) de animais diabéticos induzido experimentalmente. Esta alteração também foi demonstrada no corpo cavernoso de homens (SAENZ DE TEJADA et al., 1989) e de ratos (KEEGAN et al., 2000) diabéticos e na artéria braquial de homens diabéticos (KIM et al., 2003). Além disso, aumento da resposta contrátil foi descrita na aorta e em artérias mesentéricas *in vitro* (MACLEOD, 1985; HARRIS e

MACLEOD, 1988; CHANG et al., 1993; XAVIER et al., 2003, OKON et al., 2003) de ratos diabéticos.

Apesar de vários trabalhos demonstrarem redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e aumento da resposta contrátil em vasos de animais diabéticos, diversos trabalhos também descrevem não alteração da resposta vasodilatadora (FORTES et al., 1983b; HEAD et al., 1987; XAVIER et al., 2003) e vasoconstritora (FORTES et al., 1983b; PIEPER et al., 1996; FULTON et al., 1991), e até mesmo redução da resposta vasoconstritora (HEAD et al., 1987; PFAFFMAN et al., 1982; ZHU et al., 2001). Razões para essas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes condições experimentais, incluindo o tipo de artéria, o agonista ou a duração do diabetes utilizado.

Dois estudos mostram que dependendo da artéria estudada, os resultados são diferentes. Nas artérias mesentéricas *in vivo* e *in vitro* de animais diabéticos há redução da resposta induzida pela acetilcolina, enquanto que em aortas do mesmo animal essa resposta não se encontra alterada (FORTES et al., 1983b; TAYLOR et al., 1994). A duração do diabetes e o agonista usado também influenciam a resposta encontrada para agentes vasoconstritores e vasodilatadores. A resposta à acetilcolina em aortas de animais diabéticos esta aumentada após 24 horas de indução do diabetes, normal com 1 e 2 semanas e diminuída após 8 semanas de indução do diabetes (PIEPER, 1999). Para a fenilefrina, estudos demonstraram que em aortas de ratos diabéticos, a resposta a este agente não foi alterada com 1 semana de indução do diabetes (XAVIER et al., 2003), está aumentada com 2 e 4 semanas (ZHU et al., 2001; XAVIER et al., 2003) e com 12 semanas esta resposta é diminuída (ZHU et al., 2001). Já outro autor mostrou que a resposta a fenilefrina em aortas de animais diabéticos com 8 e 12 semanas não foi alterada, contudo a resposta à noradrenalina é aumentada (WONG e TZENG, 1992).

Apesar das varias discrepâncias encontradas na resposta vasodilatadora e vasoconstritora, vários mecanismos tem sido propostos para explicar a disfunção endotelial no diabetes *mellitus*, incluindo redução da produção de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs), difusão prejudicada dos EDRFs às células do músculo liso vascular, redução da resposta do músculo liso vascular aos EDRFs, aumento da inativação dos EDRFs e aumento da geração de fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) (De VRIESE et al., 2000).

O endotélio é uma monocamada de epitélio pavimentoso, localizado entre o sangue circulante e a camada média do músculo liso vascular. Essa posição é estratégica para manter a homeostase da parede vascular e a regulação da circulação. As células endoteliais regulam ativamente o tônus vascular e a reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas, respondendo a forças mecânicas e a agentes neuro-humorais e liberando fatores contráteis e relaxantes (FURCHGOTT e VANHOUTTE, 1989). Os fatores contráteis derivados do endotélio compreendem angiotensina II (Ang II), endotelina (ET), prostanóides vasoconstritores e espécies reativas do oxigênio, tal como ânion superóxido. Os fatores relaxantes derivados do endotélio incluem o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FÉLETOU e VANHOUTTE, 1999; De VRIESE et al., 2000).

Entre os EDRFs, o NO tem um papel crucial na regulação do tônus vascular principalmente nas artérias de condutância. O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas dessa enzima: a NOS neuronal (NOS I ou nNOS), a NOS induzível (NOS II ou iNOS) e a NOS endotelial (NOS III ou eNOS). As três isoformas da NOS formam homodímeros que catalizam a formação de L-citrulina e NO a partir de L-arginina, usando oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato (NADPH) como co-substratos e flavinas, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), tetrahidrobiopterina (BH_4), heme e cálcio/calmodulina como co-fatores (HANAFY et al., 2001).

Níveis reduzidos de substrato e/ou de co-fatores da NOS podem levar à diminuição da produção de NO. Foi mostrado que o co-fator BH_4 tem um importante papel no controle da atividade da eNOS (MAYER e WERNER, 1995). Vários estudos têm mostrado uma redução dos níveis de BH_4 na aorta de ratos resistentes à insulina (SHINOZAKI et al., 1999; BITAR et al., 2005) e no plasma de ratos diabéticos (HAMON et al., 1989). De fato, BH_4 restaura a reduzida vasodilatação dependente do endotélio em ratos (PIEPER, 1997; SHINOZAKI et al., 1999, 2000; PANNIRSELVAM et al., 2002) e ratas (AKAMINE et al., 2006a) diabéticos.

Os EDCFs também parecem ter efeito sobre a redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio no diabetes. Os efeitos dos EDCFs, como a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e tromboxano A_2 (TXA_2), liberados pelas células endoteliais, opõem-se aos efeitos dos EDRFs nas células do músculo liso vascular.

A redução do relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta (TESFAMARIAM et al., 1989; SHIMIZU et al., 1993), leito arteriolar mesentérico (HEYGATE et al., 1995), arteríolas cerebrais (MAYHAN et al., 1991) e arteríolas mesentéricas (AKAMINE et al., 2006) de animais diabéticos é corrigida por inibidores da ciclo-oxigenase (COX). Além disso, vários estudos descrevem aumento da geração de EDCFs no diabetes, principalmente TXA_2 e $PGF_{2\alpha}$ (FUJII et al., 1986; TESFAMARIAM et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2003; AKAMINE et al., 2006b).

Além de alterar a resposta vasodilatadora, o aumento dos EDCFs, principalmente prostanóides vasoconstritores também altera a resposta vasoconstritora. Foi observado que após a inibição da COX há redução da resposta contrátil aumentada em aortas de ratos diabéticos (XAVIER et al., 2003; OKON et al., 2003).

Diversas evidências implicam o estresse oxidativo como um importante fator patogênico na disfunção endotelial no diabético. O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento na produção de oxidantes celulares, como por exemplo, espécies reativas de oxigênio, e/ou diminuição da concentração de antioxidantes e enzimas antioxidantes, incluindo glutationa, vitamina E, ascorbato, superóxido dismutase e catalase. O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes resulta na disfunção e injúria do tecido (NICOLLS et al., 2007).

A importância das espécies reativas em mediar as complicações vasculares no diabetes é reforçada por estudos mostrando que antioxidantes tais como vitamina E, superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa e ácido ascórbico corrigem redução da função vasodilatadora dependente do endotélio em humanos e diabetes experimental (HATTORI et al., 1991; DAI et al., 1993; DIEDERICH et al., 1994; PIEPER, 1998; TIMIMI et al., 1998; DE VRIESE et al., 2000). De fato, as concentrações desses antioxidantes estão diminuídas no sangue e tecido de animais diabéticos (WOHAIEB e GODIN, 1987; MCLENNAN et al., 1988). Também foi observado que nos vasos de animais diabéticos há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (AKAMINE et al., 2006a; CHINEN et al., 2007). Entre as espécies reativas de oxigênio, o ânion superóxido tem grande importância no aumento da contração e redução da vasodilatação dependente do endotélio em vasos de animais diabéticos.

Além da redução da produção de NO, devido à deficiência de co-fatores como BH_4, aumento da produção de prostanóides vasoconstritores e de ânion superóxido, outros fatores também contribuem para a redução da resposta vasodilatadora e aumento da resposta vasoconstritora em vasos de animais diabéticos, tais como, aumento da produção de endotelina (KANIE e KAMATA, 2002; MAKINO e KAMATA, 1998) e diminuição da responsividade do músculo liso ao EDRF (CALVER et al., 1992; MCVEIGH et al., 1992; ZENERE et al., 1995; CLARKSON et al., 1996; WILLIAMS et al., 1996; LEKAKIS et al., 1997).

Os possíveis mecanismos que levam à disfunção endotelial no diabetes foram baseados principalmente em observações feitas nas alterações em vasos de animais machos diabéticos. No entanto, esses mecanismos podem não ser os mesmos em fêmeas.

Mulheres pré-menopausadas têm menor risco de desenvolver doença cardiovascular quando comparadas com homens da mesma idade e mulheres pós-menopausadas (BARRETT-CONNOR e WINGARD, 1983; KNEPPER et al., 1995; SOWERS et al., 1998). O mecanismo deste efeito protetor em mulheres pré-menopausadas, acredita-se ser um efeito do estrógeno sobre o sistema vascular. Estudos mostram que a reposição hormonal melhora a função vascular, aumentado a liberação de fatores relaxantes, tais como NO e prostaciclina (BOLEGO et al., 1997; MAJMUDAR et al., 2000; YANG et al., 2000). Entretanto, quando comparamos mulheres e homens com diabetes, mulheres diabéticas mostram maior chance de morte por doença cardiovascular do que homens diabéticos (LEGATO et al., 2006). Vários trabalhos mostram que no diabetes e/ou estado de alta concentração de glicose, o gênero feminino perde a proteção dos hormônios sexuais femininos (BOLEGO et al., 1999; LIM et al., 1999; STEINBERG et al., 2000; MAYHAN et al., 2001; GOEL et al., 2007 e 2008). Estudo feito com ratas diabéticas ooforectomizadas verificou que a redução da liberação basal de NO presente em aortas destes animais não é afetada pela reposição com estrógeno (BOLEGO et al., 1999), mostrando que realmente no estado diabético, o efeito protetor do estrógeno é perdido.

A hiperglicemia afeta os leitos vasculares de fêmeas e machos de maneira diferente (HU, 2003). Em estudos recentes, foi demonstrado que a vasodilatação à acetilcolina em anéis de aorta de ratas (GOEL et al., 2007) e de coelhas (GOEL et al., 2008), foi menor do que a de aorta de ratos e de coelhos, respectivamente,

quando incubados em meio contendo alta concentração glicose. Ainda, a inibição da PKC-β (proteína cinase C-beta) corrige apenas a redução da vasodilatação dependente do endotélio no sexo feminino. Em modelos de diabetes experimentais, observa-se que o diabetes reduz o relaxamento à acetilcolina e ao iloprost em aorta de ratas, mas não na de ratos (PINNA et al., 2001) e a redução da vasodilatação da artéria basilar induzida pela acetilcolina é mais pronunciada em ratas quando comparada com ratos (MAYHAN et al., 2002). Em vasos de resistência, diferença entre machos e fêmeas também é observada. Ratas diabéticas apresentam resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina reduzida (TOLEDO et al., 2003) e resposta vasoconstritora à endotelina aumentada (MATSUMOTO et al., 2008), enquanto que em machos estas respostas não foram alteradas. Outra diferença encontrada em machos e fêmeas diabéticas é em relação ao antagonismo do receptor de PGH_2 (prostaglandina H_2)/TXA_2. Em arteríolas de ratas diabéticas, o antagonismo do receptor PGH_2/TXA_2 não foi capaz de corrigir a redução da resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (AKAMINE et al., 2006b). Já em camundongos diabéticos db/db, o antagonismo deste mesmo receptor reduz o tônus das arteríolas aos níveis dos de controles (BAGI et al., 2005). Quando comparamos mulheres e homens com diabetes, observa-se estresse oxidativo e menor capacidade antioxidante em mulheres diabéticas (MARRA et al., 2002). Esses dados mostram que altas concentrações de glicose e o diabetes podem comprometer mais os indivíduos do sexo feminino nas alterações vasculares do que o masculino. E mais, estes dados mostram que os mecanismos pelos quais o diabetes prejudica a função endotelial em machos podem não ser exatamente os mesmos em fêmeas.

Diversos aspectos da redução da vasodilatação dependente do endotélio de ratas diabéticas foram avaliados por nosso grupo. Recentemente, demonstramos que a redução da vasodilatação dependente do endotélio de arteríolas mesentéricas de ratas diabéticas, envolve redução da produção de NO e aumento da geração de ânion superóxido e de $PGF_{2\alpha}$, provavelmente devido ao desacoplamento da NOS e à maior ativação da COX, respectivamente. Demonstramos ainda, que o tratamento crônico com insulina é capaz de corrigir essa redução da vasodilatação, independentemente de normalizar a glicemia e corrigir a produção de NO e $PGF_{2\alpha}$ (AKAMINE et al., 2006a;b). Assim, vários mecanismos para explicar a redução da

resposta vasodilatadora dependente do endotélio em ratas diabéticas foram propostos no leito arteriolar mesentérico. Este leito está diretamente relacionado com o controle da pressão arterial.

Apesar da aorta não estar diretamente envolvida na regulação da pressão arterial, verificar se o diabetes promove alterações da resposta vasodilatadora e vasoconstritora dependentes do endotélio neste vaso também é importante, pois foi observado que a remoção do endotélio (LEVY et al., 1990, BOUTOUYRIE et al., 2002), assim como em situações onde há disfunção endotelial (VAN BORTEL et al., 2001) podem provocar alterações morfo-funcionais como aumento do enrijecimento arterial, diminuindo a distensibilidade.

Além do mais, o emprego da aorta como modelo para estudo da reatividade vascular tem vantagens, como maior facilidade de manuseio e preparação, remoção mais fácil do endotélio e análise da resposta em outro território que não o microvascular, pois as grandes artérias podem ter contribuição, ainda que pequena na resistência periférica (BOHLEN, 1986).

Assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a resposta vasodilatadora e vasoconstritora de aortas de ratas diabéticas e investigar os mecanismos envolvidos nas alterações encontradas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, de 8-10 semanas, pesando de 180 a 200 g no início dos experimentos e provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As ratas tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidas em sala com temperatura e umidade constantes (24° C/60 %), com ciclos claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos gerais foram aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 Indução do diabetes experimental tipo 1

Após restrição alimentar de 17 horas, o diabetes foi induzido por injeção intravenosa (veia caudal) de aloxana (40 mg/kg), dissolvida em solução salina (cloreto de sódio 0,9%). Ratas do grupo controle receberam igual volume de solução salina. As ratas foram utilizadas trinta dias após a indução do diabetes.

2.3 Caracterização das ratas diabéticas

2.3.1 Determinação da glicemia

A glicemia foi determinada utilizando glicosímetro Advantage® (Roche, Alemanha) em amostras de sangue obtidas por punção da extremidade das caudas das ratas. Foram utilizadas, em todos os experimentos, ratas diabéticas que apresentarem níveis glicêmicos acima de 200 mg/dL (11,2 mmol/L).

2.3.2 Dosagem de insulina

Amostras de sangue foram retiradas pela aorta abdominal, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e o soro foi separado. As concentrações de insulina no soro de ratas controles e diabéticas foram determinadas por radioimunensaio (Rat insulin RIA Kit, Linco, USA).

2.3.3 Ganho de peso corporal

As ratas controles e diabéticas foram pesadas no dia da indução do diabetes e após 30 dias. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso dos animais 30 dias após a indução do diabetes e o peso destas no dia da indução.

2.3.4 Consumo de água e ração

Ratas diabéticas e controles foram colocadas em gaiolas metabólicas individuais e receberam volume determinado de água e quantidade determinada de ração. Após 24 horas, o volume de água restante foi medido em proveta graduada e por diferença obteve-se o consumo de líquido. A quantidade de ração consumida foi determinada, após 24 horas, pela diferença da quantidade inicial e remanescente.

2.3.5 Volume urinário e uroanálise

Ratas diabéticas e controles foram mantidas em gaiolas metabólicas individuais por 24 horas. O volume de urina coletada em um Becker foi determinado em proveta graduada. Foram utilizadas tiras reativas para uroanálise Keto-Diastix® (Bayer Diagnóstica, Brasil) na determinação da glicosúria e cetonúria.

2.4 Estudo do ciclo estral

O ciclo estral de ratas controles e diabéticas foi avaliado por meio de esfregaço vaginal. O estágio do ciclo estral foi determinado por observação, em microscópio óptico, das alterações celulares cíclicas no aparelho reprodutor feminino, refletidas na secreção vaginal. O exame celular dessa secreção permite

diferenciar as diversas fases do ciclo estral das ratas. Para este estudo, ratas controles e diabéticas foram utilizadas durante o período de diestro, por termos constatado que as ratas diabéticas não ciclam e permanecem em diestro permanentemente.

2.5 Peso do útero e dosagem hormonal

Foram avaliados o peso total (no momento da retirada do tecido) e o peso seco (após 24 horas de secagem em estufa a 37°C) dos úteros (livres de gordura e ovários) após 30 dias da indução do diabetes. Os resultados foram expressos em mg de tecido para cada 100 g de peso corporal.

As concentrações dos hormônios estradiol e progesterona foram determinados no soro de ratas controles e diabéticas na fase de diestro, utilizando-se kit de radioimunoensaio (DPC, EUA).

2.6 Estudo *in vitro* da reatividade de anéis de aorta torácica isolada

As ratas foram anestesiadas com tiopental (50mg/kg) por via intraperitonial. As aortas torácicas de ratas controles e diabéticas foram removidas e rapidamente imersas em solução nutriente Krebs-Henseleit (Composição em mM: Glicose 11; Cloreto de sódio 117,5; Sulfato de magnésio 1,18; Fosfato de potássio 1,2; Bicarbonato de sódio 25; Cloreto de potássio, 4,7; Cloreto de cálcio, 2,5; pH 7,4) e seccionadas em anéis transversais de 5 mm. Em um desses anéis, o endotélio foi mantido intacto e no outro foi removido mecanicamente com uma haste metálica fina envolta de algodão. Os anéis com e sem endotélio foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável sendo que este gancho era fixado à base da cuba de vidro para estudo de órgão isolado, e o outro conectado a um transdutor de sinal (ML T001 transdutor isométrico de tensão, Power Lab/8S, ADInstruments Pty Ltda, Austrália) acoplado a um computador. As cubas de vidro continham 15 ml de solução de Krebs-Henseleit modificada que permaneceram gaseificadas com mistura de 95 % de O_2 e 5 % de CO_2 e mantidas aquecidas à temperatura de 37 ±

0,5º C durante todo o protocolo experimental. As preparações permaneceram sob tensão de 1,5 g por um período de 60 minutos para estabilização, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 20 minutos.

2.6.1 Avaliação da resposta vasodilatadora à Acetilcolina, Histamina e Nitroprussiato de sódio

Após o período de estabilização de 60 minutos, os anéis de aorta com e sem endotélio foram pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M; $3x10^{-8}$ M, respectivamente), concentrações que promovem 60-80% da resposta máxima nos dois grupos experimentais, estabelecidas previamente na curva concentração efeito (CCE) cumulativa à noradrenalina. Atingida a estabilização da resposta contrátil (aproximadamente 10-15 minutos) foi realizada em anéis de aorta com endotélio a CCE com solução de acetilcolina (10^{-10} M a 10^{-5} M), histamina (10^{-8} M a $3x10^{-4}$ M) e nitroprussiato de sódio (10^{-10} M a 10^{-5} M) de maneira cumulativa, com intervalos de 2 a 3 minutos entre cada concentração, tempo necessário para a estabilização da resposta vasodilatadora. Nos anéis de aorta sem endotélio, foi realizada apenas a CCE cumulativa ao nitroprussiato de sódio (10^{-10} M a 10^{-5} M).

2.6.2 Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico (NO) sobre a resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina

Para avaliar a modulação do NO sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabética, as preparações foram pré-incubadas com L-NAME (10^{-4} M), inibidor da síntese de NO, por 30 minutos após a estabilização. O tônus vascular não foi alterado durante o período de incubação com L-NAME. A concentração de L-NAME utilizada por nós foi a mesma utilizada por GARCÍA-VILLALÓN e colaboradores (2003) em estudos semelhantes. Os anéis de aorta de ratas controles e diabéticas foram pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M; $3x10^{-7}$ M, respectivamente) concentrações que promovem 60-80% da resposta máxima nos grupos experimentais, estabelecidas previamente na CCE cumulativa à noradrenalina na presença de L-NAME. Foi realizada CCE com solução de acetilcolina (10^{-10} M a 10^{-5} M), de maneira cumulativa, com intervalos de 3 minutos entre cada concentração.

2.6.3 Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de estabilização de 60 minutos, foi realizada CCE com solução de KCl em concentrações crescentes ($5x10^{-3}$ M a $108x10^{-3}$ M), de maneira cumulativa, em anéis de aorta com e sem endotélio, com intervalos de 5-8 minutos entre cada concentração, tempo necessário para a estabilização da resposta contrátil.

2.6.4 Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina

Após o período de estabilização de 60 minutos, foi realizada CCE com solução de noradrenalina em concentrações crescentes em anéis com endotélio (10^{-9} M a $3x10^{-5}$ M) e sem endotélio (10^{-10} M a $3x10^{-5}$ M) de maneira cumulativa, com intervalos de 3 minutos entre cada concentração, tempo necessário para a estabilização da resposta contrátil.

2.6.5 Efeito do bloqueio da síntese de NO, da produção de ânion superóxido, ciclo-oxigenase, dos receptores para angiotensina II e dos receptores para endotelina sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina

Para avaliar a modulação do NO, a participação do ânion superóxido, dos produtos da ciclo-oxigenase, da angiotensina II e da endotelina sobre a resposta contrátil à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas, as preparações foram pré-incubadas com L-NAME (inibidor da síntese de NO; 10^{-4} M), ou superóxido dismutase (SOD) (sequestrador de ânion superóxido; 150 U/mL), ou indometacina (inibidor não seletivo da ciclo-oxigenase; 10^{-5} M), ou NS-398 (inibidor seletivo da ciclo-oxigenase-2; 10^{-5} M), losartan (bloqueador do receptor para angiotensina II AT1; 10^{-5} M), ou tezosentan (bloqueador dos receptores para endotelina; 10^{-8} M) por 30 minutos após a estabilização. O tônus vascular não foi alterado durante o período de incubação com nenhum dos bloqueadores. As concentrações de L-NAME e SOD (GARCÍA-VILLALÓN et al., 2003; DAVEL et al., 2006), de indometacina e NS-398 (XAVIER et al., 2003; GARCIA-COHEN et al., 2000) e de losartan e tezosentan (DAVEL et al., 2006;

CLOZEL et al., 1999) foram baseadas em outros estudos. Em seguida, foi realizada CCE com solução de noradrenalina em concentrações crescentes (10^{-9} M a $3x10^{-5}$ M), de maneira cumulativa, com intervalos de 3 minutos entre cada concentração, tempo necessário para estabilização da resposta contrátil.

2.6.6 Análise do papel do cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora à noradrenalina

Após estabilização de 60 minutos, os anéis de aorta com e sem endotélio foram incubados durante 5 minutos com uma solução de Krebs-Henseleit livre de cálcio (Ca^{2+}) e contendo EGTA (ácido tetraacético etileno glicol; 1mM), em seguida, foi adicionada noradrenalina (10^{-7} M) no banho. A adição de noradrenalina induziu uma contração transiente e de pequena magnitude e, após retorno à tensão basal, cloreto de cálcio ($CaCl_2$; 2,5 mM) foi adicionado ao banho. O $CaCl_2$ omitido na solução sem cálcio foi substituído por igual concentração de cloreto de sódio, para manter a osmolaridade.

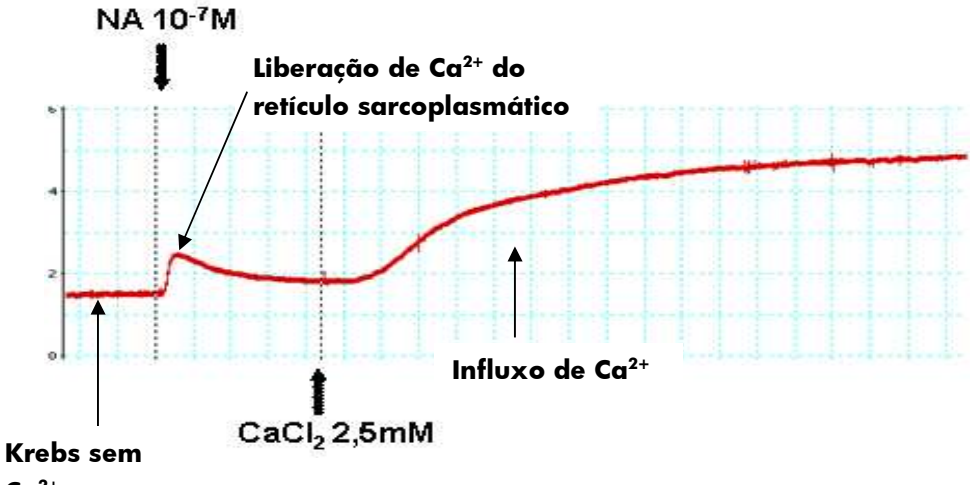


Figura 1 - Registro típico do estudo da participação do cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (NA; 10^{-7} M).

2.6.7 Efeito do bloqueio dos canais para cálcio voltagem dependente tipo L sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina

Para avaliar o papel dos canais para cálcio voltagem dependente tipo L na resposta contrátil à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas, as preparações foram pré-incubadas com Nifedipina (bloqueador dos canais para cálcio dependente de voltagem tipo L; 10^{-5} M) (MASSETT et al., 1999) por 30 minutos após o período de estabilização. O tônus basal não foi alterado durante o período de incubação com Nifedipina (10^{-5} M). Foi realizada CCE com solução de noradrenalina em concentrações crescentes (10^{-9} M a $3x10^{-5}$ M), de maneira cumulativa, com intervalos de 3 minutos entre cada concentração, tempo necessário para estabilização da resposta contrátil.

2.6.8 Efeito do bloqueio da proteína cinase C (PKC) sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina

Para avaliar o papel da PKC na resposta contrátil à noradrenalina em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabética, as preparações foram pré-incubadas com Calphostin C (inibidor inespecífico das PKCs; 10^{-7} M) (FATEHI-HASSANABAD et al., 2004) por 30 minutos após o período de estabilização. O tônus basal não foi alterado durante o período de incubação com Calphostin C (10^{-7} M). Foi realizada CCE com solução de noradrenalina em anéis com (10^{-9} a $3x10^{-5}$ M) e sem (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) endotélio, de maneira cumulativa, com intervalos de 3 minutos entre cada concentração, tempo necessário para estabilização da resposta contrátil.

2.7 Morfometria da aorta torácica

Para este estudo foram utilizados cortes seriados (7 µm) obtidos de aortas fixadas com paraformaldeído 4%, desidratados em concentrações crescentes de álcool (álcool 70 %, 85 %, 90 %, 100 %, banhos de 10 minutos), diafanizados em banhos de xilol (5 minutos cada), banhados por três vezes em parafina (30 minutos

cada banho) e emblocados em parafina. Foram feitos cortes não seriados das aortas em Micrótomo (Leica) que foram colocados em lâminas de vidro.

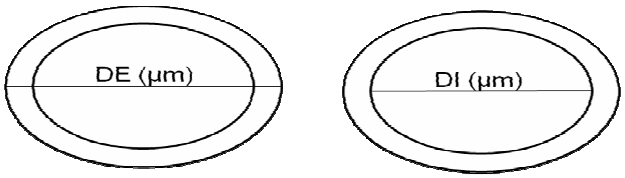
2.7.1 Coloração com hematoxilina-eosina

Os cortes foram desparafinizados em banho de xilol e hidratados em banhos de álcool em concentrações decrescentes (100 %, 90 %, 85 %, 70 %). Após este processo as lâminas com cortes de aorta foram imersas em hematoxilina de Méier por 3 minutos, e lavadas em água corrente por 10 minutos.

Após a coloração, as lâminas foram imersas por 10 minutos em álcool 50 %, 70 %, 80 %, 90 % e 100 %. Em seguida, as mesmas foram banhadas por 10 minutos em álcool+xilol (1:1), por 10 minutos e depois secas e fechadas com Entellan (Merck) e lamínulas.

2.7.2 Medida da espessura da parede

Para medir a espessura da parede (EP) medimos o diâmetro externo (DE) e o diâmetro interno (DI) do vaso em micrômetos (µm), o DE foi subtraído do DI e assim obtivemos EP do vaso. Para obtermos a relação parede/luz o valor da EP foi dividido pelo DI (EP/DI = relação parede/luz).



DE (µm) – DI (µm)= EP (µm)

Figura 2- Representação esquemática da medida da espessura da parede em aortas de ratas controles e diabéticas. Diâmetro externo (DE), Diâmetro interno (DI), Espessura da parede (EP) e Micrômetros (µm).

2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (epm). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni para a homogeneidade das variâncias ou teste “t” de Student não pareado, quando apropriado. O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$.

2.9 Drogas utilizadas

Aloxana (SIGMA); Tiopental (Cristália); Noradrenalina, bitartarato (SIGMA); Cloreto de potássio (MERCK); Acetilcolina (SIGMA); Nitropusssiato de Sódio (SIGMA); Cloreto de cálcio (MERCK); Indometacina (SIGMA); NS-398 (CALBIOCHEM); Calphostin C (SIGMA); Nifedipina (SIGMA); Losartan (SIGMA); Tezosentan (SIGMA).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização de ratas diabéticas

3.1.1 Parâmetros biológicos

Trinta dias após a indução do diabetes, o ganho de peso das ratas diabéticas foi menor do que o de ratas controles. Após privação alimentar de 4 horas, a glicemia basal foi significativamente elevada e o nível de insulina no soro foi menor em ratas diabéticas do que em ratas controles. As ratas diabéticas apresentaram aumento do consumo de água, de ração e do volume urinário (Tabela 1). Glicosúria foi detectada apenas em ratas diabéticas (Tabela 1) e a cetonúria não foi detectada em nenhuma rata dos diferentes grupos experimentais.

Tabela 1 – Parâmetros biológicos.

	Controle	Diabética
Ganho de peso (g)	58,5 ± 4,2 (n=13)	17,2 ± 6,2 (n=12)***
Glicemia (mg/dL)	133,0 ± 9,8 (n=6)	542,3 ± 16,7 (n=6)***
Insulina (ng/mL)	1,58 ± 0,2 (n=5)	0,24 ± 0,1 (n=9)***
Ração (g/24h)	8,3 ± 0,4 (n=6)	20,4 ± 1,1 (n=6)***
Água (mL/24h)	12,1 ± 0,4 (n=6)	85,2 ± 5,7 (n=6)***
Urina (mL/24h)	5,0 ± 0,3 (n=6)	75,4 ± 5,9 (n=6)***
Glicosúria (g/dL)	Negativo (n=6)	4,5 ± 0,5 (n=6)

Os resultados estão expressos como média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,0001$ vs Controle.

3.1.2 Peso do útero e dosagem hormonal

Trinta dias após a indução do diabetes, na fase de diestro, os pesos total e seco do útero de ratas diabéticas estavam diminuídos em relação aos de ratas controles na mesma fase do ciclo estral (Tabela 2). A concentração de progesterona no soro de ratas diabéticas foi reduzida. Enquanto o estradiol não foi detectado no soro de ratas diabéticas pela técnica utilizada (Tabela 3).

Tabela 2 – Peso do útero total e seco.

Peso do útero (mg de útero /100g de peso corporal)	**Controle** (n=9)	**Diabética** (n=14)
Total	163,2 ± 13,0	111,2 ± 8,8*
Seco	33,5 ± 2,6	23,5 ± 1,7*

Os resultados estão expressos como média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Controle.

Tabela 3 – Concentração de progesterona e estradiol.

Hormônio	**Controle**	**Diabética**
Progesterona (ng/mL)	16,5 ± 1,2 (n=13)	4,5 ± 0,8 (n=18)***
Estradiol (pg/mL)	12,5 ± 2,2 (n=10)	-

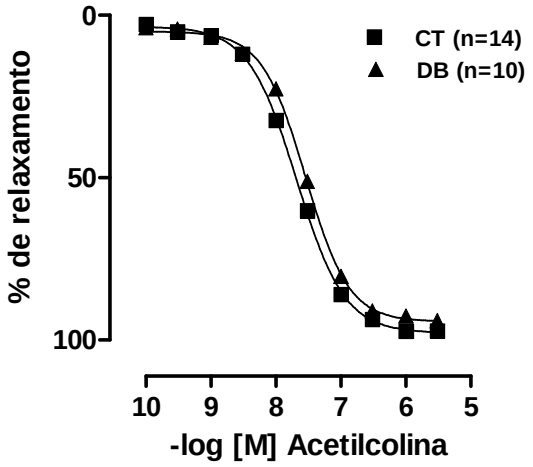
Os resultados estão expressos como média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,0001$ vs Controle.

3.2 Avaliação da Resposta Vasodilatadora

3.2.1 Resposta Vasodilatadora à Acetilcolina

A resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina foi semelhante entre anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas (Figura 3; Tabela 4).

A)



B)

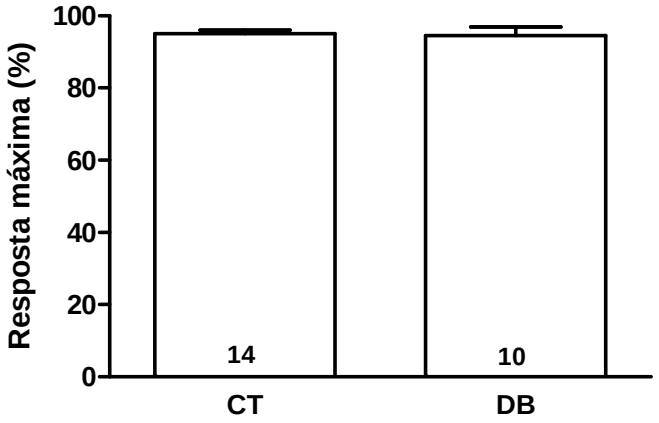


Figura 3 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm da porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras.

Tabela 4 – Resposta máxima e sensibilidade à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

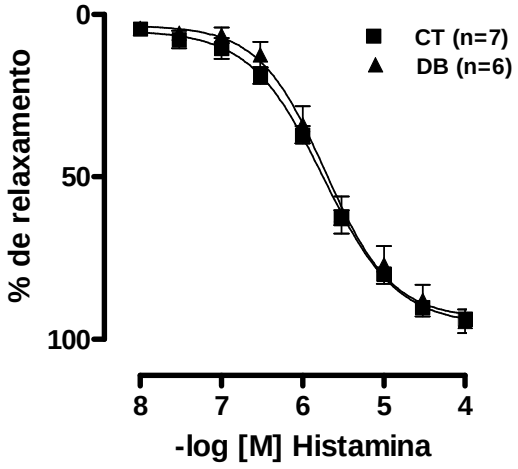
Grupo	Resposta máxima (%)	pD_2
Controle (n=14)	95,02 ± 1,03	7,72 ± 0,08
Diabética (n=10)	94,53 ± 2,35	7,55 ± 0,07

Os valores de resposta máxima (porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina) e pD_2 (-log EC50) representam a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses.

3.2.2 Resposta Vasodilatadora à Histamina

A resposta vasodilatadora induzida pela histamina foi semelhante entre anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas (Figura 4; Tabela 5).

A)



B)

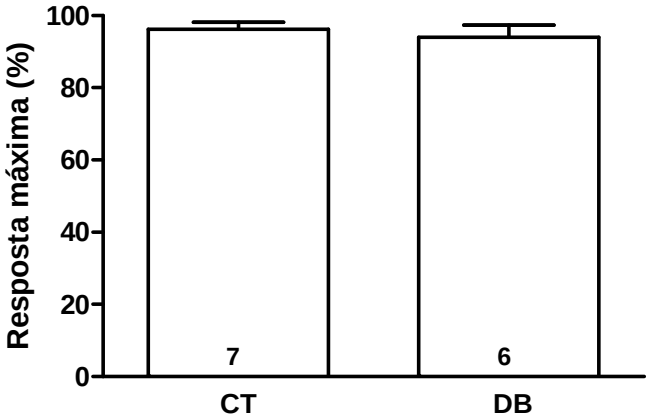


Figura 4 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a histamina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm da porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras.

Tabela 5 – Resposta máxima e sensibilidade à histamina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

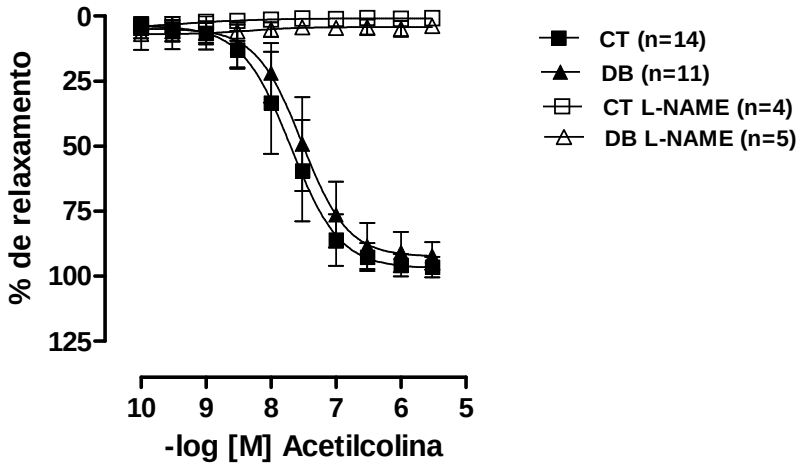
Grupo	Resposta máxima (%)	pD_2
Controle (n=7)	96,24 ± 1,88	5,74 ± 0,06
Diabética (n=6)	93,95 ± 3,47	5,71 ± 0,08

Os valores de resposta máxima (porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina) e pD_2 (-log EC50) representam a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses.

3.2.3 Participação do Óxido Nítrico na Modulação da Resposta Vasodilatadora à Acetilcolina

A inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME (10^{-4} M) inibiu o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas de maneira semelhante (Figura 5; Tabela 6).

A)



B)

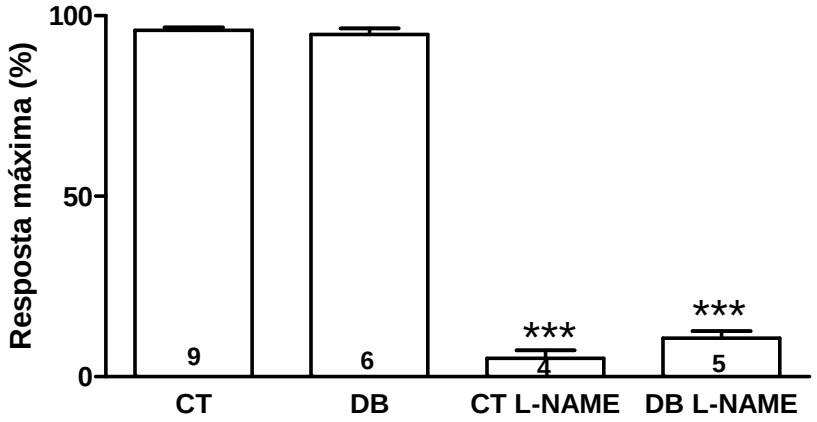


Figura 5 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para acetilcolina após o bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (10^{-4} M) em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm da porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. *** $p < 0,001$ vs respectivo grupo sem L-NAME.

Tabela 6 – Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (10^{-4} M) sobre a resposta máxima à acetilcolina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (n=9)	95,94 ± 0,88	ND
Diabética (n=6)	94,87 ± 1,69	ND
Controle L-NAME (n=4)	5,12 ± 2,18***	ND
Diabética L-NAME (n=5)	10,70 ± 1,92***	ND

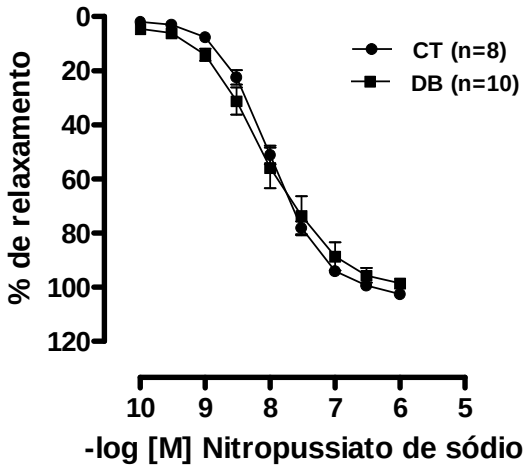
Os valores de resposta máxima (porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina) representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2 (-log EC50), pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,001$ vs respectivo grupo sem L-NAME.

3.2.4 Resposta Vasodilatadora ao Nitroprussiato de Sódio

A resposta vasodilatadora induzida pelo nitroprussiato de sódio foi semelhante entre anéis de aorta com (Figura 6; Tabela 7) e sem (Figura 7; Tabela 7) endotélio de ratas controles e diabéticas.

Anéis de aorta com endotélio

A)



B)

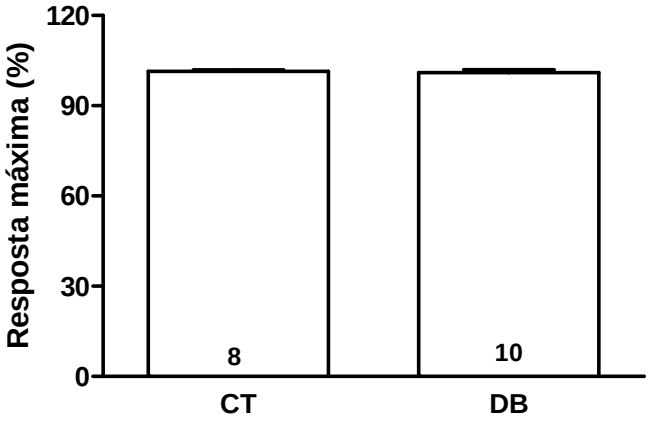
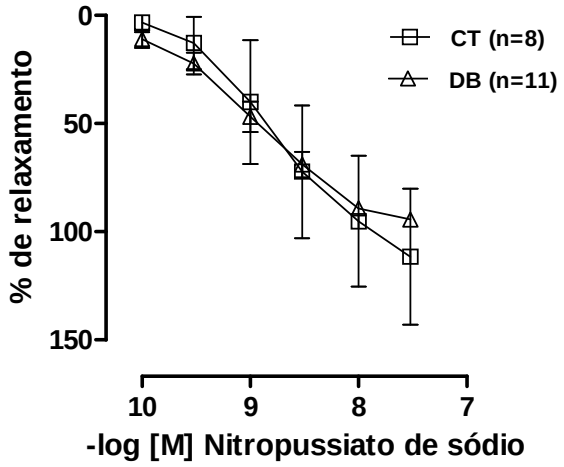


Figura 6 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para o nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm da porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras.

Anéis de aorta sem endotélio

A)



B)

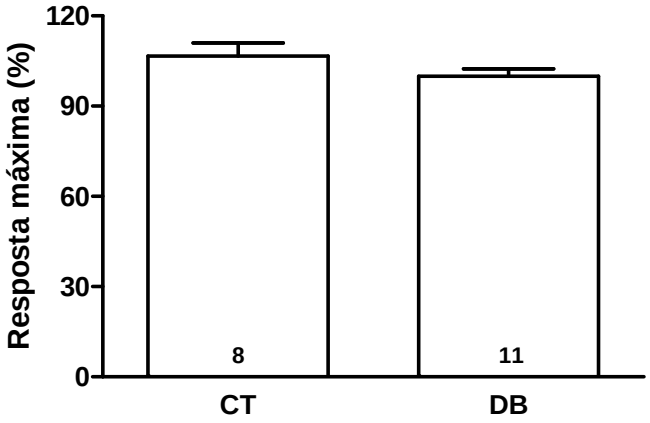


Figura 7 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para o nitroprussiato de sódio em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm da porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras.

Tabela 7 – Resposta máxima e sensibilidade ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (%)	pD_2
Controle E+ (n=9)	101,40 ± 0,51	8,03 ± 0,16
Diabética E+ (n=8)	101,10 ± 0,97	8,00 ± 0,05
Controle E- (n=8)	106,70 ± 4,26	8,71 ± 0,11
Diabética E- (n=11)	100,00 ± 2,40	8,91 ± 0,05

Os valores de resposta máxima (porcentagem de relaxamento relativo à pré-contração induzida pela noradrenalina) e pD_2 (-log EC50) representam a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses.

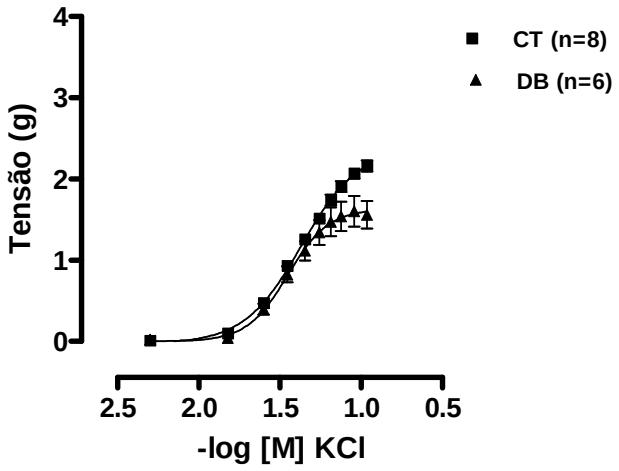
3.3 Avaliação da Resposta Vasoconstritora

3.3.1 Resposta Vasoconstritora ao Cloreto de Potássio

A resposta vasoconstritora induzida pelo cloreto de potássio foi menor em anéis de aorta com (Figura 8; Tabela 8) e sem (Figura 9; Tabela 8) endotélio de ratas diabéticas quando comparadas com a de ratas controles. A retirada do endotélio potencializou a contração ao cloreto de potássio apenas em aortas de ratas controles (Tabela 8).

Anéis de aorta com endotélio

A)



B)

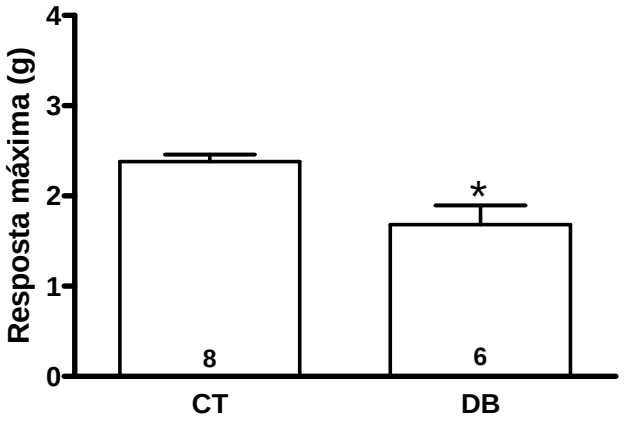
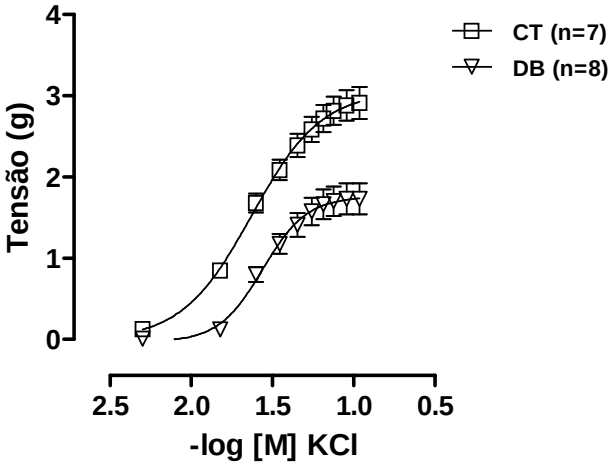


Figura 8 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para o cloreto de potássio em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. * $p < 0,05$ vs CT.

Anéis de aorta sem endotélio

A)



B)

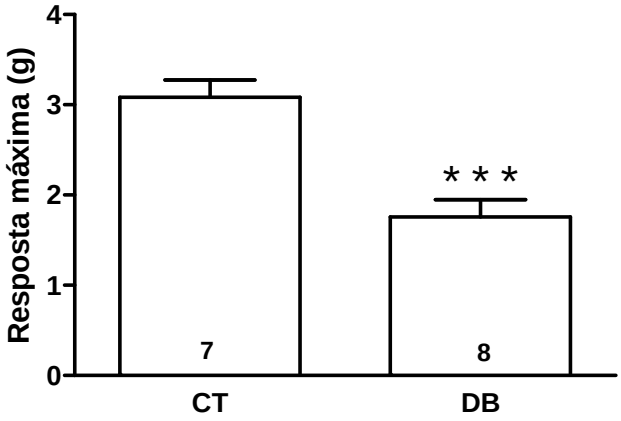


Figura 9 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para o cloreto de potássio em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. *** $p < 0,001$ vs CT.

Tabela 8 – Resposta máxima ao cloreto de potássio dos anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle E+ (n=9)	2,38 ± 0,08	ND
Diabética E+ (n=8)	1,68 ± 0,21*	ND
Controle E- (n=7)	3,08 ± 0,19#	ND
Diabética E- (n=8)	1,76 ± 0,19***	ND

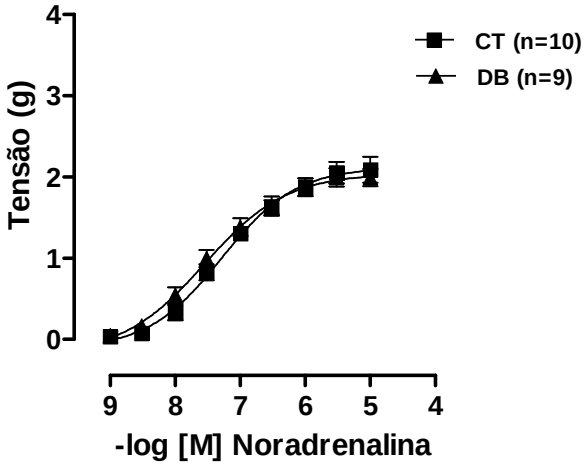
Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2 (-log EC50), pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Controle E+. *** $p < 0,01$ vs Controle E-. # $p < 0,05$ vs Controle E+.

3.3.2 Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

A resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina, um agonista alfa-adrenérgico, foi semelhante entre anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas (Figura 10; Tabela 9). No entanto, em anéis de aorta sem endotélio, a resposta vasoconstritora à noradrenalina foi menor em ratas diabéticas, quando comparadas com ratas controles (Figura 11; Tabela 9). A retirada do endotélio potencializou a resposta à noradrenalina em aortas de ratas controles e diabéticas, porém essa potencialização foi de menor magnitude em aortas de ratas diabéticas (Tabela 9).

Anéis de aorta com endotélio

A)



B)

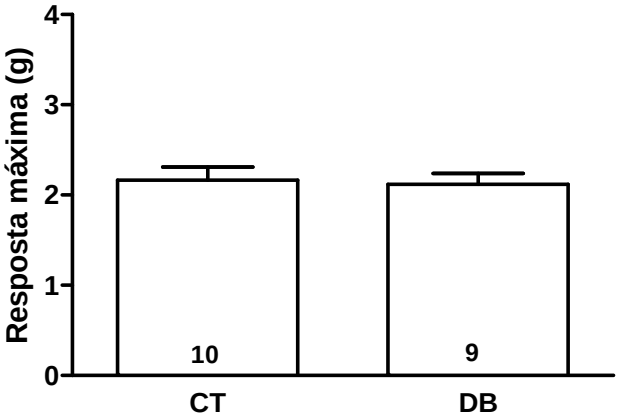
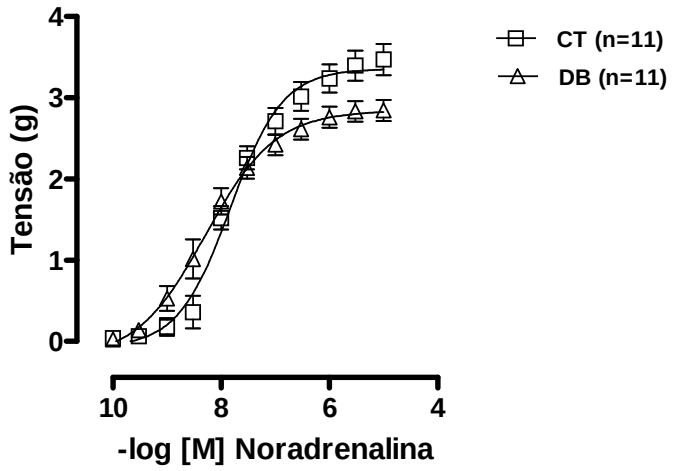


Figura 10 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras.

Anéis de aorta sem endotélio

A)



B)

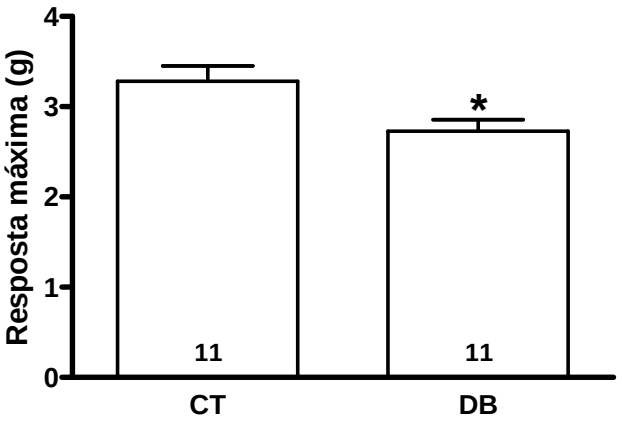


Figura 11 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. * $p < 0,05$ vs CT.

Tabela 9 – Resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratas controles e diabéticas.

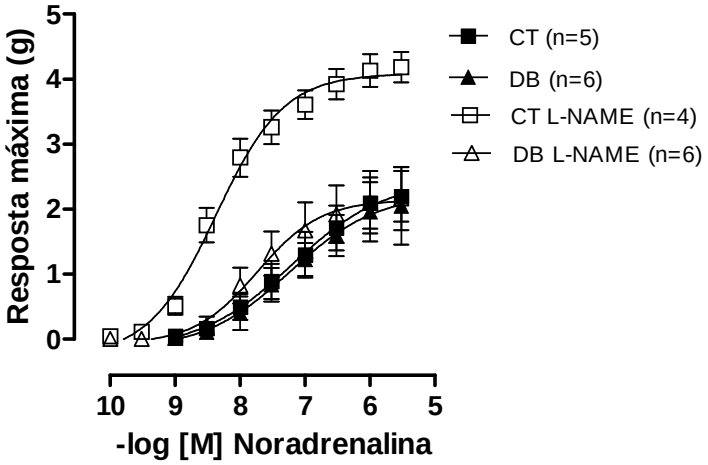
Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle E+ (n=9)	2,14 ± 0,16	ND
Diabética E+ (n=8)	2,07 ± 0,12	ND
Controle E- (n=7)	3,34 ± 0,24***	ND
Diabética E- (n=8)	2,68 ± 0,17*#	ND

Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2, pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Controle E-. *** $p < 0,01$ vs Controle E+. # $p < 0,05$ vs Diabética E+.

3.3.2.1 Participação do Óxido Nítrico na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

A inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME (10^{-4} M) aumentou a resposta contrátil à noradrenalina apenas em aortas com endotélio de ratas controle (Figura 12; Tabela 10).

A)



B)

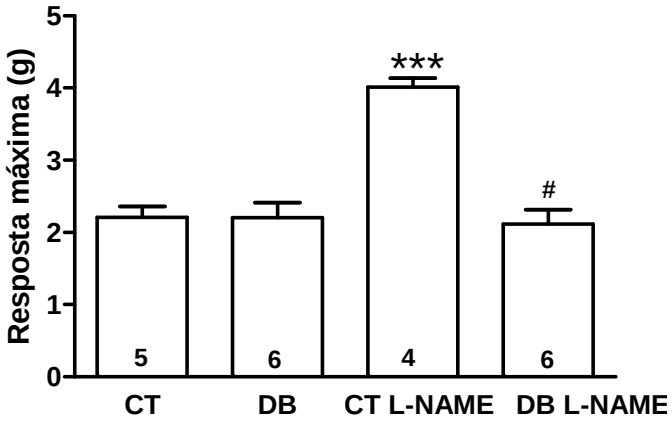


Figura 12 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (10^{-4} M) em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. *** $p < 0,001$ vs CT. # $p < 0,001$ vs CT L-NAME.

Tabela 10 – Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (10^{-4} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (n=5)	2,21 ± 0,15	ND
Diabética (n=6)	2,20 ± 0,21	ND
Controle L-NAME (n=4)	4,01 ± 0,12***	ND
Diabética L-NAME (n=6)	2,11 ± 0,20#	ND

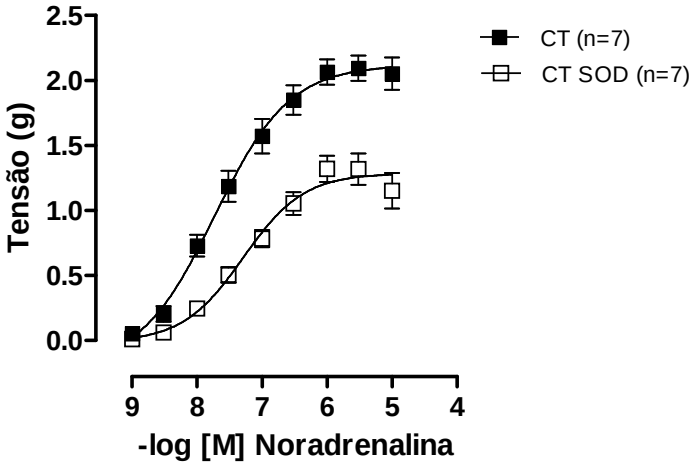
Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2, pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,001$ vs Controle. # $p < 0,001$ vs Controle L-NAME.

3.3.2.2 Participação do Ânion Superóxido na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

O sequestrador de ânion superóxido, superóxido dismutase (150 U/mL), reduziu a resposta máxima à noradrenalina em aortas com endotélio de ratas controles (Figura 13; Tabela 11). Após a incubação com superóxido dismutase (150 U/mL), a sensibilidade à noradrenalina foi reduzida em aortas com endotélio de ratas diabéticas (Figura 14; Tabela 12).

Ratas controles

A)



B)

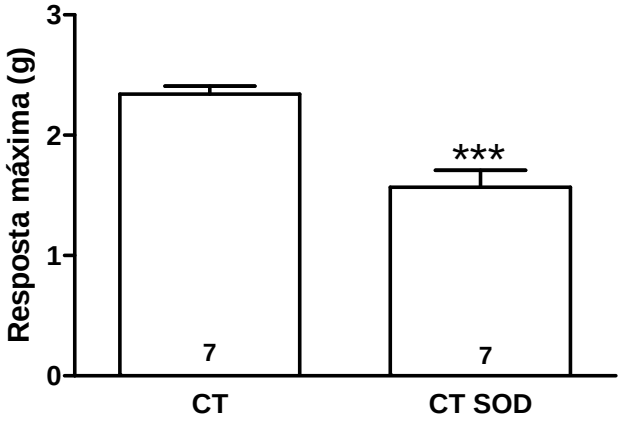


Figura 13 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após a incubação com superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL) em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. *** $p < 0,001$ vs CT.

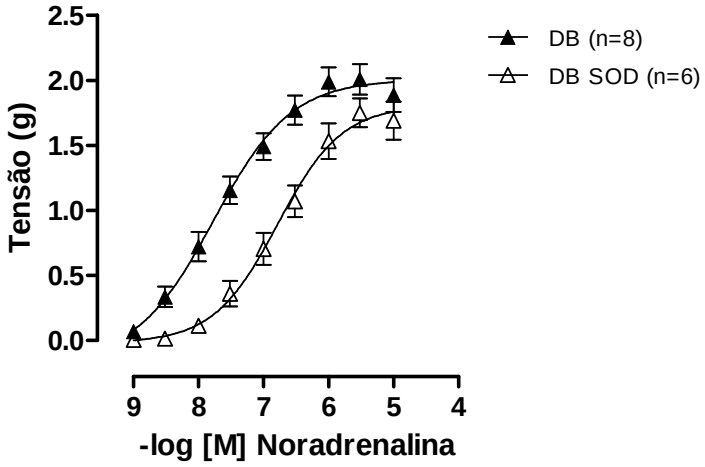
Tabela 11 – Efeito da incubação dos anéis de aorta com superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles.

Grupo	Resposta máxima (%)	pD_2
Controle (n=7)	2,34 ± 0,06	ND
Controle SOD (n=7)	1,57 ± 0,14***	ND

Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2 (-log EC50), pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,001$ vs Controle.

Ratas diabéticas

A)



B)

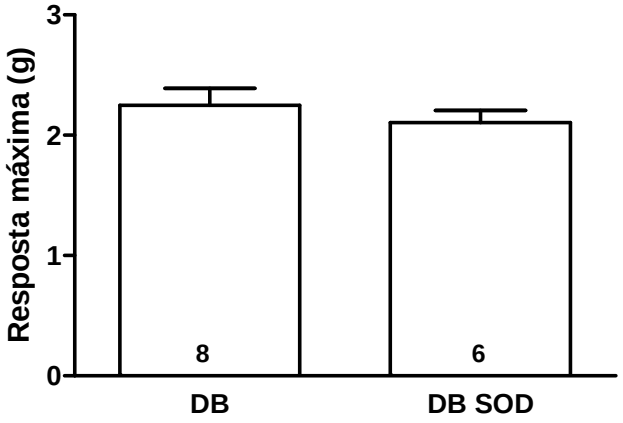


Figura 14 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após a incubação com superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL) em anéis de aorta com endotélio de ratas diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras.

Tabela 12 – Efeito da incubação dos anéis de aorta com superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL) sobre a resposta máxima e sensibilidade à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (%)	pD_2
Diabética (n=8)	2,25 ± 0,14	7,93 ± 0,21
Diabética SOD (n=6)	2,11 ± 0,11	6,61 ± 0,15***

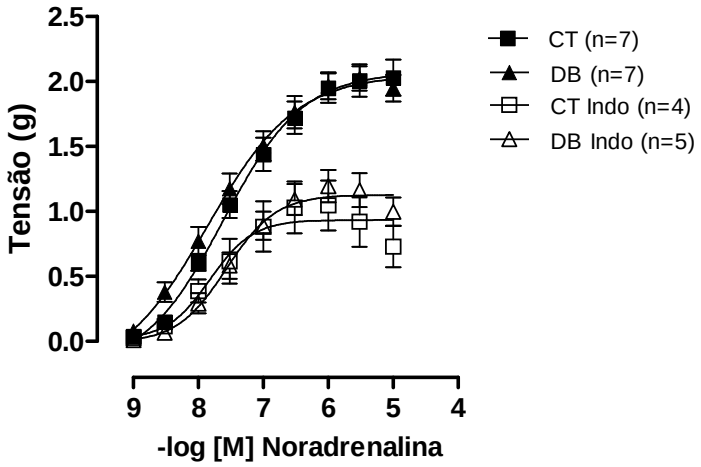
Os valores de resposta máxima e pD_2 (-log EC50) representam a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,001$ vs Diabética.

3.3.2.3 Participação dos Produtos da Ciclo-oxigenase na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

Após a inibição não seletiva da enzima ciclo-oxigenase com Indometacina (10^{-5} M), a diminuição da resposta vasoconstritora foi semelhante entre anéis de aorta com endotélio de ratas controles (48%) e diabéticas (45%) (Figura 15; Tabela 13). Semelhantemente, após a inibição da enzima ciclo-oxigenase-2 com NS-398 (10^{-5} M), a diminuição da resposta vasoconstritora foi de mesma magnitude em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (56%) e diabéticas (52%) (Figura 16; Tabela 14).

Inibição não-seletiva da ciclo-oxigenase

A)



B)

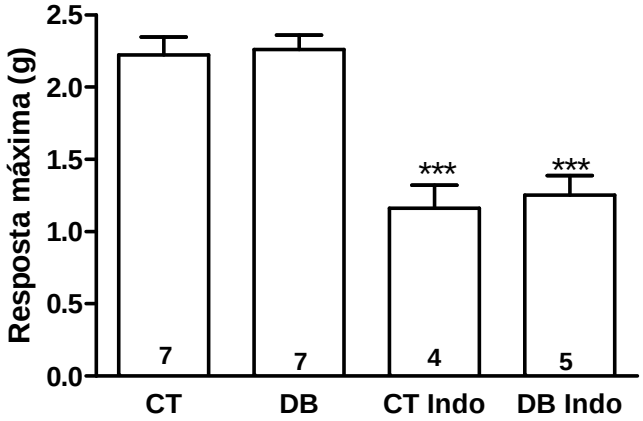


Figura 15 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio da enzima ciclo-oxigenase com indometacina (Indo, 10^{-5} M) em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. *** $p < 0,001$ vs respectivo grupo sem indometacina.

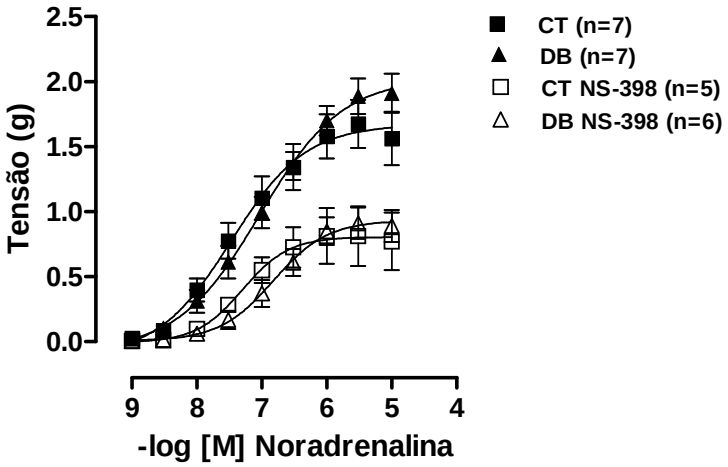
Tabela 13 – Efeito do bloqueio da enzima ciclo-oxigenase com indometacina (Indo, 10^{-5} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (n=13)	2,22 ± 0,12	ND
Diabética (n=13)	2,26 ± 0,10	ND
Controle Indo (n=14)	1,16 ± 0,16***	ND
Diabética Indo (n=11)	1,25 ± 0,13***	ND

Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2 (-log EC50), pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,001$ vs respectivo grupo sem indometacina.

Inibição da ciclo-oxigenase 2

A)



B)

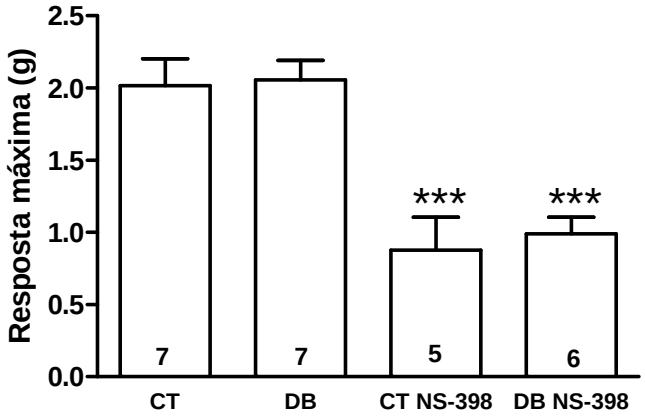


Figura 16 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio da enzima ciclo-oxigenase-2 com NS-398 (10^{-5} M) em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. *** $p < 0,001$ vs respectivo grupo sem NS-398.

Tabela 14 – Efeito do bloqueio da enzima ciclo-oxigenase 2 com NS-398 (10^{-5} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

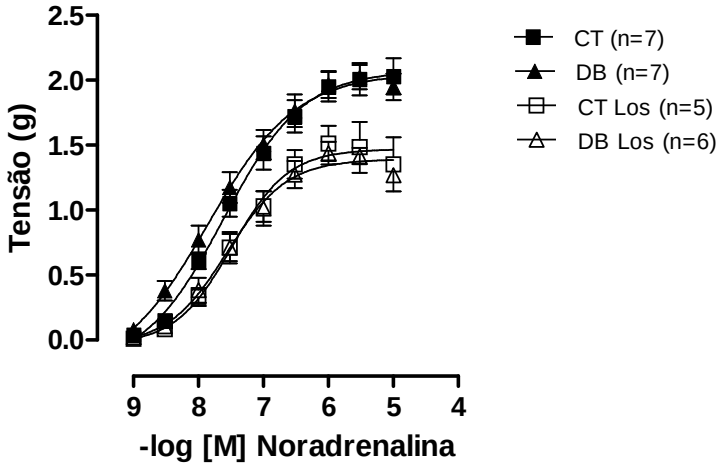
Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (n=7)	2,02 ± 0,19	ND
Diabética (n=7)	2,06 ± 0,13	ND
Controle NS 398 (n=5)	0,88 ± 0,22***	ND
Diabética NS 398 (n=6)	0,99 ± 0,11***	ND

Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2 (-log EC50), pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. *** $p < 0,001$ vs respectivo grupo sem NS 398.

3.3.2.4 Participação da Angiotensina II na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

Após o bloqueio dos receptores para angiotensina II com Losartan (10^{-5}M) a diminuição da resposta vasoconstritora à noradrenalina foi semelhante entre anéis de aorta de ratas controles (24%) e diabéticas (30%) (Figura 17, Tabela 15).

A)



B)

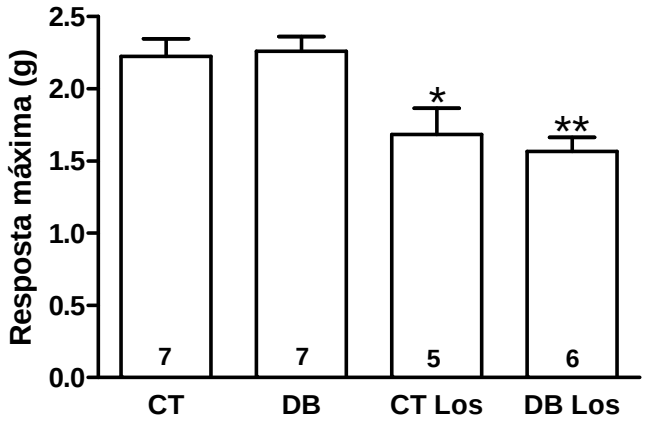


Figura 17 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio do receptor para angiotensina com Losartan (Los; 10^{-5} M) em anéis de aorta de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se no interior das barras. * $p < 0,05$ vs CT. ** $p < 0,01$ vs DB.

Tabela 15 – Efeito do bloqueio dos receptores de Angiotensina II com Losartan (10^{-5} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

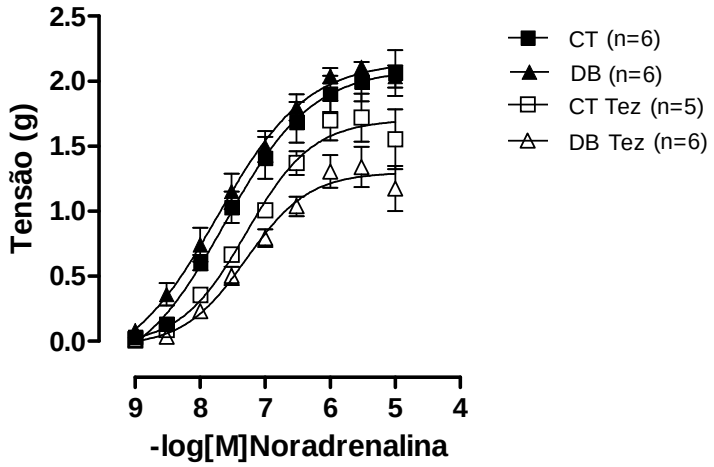
Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (7)	2,22 ± 0,12	ND
Diabética (7)	2,26 ± 0,10	ND
Controle Losartan (5)	1,68 ± 0,18*	ND
Diabética Losartan (6)	1,57 ± 0,10**	ND

Os valores de resposta máxima e pD_2 (-log EC50) representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2 pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Controle. ** $p < 0,01$ vs Diabética.

3.3.2.5 Participação da Endotelina na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

Após o bloqueio dos receptores para endotelina com Tezosentan (Tez, 10^{-8} M), a resposta vasoconstritora à noradrenalina foi reduzida apenas nos anéis de aorta de ratas diabéticas (35%) (Figura 18, Tabela 16).

A)



B)

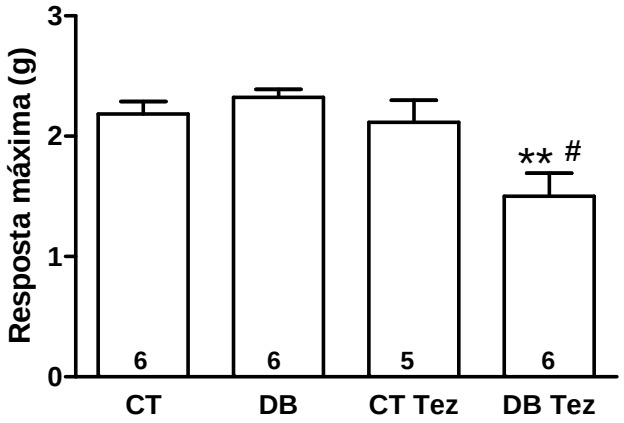


Figura 18 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio dos receptores para endotelina com Tezosentan (Tez; 10^{-8} M) em anéis de aorta de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se no interior das barras. # $p < 0,05$ vs CT Tez. ** $p < 0,01$ vs DB.

Tabela 16 – Efeito do bloqueio dos receptores de endotelina com Tezosentan (10^{-8} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (6)	2,18± 0,10	ND
Diabética (6)	2,32 ± 0,07	ND
Controle Tezosentan (5)	2,11 ± 0,18	ND
Diabética Tezosentan (6)	1,50 ± 0,19**#	ND

Os valores de resposta máxima e pD_2 (-log EC50) representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2, pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. # $p < 0,05$ vs Controle Tezosentan. ** $p < 0,01$ vs Diabética.

3.3.2.6 Participação da Mobilização de Cálcio na Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

Para avaliar a participação da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, foi feita a administração de noradrenalina (10^{-7} M) em anéis de aorta com e sem endotélio incubados em solução de Krebs-Henseleit livre de Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM). Neste meio, a noradrenalina causou uma contração transiente e de pequena magnitude nas aortas de todos os grupos. A magnitude dessa contração foi menor em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas diabéticas (Figura 19; Tabela 17). A adição de $CaCl_2$ (2,5 mM) ao banho promoveu uma contração de grande magnitude e sustentada em anéis de aorta com e sem endotélio de ratas controles e diabéticas, sendo que a magnitude desta resposta foi menor em anéis de aorta de ratas diabéticas (Figura 20; Tabela 17).

Liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático

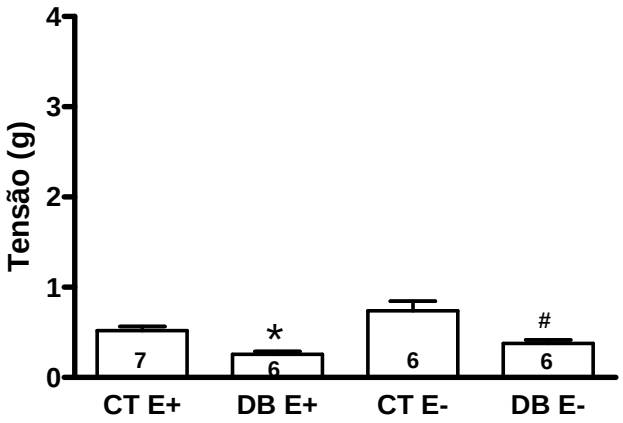


Figura 19 - Contração à noradrenalina (10^{-7} M) induzida pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB), em meio livre de Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM). * $p < 0,05$ vs CT E+. $^{\#}$ $p < 0,05$ vs CT E-.

Influxo de cálcio

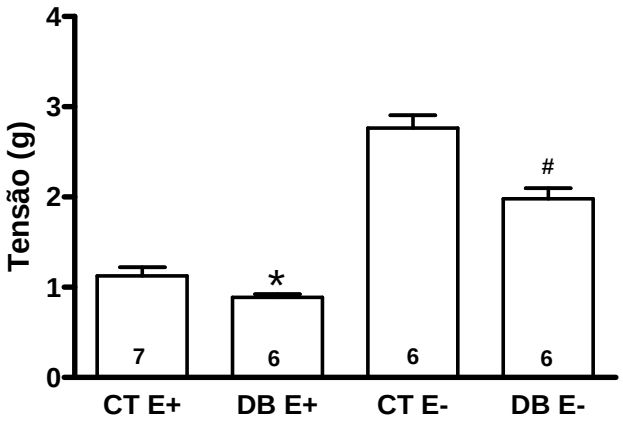


Figura 20 - Contração à noradrenalina (10^{-7} M) induzida pelo influxo de Ca^{2+} em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB), em meio acrescido de cloreto de cálcio (2,5 mM). * $p < 0,05$ vs CT E+. # $p < 0,05$ vs CT E-.

Tabela 17 – Mobilização de cálcio na resposta contrátil induzida pela noradrenalina (10^{-7} M) em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratas controles e diabéticas.

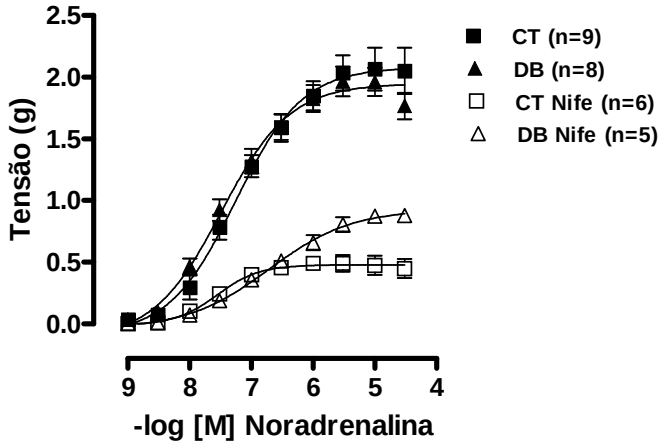
Grupo	**Contração (g) (meio livre de Ca^{2+})**	**Contração (g) (meio com Ca^{2+})**
Controle E+ (n=7)	0,52 ± 0,05	1,13 ± 0,09
Diabética E+ (n=6)	0,26 ± 0,03*	0,89 ± 0,04*
Controle E- (n=6)	0,74 ± 0,10	2,76 ± 0,14
Diabética E- (n=6)	0,38 ± 0,04#	1,98 ± 0,12#

Os valores representam a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Controle E+. # $p < 0,05$ vs Controle E-.

3.3.2.7 Participação dos Canais para Cálcio Dependente de Voltagem Tipo L na Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

A resposta contrátil à noradrenalina foi reduzida nas aortas com endotélio de controles e diabéticas após o bloqueio dos canais para cálcio dependente de voltagem tipo L com Nifedipina (10^{-5} M), sendo que essa redução foi de menor magnitude em anéis de aorta de ratas diabéticas comparadas a de ratas controles (Figura 21; Tabela 18).

A)



B)

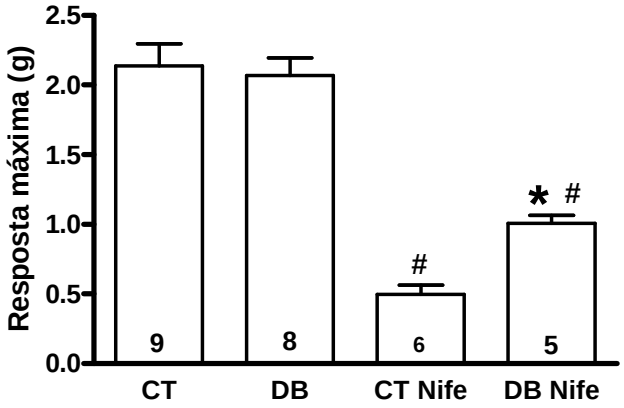


Figura 21 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio dos canais para cálcio dependente de voltagem com nifedipina (Nife, 10^{-5} M) em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. # $p < 0,001$vs respectivo grupo sem nifedipina; * $p < 0,05$ vs CT Nife.

Tabela 18 – Efeito do bloqueio dos canais para cálcio dependente de voltagem com nifedipina (10^{-5} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (n=9)	2,14 ± 0,16	ND
Diabética (n=8)	2,07 ± 0,12	ND
Controle Nifedipina (n=5)	0,50 ± 0,07#	ND
Diabética Nifedipina (n=6)	1,01 ± 0,05*#	ND

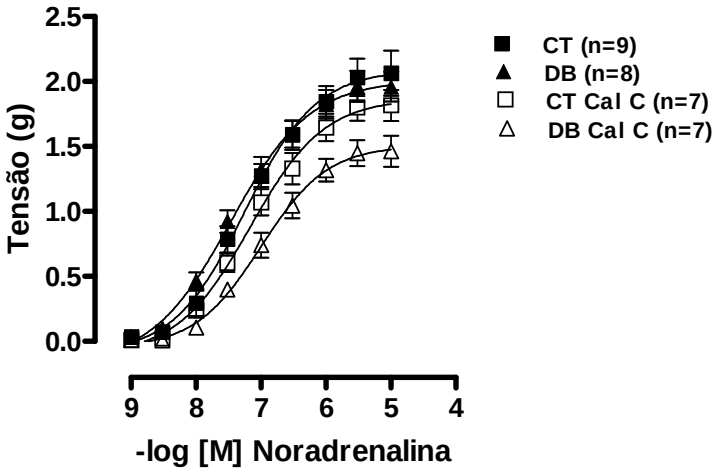
Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2, pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Controle Nifedipina. # $p < 0,001$ vs respectivo grupo sem Nifedipina.

3.3.2.8 Participação da PKC na Modulação da Resposta Vasoconstritora à Noradrenalina

A inibição da PKC com Calphostin C (Cal C, 10^{-7} M) diminuiu a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio de ratas diabéticas (24,6%), porém não alterou a de ratas controles (Figura 22, Tabela 19). Em anéis de aorta sem endotélio, a inibição da PKC diminuiu a resposta vasoconstritora à noradrenalina tanto em ratas controles (17,5%) quanto em ratas diabéticas (24,6%) (Figura 23, Tabela 20).

Anéis de aorta com endotélio

A)



B)

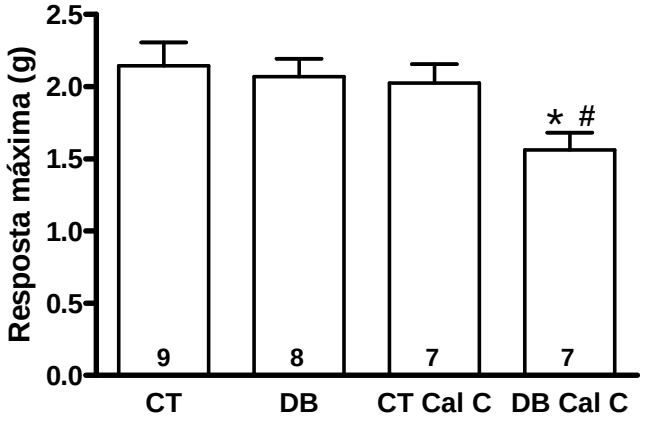


Figura 22 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio da enzima proteína cinase C (PKC) com Calphostin C (Cal C, 10^{-7} M) em anéis de aorta com endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. * $p < 0,05$ vs DB. # $p < 0,05$ vs CT Cal C.

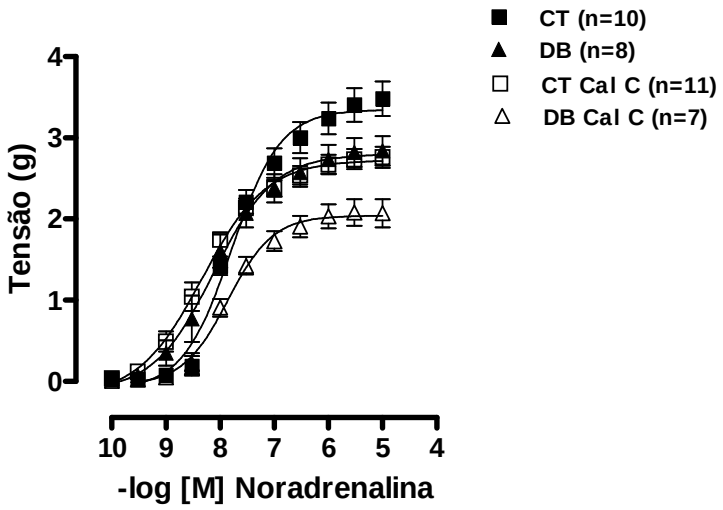
Tabela 19 – Efeito do bloqueio da enzima PKC com Calphostin C (10^{-7} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta com endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	Resposta máxima (g)	pD_2
Controle (n=9)	2,14 ± 0,16	ND
Diabética (n=8)	2,07 ± 0,12	ND
Controle Calphostin C (n=7)	2,03 ± 0,13	ND
Diabética Calphostin C(n=7)	1,56 ± 0,12*#	ND

Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2, pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Diabética. # $p < 0,01$ vs Controle Calphostin C.

Anéis de aorta sem endotélio

A)



B)

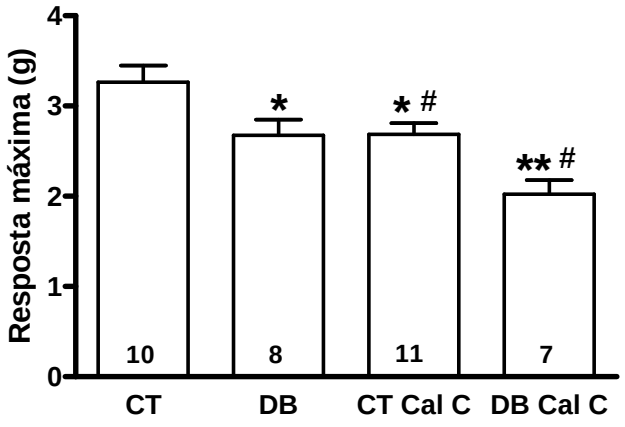


Figura 23 – Curva concentração-efeito **(A)** e resposta máxima **(B)** para a noradrenalina após o bloqueio da enzima proteína cinase C (PKC) com Calphostin C (Cal C, 10^{-7} M) em anéis de aorta sem endotélio de ratas controles (CT) e diabéticas (DB). Cada ponto representa a média ± epm do aumento de tensão (g). O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses ou no interior das barras. * $p < 0,05$ vs CT. # $p < 0,05$ vs respectivo grupo sem Calphostin C. ** $p < 0,01$ vs CT Cal C.

Tabela 20 – Efeito do bloqueio da enzima PKC com Calphostin C (10^{-7} M) sobre a resposta máxima à noradrenalina dos anéis de aorta sem endotélio de ratas controles e diabéticas.

Grupo	**Resposta máxima (g)**	**pD_2**
Controle (n=10)	3,26 ± 0,19	ND
Diabética (n=8)	2,68 ± 0,17*	ND
Controle Calphostin C (n=11)	2,69 ± 0,12*#	ND
Diabética Calphostin C (n=7)	2,02 ± 0,16**#	ND

Os valores de resposta máxima representam a média ± epm. ND= não foi determinado o pD_2, pois houve diferença significativa na resposta máxima. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$ vs Controle. # $p < 0,05$ vs respectivo grupo sem Calphostin C. ** $p < 0,01$ vs Controle Calphostin C.

3.4 Morfologia da parede do vaso

A espessura da parede, assim como a relação parede/luz, foi reduzida em aortas de ratas diabéticas (Figura 24).

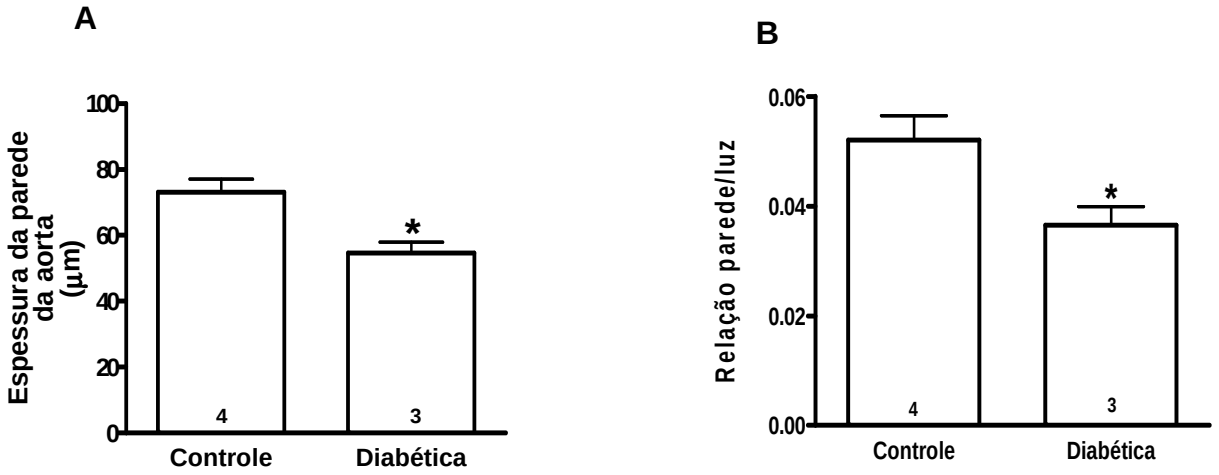


Figura 24 – Morfometria de aortas de ratas controles e diabética. A) Espessura da parede. B) Relação parede/luz. As barras representam a média ± epm. O número de ratas utilizadas em cada grupo encontra-se no interior das barras. * $p < 0,05$ vs Controle.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, a administração de aloxana (40 mg/kg) via intravenosa em ratas de 8-10 semanas provocou, após 30 dias, aumento da glicemia, diminuição dos níveis de insulina, diminuição do ganho de peso, aumento do consumo de ração e água e aumento do volume urinário, caracterizando o modelo de diabetes *mellitus* tipo 1.

As propriedades diabetogênicas da aloxana foram reportadas anos atrás por Dunn, Sheehan and McLethie (1943). Estes estudaram o efeito da administração de aloxana em coelhos e reportaram necrose das ilhotas pancreáticas. Desde então, o diabetes induzido por injeção de aloxana tem sido utilizado como um modelo de diabetes dependente de insulina (diabetes tipo1).

A destruição das ilhotas pancreáticas tem como conseqüência a ausência quase completa da secreção de insulina pelas células β-pancreáticas. A diminuição da secreção de insulina impede a captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina e, consequentemente, aumenta a glicemia. A redução da captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina promove redução do aporte energético nestes tecidos, promovendo a lipólise do tecido adiposo branco e proteólise do músculo esquelético para a liberação de substratos energéticos, tais como, ácidos graxos e aminoácidos. Um aumento na lipólise e proteólise tem como conseqüência redução no ganho de peso (LARSEN et al., 2003).

Outra característica presente neste modelo é a alteração do ciclo estral. O hipotálamo tem um papel central na regulação hormonal do sistema reprodutivo feminino. As sequências de eventos correspondentes ao ciclo menstrual são induzidas pela ação de hormônios do sistema hipotálamo-pituitário sobre o folículo ovariano (FRANZ, 1988). Em animais diabéticos, a diminuição na função hipotálamo-pituitária é caracterizada pelos baixos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) acompanhada por não mudança ou resposta diminuída ao estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (JOHNSON e SIDMAN, 1979; KIRCHICK et al., 1982; HOWLAND e ZEBROWSKY, 1980).

Alguns trabalhos mostram que a perda da ovulação em ratas diabéticas é devida à redução ou ausência da liberação de GnRH (BESTETTI et al., 1985; KATAYAMA et al., 1984). Outros têm indicado que a causa da perda reprodutiva em

ratas diabéticas é a incapacidade da hipófise dessas ratas de responderem ao GnRH (BESTETTI et al., 1985; KIRCHICK et al., 1979). Estes parâmetros alterados em animais diabéticos são corrigidos pelo tratamento com insulina (BESTETTI et al., 1987). Esses dados mostram que a insulina tem importante papel na regulação e manutenção da função reprodutiva. O tratamento com insulina de ratas diabéticas por aloxana também restaurou o ciclo estral, assim como o peso uterino destas ratas (AKAMINE et al., 2006a). A falta de insulina pode, portanto, comprometer o ciclo menstrual da mulher ou estral de ratas. Em nosso estudo, também observamos cessação do ciclo estral, sendo que ratas diabéticas apresentaram-se constantemente na fase de diestro e tiveram redução do peso uterino, indicando uma deficiência de hormônios sexuais. A deficiência de hormônios sexuais foi confirmada pela dosagem de progesterona, sendo que a concentração deste hormônio está reduzida em ratas diabéticas. O estrógeno também foi dosado, no entanto, pela técnica que foi utilizada, não conseguimos detectar este hormônio no soro de ratas diabéticas. Esse experimento será repetido para confirmação do resultado. Frente a estes resultados, optamos por utilizar ratas controles também em diestro em nosso estudo para melhor comparação.

Os hormônios sexuais femininos exercem importantes ações cardioprotetoras (TOSTES et al., 2003). Entre pessoas de meia idade, homens têm de 2 a 5 vezes mais risco para desenvolver doenças cardiovasculares que mulheres (TUNSTALL-PEDOE et al., 1994). Contudo, no estado diabético, mulheres pré-menopausadas perdem o efeito cardioprotetor dos hormônios sexuais femininos (KANNEL 1987; STEINBERG et al., 2000; DI CARLI et al., 2002; MAYHAN et al., 2002). Quando comparamos homens e mulheres com diabetes, mulheres diabéticas têm o dobro do risco de desenvolver doença coronariana (LEGATO et al., 2006). Mulheres pré-diabéticas mostram aumento dos biomarcadores da disfunção endotelial, enquanto que em homens isto não foi observado (DONAHUE et al., 2007). Além disso, a redução na produção de óxido nítrico foi mais pronunciada em vasos de mulheres diabéticas, quando comparadas com homens (STEINBERG et al., 2000). Porém, a razão para o maior risco relativo de doenças cardiovasculares em mulheres diabéticas que em homens diabéticos ainda não está totalmente esclarecida.

A diferença sexual observada nas alterações vasculares promovidas pela hiperglicemia e diabetes também está presente em modelos animais. Estudos

mostram diferenças relacionadas ao sexo na resposta vasodilatadora e vasoconstritora. A resposta vasodilatadora à acetilcolina em aortas de animais diabéticos (PINNA et al., 2001) ou incubadas em meio com alta concentração de glicose (GOEL et al., 2007, 2008), em arteríolas mesentéricas e artéria basilar de animais diabéticos (MAYHAN et al., 2002; TOLEDO et al., 2003) é mais reduzida no gênero feminino. Já a resposta vasoconstritora é aumentada apenas em arteríolas mesentéricas de camundongos fêmeas diabéticas enquanto que em machos diabéticos não há alteração desta resposta (MATSUMOTO et al., 2008). Estes resultados indicam que as alterações vasculares induzidas pelo diabetes parecem ser mais prejudiciais em fêmeas.

Apesar dessas importantes diferenças sexuais observadas nas alterações vasculares promovidas pelo diabetes ou pelas altas concentrações de glicose, os mecanismos envolvidos nessas alterações são bem estudados e demonstrados em machos, mas não são bem conhecidos em fêmeas e poucos estudos nessa área têm empregado esse gênero (TAYLOR et al., 1992; BOLEGO et al., 1999; TOLEDO et al., 2003). Os mecanismos propostos para explicar a disfunção endotelial em machos incluem diminuição da eficiência das vias de transdução, diminuição da liberação de EDRFs, aumento da destruição de EDRFs e aumento da liberação de EDCFs (De VRIESE et al., 2000).

A resposta vasodilatadora dependente do endotélio é considerada um importante parâmetro para o estudo da função endotelial. Resultados de estudos da resposta vasodilatadora de aortas de ratos diabéticos são conflitantes. Foi observada redução (OYAMA et al., 1986; DURANTE e SUNAHARA, 1988; ABEBE, 2008) ou não alteração (FORTES et al., 1983b; HARRIS e MACLEOD, 1988; HEAD et al., 1987; XAVIER et al., 2003) da resposta vasodilatadora dependente do endotélio à acetilcolina e histamina. Em nosso estudo, a resposta de aortas de ratas diabéticas e controles à acetilcolina não diferem, sendo que o mesmo foi observado em ratos diabéticos pelo nosso grupo (FORTES et al.,1983b). Mesmo não observado diferença na resposta vasodilatadora à acetilcolina, fomos investigar a participação do óxido nitrico na resposta à acetilcolina. Em estudo recente foi observado que apesar da participação do óxido nítrico na resposta à acetilcolina estar reduzida em vasos de animais diabéticos, a resposta a este agente vasodilatador não foi alterada nestes animais, e isto ocorreu devido a um aumento da participação dos prostanóides vasodilatadores (NACCI et al., 2009). No nosso

estudo, após a inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME, a redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina foi de mesma magnitude em aortas de ratas controles e diabéticas, mostrando que a participação do óxido nitrico nesta resposta vasodilatadora é similar em ambos os grupos.

O diabetes parece afetar diferentemente a resposta relaxante dependente do endotélio à acetilcolina nos diferentes leitos vasculares, uma vez que diferentemente do observado em aortas de ratas diabéticas, a resposta à acetilcolina em arteríolas mesentéricas está reduzida (AKAMINE et al., 2006a,b). Semelhantemente ao nosso trabalho, TAYLOR e colaboradores (1994) observaram em ratas diabéticas por estreptozotocina, redução na vasodilatação dependente do endotélio somente no leito arteriolar mesentérico. Uma explicação plausível é que o estado hiperglicêmico parece prejudicar inicialmente os microvasos (FORTES et al., 1983b; PEREDO et al., 2006). Alguns trabalhos realizados com aortas de ratos diabéticos demonstraram que a redução da vasodilatação dependente do endotélio só é observada depois de 8 semanas após a indução do diabetes (CHANG e STEVENS, 1992; PIEPER, 1999; CSANYI, et al., 2007). O fato de termos utilizado ratas após 4 semanas de indução do diabetes, pode ser uma razão pela qual não observamos alteração da resposta à acetilcolina. E mais, como a resposta vasodilatadora a outro vasodilatador dependente do endotélio, histamina, foi semelhante entre controles e diabéticas, podemos sugerir que a interação com receptores colinérgicos e histaminérgicos não sofre alterações pelo menos até 4 semanas de diabetes.

Para explicar a ausência de redução da resposta dependente do endotélio em ratas diabéticas, pode-se levantar a hipótese de que ocorreu aumento da resposta do músculo liso ao NO. Isso pode ser descartado em nosso estudo, pois a resposta ao nitroprussiato de sódio, doador de NO, foi semelhante em diabéticas e controles tanto em anéis com endotélio quanto em anéis sem endotélio. O mesmo é observado para aortas de ratos diabéticos em outros estudos (PIEPER, 1999; XAVIER et al., 2003).

Respostas conflitantes também são encontradas quando se investiga a contração vascular. Em trabalhos feitos com aortas de machos diabéticos, os autores mostram resposta normal (FORTES et al., 1983b; PIEPER et al., 1996; FULTON et al., 1991) ou diminuída (HEAD et al., 1987; PFAFFMAN et al., 1982; ZHU et al., 2001), enquanto que outros mostram aumento da contração (MACLEOD, 1985; HARRIS e MACLEOD, 1988; CHANG et al., 1993) para diferentes agentes

vasoconstritores como a noradrenalina, fenilefrina e cloreto de potássio. Em nosso estudo observamos que a resposta contrátil ao agente despolarizante cloreto de potássio está reduzida em aortas com e sem endotélio de ratas diabéticas. Ao adicionar cloreto de potássio ao banho avalia-se a viabilidade do músculo liso vascular, pois ao aumentar a concentração de K^+ extracelular, reduz-se o efluxo de K^+ da célula muscular lisa pelos canais para K^+ da membrana celular e, assim, o meio intracelular torna-se menos negativo e despolariza-se. A despolarização leva à abertura de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem, presentes na membrana da célula muscular lisa, promovendo o influxo de Ca^{2+} e consequentemente a contração.

Diferentemente do observado com o cloreto de potássio, agente vasoconstritor independente de receptor, a resposta contrátil induzida por um agente vasoconstritor dependente de receptor em aortas com endotélio não foi diferente entre os grupos estudados. O mesmo foi observado por TAYLOR e colaboradores (1994) em aortas de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. No entanto, com a remoção do endotélio observamos resposta contrátil induzida pela noradrenalina reduzida em aortas de ratas diabéticas quando comparadas com aortas de ratas controles sem endotélio.

A retirada do endotélio potencializa a resposta contrátil à noradrenalina e ao cloreto de potássio em aorta de ratos (CARRIER e WHITE, 1985; ABEBE e MOZAFFARI, 2000). Isto pode ocorrer porque o endotélio libera fatores relaxantes que se contrapõem à contração promovida por agentes constritores (GRIFFITH et al., 1984; MARTIN et al., 1986).

Visto que em nosso estudo a retirada do endotélio de aortas de ratas diabéticas não potencializa a resposta contrátil aos agentes vasoconstritores na mesma magnitude que em aortas de ratas controles, podemos sugerir que o endotélio destes animais tem menor participação na modulação da resposta contrátil.

O principal fator relaxante liberado pelo endotélio em artérias de condutância é o NO (GARLAND e MCPHERSON, 1992; GARLAND et al., 1995). Semelhantemente à retirada do endotélio, aortas tratadas com inibidores da NOS também apresentam aumento da resposta à noradrenalina (KANEKO e SUNANO, 1993), mostrando que a liberação de NO em resposta aos agonistas

vasoconstritores é responsável pela atenuação da resposta contrátil induzida por estes.

A noradrenalina estimula a NOS por atuar nos adrenoreceptores alfa-2 e/ou alfa-1 no endotélio, promovendo a síntese de NO (BOCKMAN et al., 1996; DOCHERTY, 1998; FABER et al., 2001; VANDEPUTE et al., 2003). Após a inibição da síntese de NO, a resposta à noradrenalina não foi potencializada em aortas de ratas diabéticas como ocorreu nas controles, isso indica que a modulação dessa resposta pelo NO está ausente. Apesar de não termos avaliado de forma direta a produção de NO, isto pode ser um indicativo da redução de sua produção. Isso pode contribuir para a menor participação do endotélio na resposta à noradrenalina em aortas de ratas diabéticas.

Porém a hipótese de redução dos receptores alfa-2, alfa-1 e/ou alterações na sinalização intracelular desencadeada pela ativação destes na célula endotelial e no músculo liso não podem ser descartadas, visto que a ativação da eNOS não parece estar diminuída, pois a resposta aos agentes vasodilatadores dependente do endotélio não esta reduzida em aortas de ratas diabéticas.

Um fator que pode ser o responsável pela redução da modulação do NO na resposta contrátil à noradrenalina é o aumento de ânion superóxido. Este radical livre reage com o NO, diminuindo a biodisponibilidade deste para o músculo liso. Diversos trabalhos mostram que o ânion superóxido tem participação nas alterações vasculares encontradas nos vasos de animais diabéticos. Foi observado que o tratamento com SOD que metaboliza o ânion superóxido, melhora a vasodilatação dependente do endotélio em vasos de condutância de humanos e animais diabéticos (DE VRIESE et al.; 2000, DAI et al.; 1993; DIEDERICH et al., 1994; HATTORI et al.; 1991; PIEPER, 1998; TIMIMI et al., 1998) e reduz o aumento da contração em aortas de ratos diabéticos (CHANG et al., 1993). Em nosso estudo, a participação do ânion superóxido parece ser essencial para a modulação da resposta contrátil em aortas de ratas controles, pois a retirada do ânion superóxido atenuou a resposta contrátil à noradrenalina provavelmente aumentando a biodisponibilidade de NO. Em aortas de ratas diabéticas, diferentemente, a incubação com SOD não alterou a resposta máxima à noradrenalina. Possivelmente o ânion superóxido não participa da resposta à noradrenalina, diminuindo a biodisponibilidade de NO, reforçando a sugestão de que há redução da produção de NO.

Além da redução da produção de NO estimulada pela noradrenalina, podemos sugerir que o endotélio de aorta de ratas diabética libera algum fator contrátil, mantendo assim a resposta vasoconstritora, uma vez que a resposta a este agonista adrenérgico, na presença do endotélio, foi semelhante à de ratas controles e a resposta da aorta sem endotélio foi reduzida. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que a aorta com e sem endotélio de ratas diabéticas apresentaram redução da resposta contrátil também ao cloreto de potássio, visto que este último é independente de receptor e da liberação de fatores contráteis pelo endotélio, dando suporte à conclusão que a diminuição da resposta contrátil à noradrenalina é devida a alterações no aparato contrátil e que o endotélio de ratas diabéticas mantém a resposta contrátil à noradrenalina, devido ao aumento da liberação de fatores contráteis endoteliais.

O endotélio libera fatores contráteis e relaxantes mantendo o tônus vascular. Entre os fatores contráteis liberados pelo endotélio, encontram-se os prostanóides vasoconstritores sintetizados a partir das ciclo-oxigenases 1 e 2. As ciclo-oxigenases são enzimas que catalisam a conversão do ácido araquidônico e oxigênio em intermediários endoperóxidos prostaglandina (PG) G_2 e PGH_2, este por sua vez é substrato para a síntese de prostaglandinas e tromboxano. O TXA_2 é um potente vasoconstritor e dos prostanóides produzidos na parede vascular, a PGI_2 relaxa, porém trabalhos recentes mostram que este pode contrair (GLUAIS et al., 2005), enquanto o $PGF_{2\alpha}$ e PGH_2 contraem o músculo liso vascular.

Alguns autores mostram que o diabetes altera a síntese vascular de prostanóides, com aumento da síntese dos prostanóides vasoconstritores (STERIN-BORDA et al., 1984; MYERS et al., 1985). Além disso, a expressão da ciclo-oxigenase-2 está aumentada em aortas de ratas (LI et al., 2008) e camundongos femêas (GUO et al., 2005) diabéticas e em aorta e arteríolas mesentéricas de camundongos diabéticos (BAGI et al., 2005; NACCI et al., 2009). Apesar da expressão desta enzima estar aumentada tanto em aorta quanto em arteríolas mesentéricas de animais diabéticos, propõe-se que as arteríolas mesentéricas são mais sensíveis aos efeitos do diabetes sobre a produção dos prostanóides do que a aorta, visto que o padrão de liberação de prostanóides trinta dias após a indução do diabetes está alterado apenas em arteríolas mesentéricas (PEREDO et al., 2006). Podemos observar esse padrão também em ratas diabéticas. Em nosso laboratório, verificamos que no leito arteriolar mesentérico, a liberação de prostanóides

vasoconstritores está aumentada em ratas diabéticas (AKAMINE et al., 2006b). Por outro lado, no presente estudo, a inibição da ciclo-oxigenase com indometacina, inibidor não seletivo de COX (inibe tanto a COX-1 quanto a -2) ou com NS-398, inibidor específico da COX-2, reduziram a resposta máxima à noradrenalina em aortas dos grupos diabéticas e controles.

Os produtos da COX, principalmente os produtos da COX-2, parecem ser essenciais para manter a resposta contrátil induzida pela noradrenalina, tanto em aortas de ratas controles quanto em aortas de ratas diabéticas. O fato de tanto a incubação com indometacina quanto a incubação com NS-398 ter reduzido a resposta à noradrenalina em aortas de ratas diabéticas e controles na mesma magnitude, permite sugerir que os prostanóides vasoconstritores não são os responsáveis pela manutenção da resposta à noradrenalina em aortas de ratas diabéticas.

Outros fatores contráteis que são liberados pelo endotélio e podem ser responsáveis pela manutenção da resposta contrátil em aortas de ratas diabéticas são a angiotensina II e a endotelina.

A angiotensina II atua em receptores AT1 e AT2, que pertencem à família de proteínas G. No caso dos receptores AT1, o acoplamento ocorre principalmente via proteína G que ativa a fosfolipase C-beta (PLC-β) , aumentando os níveis de DAG e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que elevam a concentração de Ca^{2+} intracelular, promovendo a ativação de proteínas cinases que modulam diversas funções vasculares, como por exemplo, contração vascular.

Três diferentes isoformas de endotelinas foram inicialmente identificadas, ET-1, ET-2 e ET-3. Essas endotelinas atuam em receptores ET_A e ET_B. O tipo ET_A apresenta maior afinidade para ET-1, e é expresso principalmente em células do músculo liso vascular e cardíaco, enquanto o tipo ET_B, com afinidade para as três isoformas de endotelina, é expresso em células endoteliais e também no músculo liso vascular. Ambos os tipos de receptores pertencem à família de receptores acoplados a proteínas G. Sua ativação promove despolarização da membrana plasmática, aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e contração vascular.

Peptídeos vasoativos tais como angiotensina II e ET-1, os quais podem ser sintetizados localmente na vasculatura, têm sido implicados na disfunção vascular induzida pelo diabetes, incluindo remodelamento vascular, hipertrofia, e proliferação do músculo liso vascular (ERGUL et al., 2005; GROOP et al., 2005; KYAW et al.,

2002; MARRERO et al., 1997; SACHIDANANDAM et al., 2006; SOWERS et al., 1995), redução do relaxamento para vasodilatadores ou resposta exacerbada para vasoconstritores. O nível de ET-1 e angiotensina II tem sido mostrada estar elevado no plasma de humanos diabéticos tipo 1 e 2, em modelos experimentais (COLLIER et al., 1992; HARGROVE et al., 2000; LEWIS et al., 1993), bem como em célula endotelial aórtica na presença de alta glicose (KEYNAN et al., 2004; LAVRENTYEV et al., 2007; PARK et al., 2000). O aumento dos níveis desses peptídeos pode contribuir para as complicações vasculares do diabetes.

De fato, trabalhos mostram que o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor de angiotensina II em pacientes diabéticos melhora significantemente as complicações micro e macrovasculares (Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, 2000; LINDHOLM et al., 2002). O bloqueio dos receptores para endotelina também melhora as complicações vasculares em humanos (SHEMYAKIN et al., 2006, MATHER et al., 2002) e em animais diabéticos (SACHIDANANDAM et al., 2008, DUMONT et al., 2003).

Frente a estes resultados, investigamos a participação destes dois fatores contráteis na resposta à noradrenalina em aortas com endotélio de ratas controles e diabéticas. Para isto, utilizamos antagonistas para receptores de angiotensina II e endotelina. No nosso estudo, observamos que a participação da angiotensina II na resposta à noradrenalina é semelhante entre ratas controles e diabéticas. Já a endotelina parece ser o fator contrátil liberado pelo endotélio, responsável pela manutenção da resposta à noradrenalina em aortas de ratas diabéticas, visto que o bloqueio do receptor de endotelina reduziu a resposta máxima nas ratas diabéticas.

Uma vez que alterações no aparato contrátil podem ser os responsáveis pela redução da função contrátil de aortas de ratas diabéticas e o cálcio tem importante participação na contração do músculo liso vascular, investigamos a participação desse íon na resposta à noradrenalina, pois uma possível explicação para a resposta diminuída à noradrenalina poderia ser a redução da participação tanto do cálcio intracelular quanto do cálcio extracelular na contração.

A contração vascular induzida pela noradrenalina ocorre em dois passos consecutivos, cuja origem do cálcio e duração da contração são diferentes. A liberação de cálcio intracelular é responsável pela resposta inicial rápida induzida pela noradrenalina, seguida de uma contração lenta e sustentada devida à entrada

do cálcio extracelular (BOHR, 1963; DETH e VAN BREEMEN, 1974; GRAND e RINALDI, 1990; RINALDI et al., 1991).

Nas células do músculo liso vascular, o Ca^{2+} é estocado intracelularmente no retículo sarcoplasmático. O retículo sarcoplasmático contém no mínimo dois tipos de canais de liberação de Ca^{2+}, isto é, canal sensível ao IP_3 (receptor para IP_3) e canal sensível à planta rianodina e à cafeína (receptor para rianodina) (LESH et al., 1998; IINO, 1990). Quando a noradrenalina liga-se aos receptores adrenérgicos no músculo liso vascular, ocorre a ativação da fosfolipase C (PLC). A PLC é ativada pela subunidade α da proteína G acoplada ao receptor de noradrenalina, degrada os fosfolipídios de membrana, fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em: IP_3 e DAG. O IP_3 atua nos receptores para IP_3 do retículo sarcoplasmático e ocorre a liberação de Ca^{2+} e o DAG estimula a PKC, consequentemente, ocorre aumento do Ca^{2+} intracelular e da sensibilidade das proteínas contráteis a este íon. A outra origem de cálcio para promover a contração induzida pela noradrenalina é o influxo de cálcio. Os canais para cálcio presentes na membrana plasmática são as principais rotas de entrada de cálcio no músculo liso vascular. Muitos tipos de canais para Ca^{2+} localizados na membrana têm sido propostos existir nas células do músculo liso, incluindo canais para Ca^{2+} operados pela voltagem, canais para Ca^{2+} operados por receptor e canais para Ca^{2+} operados pelo estoque (SOMLYO e SOMLYO, 1994; ORALLO, 1996; HUGHES, 1995).

Ambos os componentes da contração podem ser afetados pelo diabetes, liberação de cálcio intracelular e influxo (SCARBOROUGH e CARRIER, 1984; RINALDI e CINGOLANI, 1992). Em aortas de ratos diabéticos foi observado aumento da liberação intracelular e do influxo de cálcio (ABEBE et al., 1994; ABEBE, 2008) e redução da liberação de cálcio intracelular em cultura de células do músculo liso (MA et al., 2008).

No presente trabalho, demonstramos que a contração à noradrenalina (10^{-7} M) em meio livre de cálcio, condição em que a contração a este agonista é totalmente dependente do cálcio proveniente do retículo sarcoplasmático, está diminuída em aorta com e sem endotélio de ratas diabéticas em relação às controles. Isso pode indicar que a mobilização do cálcio proveniente do retículo sarcoplasmático está prejudicada. Redução da liberação de Ca^{2+} via receptores de IP_3 e/ou diminuição da expressão de receptores para IP_3 poderia explicar essa alteração. De fato, em cultura de células de músculo liso de ratos diabéticos foi

demonstrada redução da expressão de receptores para IP_3 e da liberação de Ca^{2+} via este receptor (SHARMA et al., 2003; MA et al., 2008). É provável que também em ratas diabéticas, a redução da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático possa envolver redução dos receptores para IP_3. Isso poderia contribuir para a redução da resposta vasoconstritora à noradrenalina do músculo liso vascular.

No mesmo experimento em que verificamos a menor participação do cálcio intracelular na resposta do músculo liso à noradrenalina (10^{-7} M), observamos que a participação do cálcio extracelular (2,5 mM) também é menor em anéis de aorta de ratas diabéticas.

O canal para cálcio dependente de voltagem tipo L representa a principal população de canais para cálcio dependente de voltagem no músculo liso vascular. Como a redução da resposta máxima à noradrenalina, após o bloqueio do canal para cálcio tipo L, foi de menor magnitude em aorta com endotélio de ratas diabéticas, podemos concluir que este canal tem menor participação na resposta vasoconstritora à noradrenalina em aortas de ratas diabéticas quando comparadas com as de ratas controles, reforçando a sugestão da menor mobilização do cálcio extracelular na resposta contrátil à noradrenalina em aorta de ratas diabéticas. Apesar de mostrarmos que em aortas de ratas diabéticas há uma redução na mobilização de cálcio, não podemos descartar a hipótese de uma redução na sensibilidade das proteínas contráteis a este íon.

Uma enzima que está envolvida com a sensibilização dos miofilamentos ao cálcio é a PKC. A PKC é essencial para a manutenção da contração em situações fisiológicas. Recentemente foi demonstrado que a inibição da PKC reduz a contração em anéis de aorta sem endotélio de ratos controles (JIN et al., 2008). Estudos demonstram que a PKC medeia a via de sensibilização e aumenta a contração do músculo liso vascular por inibir a fosfatase da cadeia leve de miosina, enzima que desfosforila a cadeia leve de miosina, e por inibir a ATPase actomiosina (SOMLYO e SOMLYO, 2003; WIER e MORGAN, 2003).

Outro aspecto importante da PKC é o seu papel nas complicações vasculares presentes no diabetes. Estudos mostram que em diferentes territórios vasculares como na retina, rim e aorta de animais diabéticos (KOYA e KING, 1998; DERUBERTIS e CRAVEN, 1995; WILLIAMS, 1995; BAYNES, 1991; INOGUCHI et al., 1992; KUNISAKI et al., 1994), em cultura de células endoteliais e de células do músculo liso vascular em meio contendo alta concentração de glicose (INOGUCHI

et al., 1994; LEE et al., 1999) ocorre a ativação da via DAG-PKC. Ainda, tanto inibidores inespecíficos quanto específicos da PKC melhoram as principais complicações induzidas pelo diabetes ou hiperglicemia, tais como aumento da resposta vasoconstritora e redução da resposta vasodilatadora (TESFAMARIAM et al., 1991; NANGLE et al., 2003; GOEL et al., 2008; KHAZAEI et al., 2008). Alguns mecanismos são propostos para explicar como o aumento da atividade da PKC leva à disfunção endotelial. A PKC reduz a atividade da eNOS via fosforilação (HIRATA et al., 1995), aumenta a produção de ânion superóxido (HINK et al., 2001) e também promove alterações na atividade de algumas enzima que participam do processo contrátil, tais como, Na^+K^+ATPase, PLA_2 (Fosfolipase A_2) e MAP cinase (do inglês, "Mitogen Activated Protein") (DAS EVCIMEN e KING, 2007). Em nosso estudo, na presença do endotélio, a inibição aguda da PKC provocou redução da resposta máxima à noradrenalina apenas em ratas diabéticas (24,6%), enquanto que em anéis de aorta sem endotélio, a redução ocorreu em aortas de ratas controles (17,5%) e diabéticas (24,6%). Uma vez que a porcentagem de redução da resposta contrátil foi semelhante em aortas com e sem endotélio, podemos sugerir que o endotélio de aorta de ratas diabéticas não é capaz de compensar a inibição da atividade da PKC e manter a resposta contrátil, diferentemente do observado em aortas de ratas controles.

Outras alterações podem estar ocorrendo e contribuir para a redução da resposta à noradrenalina, entre elas alterações morfológicas, como por exemplo, redução da camada de músculo liso. De fato, em nosso estudo observamos redução da espessura da parede o que pode contribuir para a redução da resposta contrátil. Contudo mais estudos precisam ser feitos para confirmar está hipótese.

Em resumo, o presente trabalho mostra que em aortas de ratas diabéticas a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio em resposta a agentes vasodilatadores ou a resposta do músculo liso ao óxido nítrico não estão alterados, e a participação do óxido nitrico na resposta à acetilcolina não difere do grupo controle. Nossos resultados mostram ainda que as alterações no aparato contrátil podem ser decorrentes da menor mobilização do cálcio extracelular na resposta à noradrenalina em aortas de ratas diabéticas. A manutenção da resposta contrátil à noradrenalina pelo endotélio de ratas diabéticas também parece ser dependente da PKC. A redução da espessura da parede da aorta pode ser indicativo de redução da camada de músculo liso e pode ser outro fator responsável pela redução da

resposta contrátil em ratas diabéticas. Podemos sugerir ainda que o endotélio de aortas de ratas diabéticas é responsável por manter a resposta contrátil. A redução da modulação do NO sobre a resposta à noradrenalina ou o aumento da liberação de endotelina podem ser os responsáveis pela manutenção da resposta contrátil à noradrenalina em aortas com endotélio de ratas diabéticas. Diferentemente, o ânion superóxido, a angiotensina II e os produtos da COX não parecem ser os responsáveis pela manutenção da resposta contrátil.

5 CONCLUSÕES

Em aortas de ratas diabéticas:

1) A liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio em resposta a agentes vasodilatadores ou a resposta do músculo liso ao óxido nítrico não parecem estar alterados e a participação do NO na resposta à acetilcolina não difere do grupo controle;

2) Alterações no aparato contrátil, como por exemplo, redução na liberação e influxo de cálcio podem ser os responsáveis pela redução da resposta contrátil nestas ratas;

3) O canal para cálcio tipo L tem menor participação na resposta vasoconstritora à noradrenalina quando comparadas com as de ratas controles, reforçando a sugestão da menor mobilização do cálcio extracelular na resposta à noradrenalina nestes animais;

4) A manutenção da resposta contrátil à noradrenalina pelo endotélio parece ser também dependente da PKC;

5) A redução da espessura da parede da aorta pode ser indicativo da redução da camada do músculo liso, e pode contribuir para a redução da resposta contrátil;

6) O endotélio mantém a resposta contrátil à noradrenalina;

7) A redução da modulação do NO sobre a resposta à noradrenalina ou o aumento da liberação de endotelina podem ser os responsáveis pela manutenção da resposta contrátil à noradrenalina;

8) O ânion superóxido, a angiotensina II e os produtos da COX não parecem ser os responsáveis pela manutenção da resposta contrátil.

6 REFERÊNCIAS

ABEBE, W.; HARRIS, K.H.; MACLEOD, K.M. Role of extracellular Ca2+ in the selective enhancement of contractile responses of arteries from diabetic rats to noradrenaline. **Can. J. Physiol. Pharmacol.,** v. 72, n. 12, p. 1544-1551, 1994.

ABEBE, W.; MOZAFFARI, M.S. Effects of chronic taurine treatment on reactivity of the rat aorta. **Amino Acids**, v.19, n.3-4, p. 615-623, 2000.

ABEBE, W. Effects of taurine on the reactivity of aortas from diabetic rats.**Life Sci**., v. 82, n. 5-6, p. 279-289, 2008.

AKAMINE, E.H.; HOHAMN, C.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.C.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Minalrestat, an aldose reductse inhibitor, corrects the impaired microvascular reactivity in diabetes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 304, n. 3, p. 1236-1242, 2003.

AKAMINE, E.H.; KAWAMOTO, E.M.; SCAVONE, C.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.; TOSTES, R.C.; BRITTO, L.R.; FORTES, Z.B. Correction of endothelial dysfunction in diabetic female rats by tetrahydrobiopterin and chronic insulin. **J. Vasc. Res.,** v. 43, n. 4, p. 309-320, 2006a.

AKAMINE, E.H; URAKAWA, T.A.; OLIVEIRA, M.A.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.; TOSTES, R.C.; FORTES, Z.B. Decreased endothelium-dependent vasodilation in diabetic female rats: Role of prostanoids. **J. Vasc. Res.**, v. 43, n. 5, p. 401-410, 2006b.

BAGI, Z.; ERDEI, N.; TOTH, A.; LI, W.; HINTZE, T.H.; KOLLER, A.; KALEY, G. Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-derived constrictor prostaglandins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**., v. 25, n. 8, p. 1610-1616, 2005.

BARRETT-CONNOR, E.; WINGARD; D.L. Sex differential in ischemic heart disease mortality in diabetics: a prospective population-based study. **Am. J. Epidemiol.,** v. 118, n. 4, p. 489–496, 1983.

BAYNES J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes,** v. 40, n. 4, p. 405-412, 1991.

BESTETTI, G.; LOCATELLI, V.; TIRONE, F.; ROSSI, G.L.; MÜLLER, E.E. One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats. **Endocrinology.,** v. 117, n. 1, p. 208-216, 1985.

BESTETTI, G.E.; JUNKER, U.; LOCATELLI, V.; ROSSI, G.L. Continuous subtherapeutic insulin counteracts hypothalamopituitary-gonadal alterations in diabetic rats. **Diabetes,** v. 36, n. 11, p. 1315-1319, 1987.

BITAR, M.S.; WAHID, S.; MUSTAFA, S; AL-SALEH, E.; DHAUNSI, G.S.; AL-MULLA, F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 511, n. 1, p. 53-64, 2005

BOCKMAN, C.S., GONZALES-CABRERA, I., ABEL, P.W. Alpha2-adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 278, n. 3, p. 1235– 1243, 1996.

BOHLEN, H.G. Localization of vascular resistance changes during hypertension. **Hypertension**, v. 8, n. 3, p. 181-183, 1986.

BOHR, D.F. Vascular smooth muscle: dual effect of calcium. **Science,** v. 139, n. 3555, p. 597-599, 1963.

BOLEGO, C.; CIGNARELLA, A.; RUZZA, R.; ZAAROUR, C.; MESSI, E.; ZANISI, M.; PUGLISI, L. Differential effects of low- and high-dose estrogen treatments on vascular responses in female rats. **Life Sci.,** v. 60, n. 25, p. 2291-2302, 1997.

BOLEGO, C.; CIGNARELLA, A.; ZANCAN, V.; PINNA, C.; ZANARDO, R.; PUGLISI, L. Diabetes abolishes the vascular protective effects of estrogen in female rats. **Life Sci.,** v. 64, n. 9, p. 741-749, 1999.

BOUTOUYRIE, P.; TROPEANO, A.I.; ASMAR, R.; GAUTIER, I.; BENETOS, A.; LACOLLEY, P.; LAURENT, S. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. **Hypertension,** v. 39, n. 1, p. 10-15, 2002.

CALVER, A.; COLLIER, J.; VALLANCE, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.,** v. 90, n. 6, p. 2548-2554, 1992.

CAMERON, N.E.; COTTER, M.A. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. **Diabetologia,** v. 35, n.11, p. 1011-1019, 1992.

CARRIER, G.O.; WHITE, R.E. Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 232, n. 3, p. 682-687, 1985.

CHANG, K.S.; STEVENS, W.C. Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta. **Br. J. Pharmacol.,** v. 107, n. 4, p. 983-990, 1992.

CHANG, K.C.; CHUNG, S.Y.; CHONG, W.S.; SUH, J.S.; KIM, S.H.; NOH, H.K.; SEONG, B.W.; KO, H.J.; CHUN, K.W. Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 266, n. 2, p. 992-1000, 1993.

CHINEN, I.; SHIMABUKURO, M.; YAMAKAWA, K.; HIGA, N.; MATSUZAKI, T.; NOGUCHI, K.; UEDA, S.; SAKANASHI, M.; TAKASU, N. Vascular lipotoxicity:

endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p.160-165, 2007.

CIRINO, G.; SORRENTINO, R.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; PINTO, A. Indomethacin and thromboxane A2/prostaglandin H2 antagonist SQ29,548 impair in vitro contractions of aortic rings of ex vivo-treated lipopolysaccharide rats. **J. Lipid. Mediat. Cell. Signal.,** v. 13, n. 2, p. 177-187, 1996.

CLOZEL, M.; RAMUZ, H.; CLOZEL, J.P.; BREU, V.; HESS, P.; LÖFFLER, B.M.; COASSOLO, P.; ROUX, S. Pharmacology of tezosentan, new endothelin receptor antagonist designed for parenteral use. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 290, n. 2, p. 840-846, 1999.

CLARKSON, P.; CELERMAJER, D.S.; DONALD, A.E.; SAMPSON, M.; SORENSEN, K.E.; ADAMS, M.; YUE, D.K.; BETTERIDGE, D.J.; DEANFIELD, J.E. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. **J. Am. Coll. Cardiol.,** v. 28, n. 3, p. 573-579, 1996.

COLLIER, A.; LEACH, J.P.; MCLELLAN, A; JARDINE, A.; MORTON, J.J.; SMALL, M. Plasma endothelinlike immunoreactivity levels in IDDM patients with microalbuminuria. **Diabetes Care**, v. 15: 1038–1040, 1992.

COSENTINO, F.; HISHIKAWA, K.; KATUSIC, Z.S.; LŐSCHER, T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation.,** v. 96, n. 1, p. 25-28, 1997.

CSANYI, G.; LEPRAN, I.; FLESCH, T.; TELEGDY, G.; SZABO, G.; MEZEI, Z. Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. **Pharmacol. Rep.,** v. 59, n. 4, p. 447-455, 2007.

DAI, F.; DIEDERICH, A.; SKOPEC, J.; DIEDERICH, D. Diabetes-induced endothelial dysfunction in streptozotocin-treated rats: Role of prostaglandin endoperoxides and free radicals. **J. Am. Soc. Nephrol.,** v. 4, n. 6, p. 1327–1336, 1993.

DAS EVCIMEN, N.; KING, G.L. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. **Pharmacol. Res.,** v. 55, n. 6, p. 498-510, 2007.

DAVEL, A.P.; KAWAMOTO, E.M.; SCAVONE, C.; VASSALLO, D.V.; ROSSONI, L.V. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 148, n. 5, p. 629-639, 2006.

De VRIESE, A.S.; VERBEUREN, T.J.; Van de VOORDE, J.; LAMEIRE, N.H.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br. J. Pharmacol.,** v. 130, p. 963-974, 2000.

DERUBERTIS, F.R. ; CRAVEN, P.A. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. **Diabetes,** v. 43, n. 1, p. 1-8, 1994.

DETH, R.; VAN BREEMEN, C. Relative contributions of Ca2+ influx and cellular Ca2+ release during drug induced activation of the rabbit aorta. **Pflügers. Arch.**, v. 348, n. 1, p. 13-22, 1974.

DI CARLI, M.F.; AFONSO, L.; CAMPISI, R.; RAMAPPA, P.; BIANCO-BATLLES, D.; GRUNBERGER, G.; SCHELBERT, H.R. Coronary vascular dysfunction in premenopausal women with diabetes mellitus. **Am. Heart. J.,** v. 144, n. 4, p. 711-718, 2002.

DIEDERICH, D.; SKOPEC, J.; DIEDERICH, A.; DAI, F. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: Role of free- radicals. **Am. J. Physiol.,** v. 266, n. 3 Pt 2, p. H1153–H1161, 1994.

DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional a1- and a2-adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 361, n. 1, p. 1 – 15, 1998.

DONAHUE, R.P.; REJMAN, K.; RAFALSON, L.B.; DMOCHOWSKI, J.; STRANGES, S.; TREVISAN, M. Sex differences in endothelial function markers before conversion to pre-diabetes: does the clock start ticking earlier among women? The Western New York Study. **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. 354-359, 2007.

DUMONT, A.S.; DUMONT, R.J.; MCNEILL, J.H.; KASSELL, N.F.; SUTHERLAND, G.R.; VERMA, S. Chronic endothelin antagonism restores cerebrovascular function in diabetes. **Neurosurgery**, v. 52, n. 3, p. 653-660, 2003.

DUNCAN, E.R.; WALKER, S.J.; EZZAT, V.A.; WHEATCROFT, S.B.; LI, J.M.; SHAH, A.M.; KEARNEY, M.T. Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,** v. 293, n. 5, p. E1311-E1319, 2007.

DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; MCLETHIE, N.G.B. Necrosis of islet of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, v. 241, n. 6242, p. 481-512, 1943.

DURANTE, W.; SEN, A.K.; SUNAHARA, F.A. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 94,n. , p. 463-468, 1988.

ERGUL, A.; JOHANSEN, J.S.; STROMHAUG, C.; HARRIS, A.K.; HUTCHINSON, J.; TAWFIK, A.; RAHIMI, A.; RHIM, E.; WELLS, B.; CALDWELL, R.W.; ANSTADT, M.P. Vascular dysfunction of venous bypass conduits is mediated by reactive oxygen species in diabetes: role of endothelin-1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 313, n. 1, p. 70–77, 2005.

FABER, J.E., YANG, N., XIN, X. Expression of α-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 298, n. 2, p. 441–452, 2001.

FATEHI-HASSANABAD, Z.; FATEHI, M.; SHAHIDI, M.I. Endothelial dysfunction in aortic rings and mesenteric beds isolated from deoxycorticosterone acetate hypertensive rats: possible involvement of protein kinase C. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 494, n. 2-3, p. 199-204, 2004.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. The alternative: EDHF. **J. Moll. Cell. Cardiol.,** v. 31, n. 1, p. 15-22, 1999.

FORTES, Z.B.; GARCIA-LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Influence of diabetes on the reactivity of mesenteric microvessels to histamine, bradykinin and acetylcholine. **Br. J. Pharmacol.,** v. 78, n. 1, p. 39-48, 1983a.

FORTES, Z.B.; GARCIA-LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cell. **Br. J. Pharmacol.,** v. 79, n. 3, p. 771-81, 1983b.

FORTES, Z.B.; GARCIA-LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Vascular resctivity in diabetes mellitus: possible role of insulin on the endothelial cell. **Br. J. Pharmacol.**, v. 83, n. 3, p. 635-643, 1984.

FORTES, Z.B.; SCIVOLETTO, R.; GARCIA-LEME, J. Functional changes in the microcirculation of alloxan-induced diabetic rats. **Gen. Pharmacol**., v. 20, n.5, p. 615-620, 1989.

FRANZ, W.B. Basic review: endocrinology of the normal menstrual cycle. **Prim. Care,** v. 15, n. 3, p. 607-616, 1988.

FUJII, K.; SOMA, M.; HUANG, Y.S.; MANKU, M.S.; HORROBIN, D.F. Increased release of prostaglandins from the mesenteric vascular bed of diabetic animals: the effects of glucose and insulin. **Prostagland. Leukot. Med.,** v. 24, n. (2-3), p. 151-161, 1986.

FULTON, D.J.; HODGSON, W.C.; SIKORSKI, B.W.; KING, R.G. Attenuated responses to endothelin-1, KCl and $CaCl_2$, but not noradrenaline, of aortae from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Br. J. Pharmacol.,** v. 104, n. 4, p. 928-932, 1991.

FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M.; Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J.,** v. 3, n.9, p. 2007-2018, 1989.

GAO, X.; ZHANG, H.; SCHMIDT, A.M.; ZHANG, C. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.,** v. 295, n. 2, p. H491-H498, 2008.

GARCIA-COHEN, E.C.; MARIN, J.; DIEZ-PICAZO, L.D.; BAENA, A.B.; SALAICES, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 293, n. 1, p. 75-81, 2000.

GARCÍA-VILLALÓN, A.L.; SANZ, E.; MONGE, L.; FERNÁNDEZ. N.; MARTÍNEZ, M.A.; CLIMENT, B.; DIÉGUEZ, G. Vascular reactivity to vasopressin during diabetes: gender and regional differences. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 459, n. 2-3, p. 247-254, 2003.

GARLAND, C.J.; MCPHERSON, G.A.. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarisation and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 105, 429– 435. 1992.

GARLAND, C.J.; PLANE, F.; KEMP, B.K.; COCKS, T.M. Endotheliumdependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends Pharmacol. Sci**., v. 16, n. 1, p. 23–30, 1995.

GLUAIS, P.; LONCHAMPT, M.; MORROW, J.D.; VANHOUTTE, P.M.; FELETOU, M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, n. 6, p. 834-845, 2005.

GOEL, A. ; ZHANG, Y. ; ANDERSON, L. ; RAHIMIAN, R. Gender difference in rat aorta vasodilation after acute exposure to high glucose: involvement of protein kinase C beta and superoxide but not of Rho kinase. **Cardiovasc. Res.,** v. 76, n. 2, p. 351-360, 2007.

GOEL, A.; THOR, D.; ANDERSON, L.; RAHIMIAN, R. Sexual dimorphism in rabbit aortic endothelial function under acute hyperglycemic conditions and gender-specific responses to acute 17beta-estradiol. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.,** v. 294, n. 6, p. H2411-H2420, 2008.

GRAND C, RINALDI GJ. Influence of norepinephrine-sensitive intracellular calcium stores on the relaxant response to diltiazem in rat aorta. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 40, n. 4, p. 423-435, 1990.

GRIFFITH, T.M.; EDWARDS, D.H.; LEWIS, M.J.; NEWBY, A.C.; HENDERSON, A.H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**., v. 308, n. 5960, p. 645-647. 1984.

GROOP, P.H.; FORSBLOM, C.; THOMAS, M.C. Mechanisms of disease: pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab**., v. 1, n. 2, p. 100–110, 2005.

GUO, Z.; SU, W.; ALLEN, S.; PANG, H.; DAUGHERTY, A.; SMART, E.; GONG, M.C. COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice. **Cardiovasc. Res**., v. 67, n. 4, p. 723-735, 2005.

HAMON, C.G.; CUTLER, P.; BLAIR, J.A. Tetrahydrobiopterin metabolism in the streptozotocin induced diabetic state in rats. **Clin. Chim. Acta,** v. 181, n. 3, p. 249-253, 1989.

HANAFY, K.A.; KRUMENACKER, J.S.; MURAD, F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Med. Sci. Monit.,** v. 7, n. 4, p. 801-819, 2001.

HARGROVE, G.M.; DUFRESNE, J.; WHITESIDE, C.; MURUVE, D.A.; WONG, N.C. Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. **Kidney Int.,** v. 58, n. 4, p. 1534–1545, 2000.

HARRIS, K.H.; MACLEOD, K.M. Influence of the endothelium on contractile responses of arteries from diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 153, n. 1, p. 55-64. 1988.

HATTORI, Y.; KAWASAKI, H.; KAZUHIRO, A.; KANNO, M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am. J. Physiol.,** v. 261, n. 4 Pt 2, p. H1086-H94, 1991.

HEAD, R.J.; LONGHURST, P.A.; PANEK, R.L.; STITZEL, R.E. A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. **Br. J. Pharmacol.,** v. 91, n. 2, p. 275-286, 1987.

Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. **Lancet**, v. 355, n. 9200, p. 253–259, 2000.

HEYGATE, K.M.; LAWRENCE, I.G.; BENNETT, M.A.; THURSTON, H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.,** v. 116, n. 8, p. 3251-3259, 1995.

HINK, U.; LI, H.; MOLLNAU, H.; OELZE, M.; MATHEIS, E.; HARTMANN, M.; SKATCHKOV, M.; THAISS, F.; STAHL, R.A.; WARNHOLTZ, A.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; HARRISON, D.G.; FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ. Res.,** v. 88, n. 2, p. E14-E22, 2001.

HIRATA, K.; KURODA, R.; SAKODA, T.; KATAYAMA, M.; INOUE, N.; SUEMATSU, M.; KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. **Hypertension,** v. 25, n. 2, p. 180-185, 1995.

HORTON, R. The global challenge of diabetes . **The Lancet,** v. 371, n. 9626, p. 1723, 2008.

HOWLAND, B.E.; ZEBROWSKI, E.J. Pituitary response to gonadotropin-releasing hormone in diabetic male rats. **Experientia.,** v. 36, n. 5, p. 610-611, 1980.

HU, G.; DECODE Study Group. Gender difference in all-cause and cardiovascular mortality related to hyperglycaemia and newly-diagnosed diabetes. **Diabetologia,** v. 46, n. 5, p. 608-617, 2003.

HUGHES, A.D. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. **J. Vasc. Res.,** v. 32, n. 6, p. 353-370, 1995.

IINO, M. Calcium release mechanisms in smooth muscle. **Jpn. J. Pharmacol.,** v. 54, n. 4, p. 345-354, 1990.

INKSTER, M.E.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E.. Effects of trientine, a metal chelator, on defective endothelium-dependent relaxation in the mesenteric vasculature of diabetic rats. **Free Radic. Res.**, v. 36, n. 10, p. 1091-1099, 2002.

INOGUCHI, T.; BATTAN, R.; HANDLER, E.; SPORTSMAN, J.R.; HEATH, W.; KING, G.L. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats. Differential reversibility to glycaemia control by islet transplantation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 22, p. 11059-11063, 1992.

INOGUCHI, T.; XIA, P.; KUNISAKI, M.; HIGASHI, S.; FEENER, E.P.; KING, G.L. Insulin´s effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. **Am. J. Physiol.,** v. 267, n. 3 Pt1, p. E369-E379, 1994.

JIN, L.; TEIXEIRA, C.E.; WEBB, R.C.; LEITE, R. Comparison of the involvement of protein kinase C in agonist-induced contractions in mouse aorta and corpus cavernosum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 590, n. 1-3, p. 363-368, 2008.

JOHNSON, L.M.; SIDMAN, R.L. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. **Biol. Reprod.,** v. 20, n. 3, p. 552-559, 1979.

KANEKO, K.; SUNANO, S. Involvement of α-adrenoceptors in the endothelium-dependent depression of noradrenalin-induced contraction in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 240, n. 2-3, p. 195–200, 1993.

KANIE, N.; KAMATA, K. Effects of chronic administration of the novel endothelin antagonist J-104132 on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 135, n. 8, p. 1935-1942, 2002.

KANNEL, W.B. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study. **Am. Heart. J.,** v. 114, n. 2, p. 413-419, 1987.

KATAYAMA, S.; BROWNSCHEIDLE, C.M.; WOOTTEN, V.; LEE, J.B.; SHIMAOKA, K. Absent or delayed preovulatory luteinizing hormone surge in experimental diabetes mellitus. **Diabetes,** v. 33, n. 4, p. 324-327, 1984.

KEEGAN, A.; JACK, A.M.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E. Effects of aldose reductase inhibition on responses of the corpus cavernosum and mesenteric vascular bed of diabetic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.,** v. 35, n. 4, p. 606-613, 2000.

KEYNAN, S.; KHAMAISI, M.; DAHAN, R.; BARNES, K.; JACKSON, C.D.; TURNER, A.J.; RAZ, I. Increased expression of endothelin-converting enzyme-1c isoform in response to high glucose levels in endothelial cells. **J. Vasc. Res.,** v. 41, n. 2, p. 131–140, 2004.

KHAZAEI, M.; MOIEN-AFSHARI, F.; KIEFFER, T.J.; LAHER, I. Effect of exercise on augmented aortic vasoconstriction in the db/db mouse model of type-II diabetes. **Physiol. Res.,** v. 57, n. 6, p. 847-856, 2008.

KIM, S.H.; PARK, K.W.; KIM, Y.S.; OH, S.; CHAE, I.H.; KIM, H.S.; KIM, C.H. Effects of acute hyperglycemia on endothelium-dependent vasodilation in patients with diabetes mellitus or impaired glucose metabolism. **Endothelium,** v. 10, n. 2, p. 65-70, 2003.

KIRCHICK, H.J.; KEYES, P.L.; FRYE, B.E. An explanation for anovulation in immature alloxan-diabetic rats treated with pregnant mare's serum gonadotropin: reduced pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. **Endocrinology,** v. 105, n. 6, p. 1343-1349, 1979.

KIRCHICK, H,J,; KEYES, P.L.; FRYE, B.E. Restoration of the LH surge and ovulation by insulin in alloxan-diabetic immature rats treated with pregnant mare's serum gonadotrophin. **Acta Endocrinol. (Copenh).,** v. 100, n. 2, p. 266-273, 1982.

KNEPPER, L.E.; GIULIANI, M.J. Cerebrovascular disease in women. **Cardiology**, n. 86, n. 4, p. 339–348, 1995.

KOYA, D.; KING, G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes,** v. 47, n. 6, p. 859-866, 1998.

KUNISAKI, M.; BURSELL, S.E.; UMEDA, F.; NAWATA, H.; KING, G.L. Normalisation of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. **Diabetes**, v. 43, n. 11, p. 1372-1377, 1994.

KYAW, M.; YOSHIZUMI, M.; TSUCHIYA, K.; KIRIMA, K.; SUZAKI, Y.; ABE, S.; HASEGAWA, T.; TAMAKI, T. Antioxidants inhibit endothelin-1 (1-31)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via the inhibition of mitogenactivated protein (MAP) kinase and activator protein-1 (AP-1). **Biochem Pharmacol.**, v. 64, n. 10, p.1521–1531, 2002.

LARSEN, P.R.; KRONENBER, H.M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.S. **Williams Textbook of Endocrinology**, 10º ed., Filadélfia, W.B. Saunders Company, 2003, p. 1427.

LAVRENTYEV, E.N.; ESTES, A.M.; MALIK, K.U. Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.,** v. 101, n. 5, p. 455–464, 2007.

LEE, I.K.; KOYA, D.; ISHII, H.; KANOH, H.; KING, G.L. d-α-tocopherol prevents the hyperglycemia induced activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in vascular smooth muscle cells by an increase in DAG kinase activity. **Diabetes Res. Clin. Pract..**, v. 45, n. 2-3, p. 183-190, 1999.

LEGATO, M.J.; GELZER, A.; GOLAND, R.; EBNER, S.A.; RAJAN, S.; VILLAGRA, V.; KOSOWSKI, M. Writing Group for The Partnership for Gender-Specific. Gender-

specific care of the patient with diabetes: review and recommendations. **Gend. Med.,** v. 3, n. 2, p. 131-158, 2006.

LEKAKIS, J.; PAPAMICHAEL, C.; ANASTASIOU, H.; ALEVIZAKI, M.; DESSES, N.; SOUVATZOGLOU, A.; STAMATELOPOULOS, S.; KOUTRAS, D.A. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. **Cardiovasc. Res.,** v. 34, n. 1, p. 164-168, 1997.

LESH, R.E.; NIXON, G.F.; FLEISCHER, S.; AIREY, J.A.; SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Localization of ryanodine receptors in smooth muscle. **Circ. Res.,** v. 82, n. 2, p. 175-85, 1998.

LEVY, B.I.; BENESSIANO, J.; POITEVIN, P.; SAFAR, M.E. Endothelium-dependent mechanical properties of the carotid artery in WKY and SHR.Role of angiotensin converting enzyme inhibition. **Circ. Res.,** v. 66, n. 2, p. 321-328, 1990.

LEWIS, E.J.; HUNSICKER, L.G.; BAIN, R.P.; ROHDE, R.D. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, n. 20, p. 1456–1462, 1993.

LI, M.; KUO, L.; STALLONE, J.N. Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.,** v. 294, n. 6, p. H2444-2455, 2008.

LIM, S.C.; CABALLERO, E.; ARORA, S.; SMAKOWSKI, P.; BASHOFF, E.M.; BROWN, F.M.; LOGERFO, F.W.; HORTON, E.S.; VEVES, A. The effect of hormonal replacement therapy on the vascular reactivity and endothelial function of healthy individuals and individuals with Type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** v. 84, n. 11, p. 4159–4164, 1999.

LINDHOLM, L.H.; IBSEN, H.; DAHLOF, B.; DEVEREUX, R.B.; BEEVERS, G.; DE FAIRE, U.; FYHRQUIST, F.; JULIUS, S.; KJELDSEN, S.E.; KRISTIANSSON, K.; LEDERBALLE-PEDERSEN, O.; NIEMINEN, M.S.; OMVIK, P.; OPARIL, S.; WEDEL, H.; AURUP, P.; EDELMAN, J.; SNAPINN, S. The LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. **Lancet**, v. 359, n. 9311, p. 1004 –1010, 2002.

LINDSAY, R.M.; PEET, R.S.; WILKIE, G.S.; ROSSITER, S.P.; SMITH, W.; BAIRD, J.D.; WILLIAMS, B.C. In vivo and in vitro evidence of altered nitric oxide metabolism in the spontaneously diabetic, insulin-dependent BB/Edinburgh rat. **Br. J. Pharmacol.,** v. 120, n.1, p. 1-6, 1997.

LUSCHER, T.F.; STEFFEL, J. Sweet and sour: unraveling diabetic vascular disease. **Circ Res.**, v. 102, n.1, p. 9-11, 2008.

MA, L. ; ZHU, B. ; CHEN, X. ; LIU, J.; GUAN, Y. ; REN, J. Abnormalities of sarcoplasmic reticulum Ca2+ mobilization in aortic smooth muscle cells from

streptozotocin-induced diabetic rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.,** v. 35, n. 5-6, p.568-573, 2008.

MACLEOD, K.M. The effect of insulin treatment on changes in vascular reactivity in chronic, experimental diabetes. **Diabetes,** v. 34, n. 11, p. 1160-1167, 1985.

MAJMUDAR, N.G.; ROBSON, S.C.; FORD, G.A. Effects of the menopause, gender, and estrogen replacement therapy on vascular nitric oxide activity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n. 4, p. 1577-1583, 2000.

MAKINO, A.; KAMATA, K. Elevated plasma endothelin-1 level in streptozotocin-induced diabetic rats and responsiveness of the mesenteric arterial bed to endothelin-1. **Br. J. Pharmacol.,** v. 123, n. 6, p. 1065–1072, 1998.

MARRA, G.; COTRONEO, P.; PITOCCO, D.; MANTO, A.; Di LEO, M.A.S.; RUOTOLO, V.; CAPUTO, S.; GIARDINA, B.; GHIRLANDA, G.; SANTINI, S.A. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes. **Diabetes Care,** v. 25, n. 2, p. 370-375, 2002.

MARRERO, M.B.; SCHIEFFER, B.; LI, B.; SUN, J.; HARP, J.B.; LING, B.N. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogenactivated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 39, p. 24684–24690, 1997.

MARTIN, W.; FURCHGOTT, R.F.; VILLANI, G.M.; JOTHIANANDAN, D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 237, n. 2, p. 529-38, 1986.

MASSETT, M.P.; LEWIS, S.J.; BATES, J.N.; KREGEL, K.C. Modulation of temperature-induced tone by vasoconstrictor agents. **J. Appl. Physiol.,** v. 86, n. 3, p. 963-969, 1999.

MATHER, K.J.; MIRZAMOHAMMADI, B.; LTEIF, A.; STEINBERG, H.O.; BARON, A.D. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3517-3523. 2002

MATSUMOTO, T.; KAKAMI, M.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Gender differences in vascular reactivity to endothelin-1 (1-31) in mesenteric arteries from diabetic mice. **Peptides, v.** 29, n. 8, p. 1338-1346, 2008.

MAYER, B.; WERNER, E.R. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.,** v. 351, n. 5, p. 453-463, 1995.

MAYHAN, W.G.; SIMMONS, L.K.; SHARPE, G.M. Mechanisms of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. **Am. J. Physiol.,** v. 260, n. 2 Pt 2, p. H319-H326, 1991.

MAYHAN, W.G.; SUN, H.; IRVINE, S.D. Influence of gender on dilation of the basilar artery during diabetes mellitus. **Brain Res.,** v. 930, n. 1-2, p. 182-190, 2002.

MCLENNAN, S.; YUE, D.K.; FISHER, E.; CAPOGRECO C.; HEFFERMAN S.; ROSS G.R.; TURTLE, J.R. Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. Relationship with collagen and polyol pathway abnormalities. **Diabetes,** v. 37, n. 3 (1988), pp. 359–361.

MCVEIGH, G.E.; BRENNAN, G.M.; JOHNSTON, G.D.; MCDERMOTT, B.J.; MCGRATH, L.T.; HENRY, W.R.; ANDREWS, J.W.; HAYES, J.R. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 35, n. 8, p. 771-776, 1992.

MYERS, T.O.; MESSINA, E.J.; RODRIGUES, A.M.; GERRITSEN, M.E. Altered aortic and cremaster muscle prostaglandin synthesis in diabetic rats. **Am. J. Physiol.**, v. 249, n. 4 Pt 1, p. 374–379, 1985.

NACCI, C.; TARQUINIO, M.; DE BENEDICTIS, L.; MAURO, A.; ZIGRINO, A.; CARRATÙ, M.R.; QUON, M.J.; MONTAGNANI, M. Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 849-861, 2009.

NANGLE, M.R.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E. Protein kinase Cβ inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 475, n. 1-3, p. 99-106, 2003.

NASSAR, T.; KADERY, B.; LOTAN, C.; DA'AS, N.; KLEINMAN, Y.; HAJ-YEHIA, A. Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 436, n. 1-2, p. 111-118, 2002.

NICOLLS, M.R.; HASKINS, K.; FLORES, S.C. Oxidant stress, immune dysregulation, and vascular function in type I diabetes. **Antioxid. Redox. Signal.,** v. 9, n. 7, p. 879-889, 2007.

OKON, E.B.; SZADO, T.; LAHER, I.; MCMANUS, B.; VAN BREEMEN, C. Augmented contractile response of vascular smooth muscle in a diabetic mouse model. **J. Vasc. Res.**, v. 40, n. 6, p. 520-530, 2003.

OLIVEIRA, M.A.; CARVALHO, M.H.; NIGRO, D.; PASSAGLIA, R.C.; FORTES, Z.B. Elevated glucose blocks angiotensin-(1-7) and bradykinin interaction: the role of cyclooxygenase products. **Peptides,** v. 24, n. 3, p. 449-454, 2003.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacol. Ther.,** v. 69, n. 3, p. 153-171, 1996.

OYAMA, Y.; KAWASAKI, H.; HATTORI, Y.; KANNO, M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 131, n. 1, p. 75-78, 1986.

PANNIRSELVAM, M.; VERMA, S.; ANDERSON, T.J.; TRIGGLE, C.R. Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db -/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability. **Br. J. Pharmacol.,** v. 136, n. 2, p. 255-263, 2002.

PARK, J.Y.; TAKAHARA, N.; GABRIELE, A.; CHOU, E.; NARUSE, K.; SUZUMA, K.; YAMAUCHI, T.; HA, S.W.; MEIER, M.; RHODES, C.J.; KING, G.L. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. **Diabetes**, v. 49, n. 7, p. 1239–1248, 2000.

PEREDO, H.A.; RODRÍGUEZ, R.; SUSEMIHL, M.C.; VILLARREAL, I.; FILINGER E. Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. **Auton. Autacoid. Pharmacol.,** v. 26, n. 4, p. 355-360, 2006.

PFAFFMAN, M.A.; BALL, C.R.; DARBY, A.; HILMAN, R. Insulin reversal of diabetes-induced inhibition of vascular contractility in the rat. **Am. J. Physiol.,** v. 242, n. 4, p. H490-H495, 1982.

PIEPER, G.M.; PELTIER, B.A. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.,** v. 25, n. 3, p. 397-403, 1995.

PIEPER, G.M.; MOORE-HILTON, G.; ROZA, A.M. Evaluation of the mechanism of endothelial dysfunction in the genetically-diabetic rat. **Life Sci.,** v. 58, n.9, p. 147-152, 1996.

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

PIEPER, G.M. Review of alterations in endothelial nitric oxide pro duction in diabetes: Protective role of arginine on endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 31, n. 5, p. 1047–1060, 1998.

PIEPER GM. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. **Diabetologia,** v. 42, n. 2, p. 204-213, 1999.

PINNA, C.; CIGNARELLA, A.; ZANARDO, R.; BOLEGO, C.; PUGLISI, L. Gender differences and antioxidant treatment affect aortic reactivity in short-term diabetic rats**. Eur. J. Pharmacol.,** v. 431, n. 1, p. 71-79, 2001.

QUIJANO, C.; CASTRO, L.; PELUFFO, G.; VALEZ, V.; RADI, R. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,** v. 293, n. 6, p. H3404-H3414, 2007.

RINALDI, G.J.; CINGOLANI, H.E. Effect of diabetes on fast response to norepinephrine in rat aorta. **Diabetes***,* v. 41, n. 1, p. 30-34, 1992.

RINALDI, G.J.; GRAND, C.; CINGOLANI, H.E. Characteristics of the fast and slow components of the response to noradrenaline in rat aorta. **Can. J. Cardiol.**, v. 7, n. 7, p. 316-322, 1991.

RYDÉN, L. ; STANDL, E. ; BARTNIK, M. ; VAN DEN BERGHE, G. ; BETTERIDGE, J. ; DE BOER, M.J. ; COSENTINO, F. ; JÖNSSON, B. ; LAAKSO, M. ; MALMBERG, K. ; PRIORI, S. ; OSTERGREN, J. ; TUOMILEHTO, J. ; THRAINSDOTTIR, I. ; VANHOREBEEK, I. ; STRAMBA-BADIALE, M. ; LINDGREN, P. ; QIAO, Q. ; PRIORI, S.G. ; BLANC, J.J. ; BUDAJ, A. ; CAMM, J. ; DEAN, V. ; DECKERS, J. ; DICKSTEIN, K. ; LEKAKIS, J. ; MCGREGOR, K. ; METRA, M. ; MORAIS, J. ; OSTERSPEY, A. ; TAMARGO, J. ; ZAMORANO, J.L. ; DECKERS, J.W. ; BERTRAND, M. ; CHARBONNEL, B. ; ERDMANN, E. ; FERRANNINI, E. ; FLYVBJERG, A. ; GOHLKE, H. ; JUANATEY, J.R. ; GRAHAM, I. ; MONTEIRO, P.F. ; PARHOFER, K. ; PYÖRÄLÄ, K. ; RAZ, I. ; SCHERNTHANER, G. ; VOLPE, M., ; WOOD, D.; Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for the Study of Diabetes (EASD). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Eur. Heart J.,** v. 28, n. 1, p. 88-136, 2007.

SACHIDANANDAM, K.; HARRIS, A.; HUTCHINSON, J.; ERGUL, A. Microvascular versus macrovascular dysfunction in type 2 diabetes: differences in contractile responses to endothelin-1. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**., v. 231, n. 6, p. 1016–1021, 2006.

SACHIDANANDAM, K.; ELGEBALY, M.M.; HARRIS, A.K.; HUTCHINSON, J.R.; MEZZETTI, E.M.; PORTIK-DOBOS, V.; ERGUL, A. Effect of chronic and selective endothelin receptor antagonism on microvascular function in type 2 diabetes. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**., v. 294, n. 6, p. H2743-H2749, 2008.

SAENZ DE TEJADA, I.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; KRANE, R.J.; COHEN, R.A. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 16, p. 1025-1030, 1989.

SCARBOROUGH, N.L.; CARRIER, G.O. Nifedipine and alpha adrenoceptors in rat aorta. II. Role of extracellular calcium in enhanced alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction in diabetes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 231, n. 3, p. 603-609, 1984.

SCHÄFER, A.; FRACCAROLLO, D.; PFÖRTSCH, S.; FLIERL, U.; VOGT, C.; PFRANG, J.; KOBSAR, A.; RENNÉ, T.; EIGENTHALER, M.; ERTL, G.; BAUERSACHS, J. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. **Br. J. Pharmacol.,** v. 153, n. 5, p. 886-893, 2008.

SHARMA, K.; DEELMAN, L.; MADESH, M.; KURZ, B.; CICCONE, E.; SIVA, S.; HU, T.; ZHU, Y.; WANG, L.; HENNING, R.; MA, X.; HAJNOCZKY, G. Involvement of

transforming growth factor-beta in regulation of calcium transients in diabetic vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.,** v. 285, n. 6, p. F1258-F1270, 2003.

SHEMYAKIN, A.; BÖHM, F.; WAGNER, H.; EFENDIC, S.; BÅVENHOLM, P.; PERNOW, J. Enhanced endothelium-dependent vasodilatation by dual endothelin receptor blockade in individuals with insulin resistance. **J. Cardiovasc. Pharmacol.,** v. 47, n. 3, p. 385-390, 2006.

SHIMIZU, K.; MURAMATSU, M.; KAKEGAWA, Y.; ASANO, H.; TOKI, Y.; MIYAZAKI, Y.; OKUMURA, K.; HASHIMOTO, H.; ITO, T. Role of prostaglandin H2 as na endothelial-derived contracting factor in diabetic state. **Diabetes,** v. 42, n. 9, p. 1246-1252, 1993.

SHINOZAKI, K.; KASHIWAGI, A.; NISHIO, Y.; OKAMURA, T.; YOSHIDA, Y.; MASADA, M.; TODA, N.; KIKKAWA, R. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O_2^- imbalance in insulin-resistant rat aorta. **Diabetes,** v. 48, n. 12, p. 2437-2445, 1999.

SHINOZAKI, K.; NISHIO, Y.; OKAMURA, T.; YOSHIDA, Y.; MAEGAWA, H.; KOJIMA, H.; MASADA, M.; TODA, N.; KIKKAWA, R.; KASHIWAGI, A. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. **Circ. Res.,** v. 87, n. 7, p. 566-573, 2000.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature,** v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V. Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: 0modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol. Rev.,** 83, p. 1325–1358, 2003.

SOWERS, J.R.; EPSTEIN, M. Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy. An update. **Hypertension.**, v. 26, n. 6 Pt 1, p. 869–879, 1995.

SOWERS J.R. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. **Arch. Int. Med.,** v. 158, n. 6, p. 617–621, 1998.

STEINBERG, H.O.; PARADISI, G.; CRONIN, J.; CROWDE, K.; HEMPFLING, A.; HOOK, G.; BARON, A.D. Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women. **Circulation.,** v. 101, n. 17, p. 2040-2046, 2000.

STERIN-BORDA, L.; FRANCHI, A.M.; BORDA, E.S.; DEL CASTILLO, E.; GIMENO, M.F.; GIMENO, A.L.; STERIN BORDA, L. Augmented thromboxane generation by mesenteric arteries from pancreatectomized diabetic dogs is coincident with the vascular tone enhancement evoked by Na-arachidonate and prostacyclin. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 103, n. 3-4, p. 211–221, 1984.

TABERNERO, A.; GIRALDO, J.; VILA, E.. Modeling the changes due the endothelium and hypertension in the a-adrenoreceptor-mediated response of the rat aorta. **J. Auton. Pharmacol.**, v. 19, n. 4, p. 219–228, 1999.

TAYLOR, P.D.; McCARTHY, A.L.; THOMAS, C.R.; POSTON, L. Endothelium-dependent relaxation and noradrenaline sensitivity in mesenteric resistance arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.,** v. 107, n. 2, p. 393-399, 1992.

TAYLOR, P.D.; WICKENDEN, A.D.; MIRRLEES, D.J.; POSTON, L. Endothelial function in the isolated perfused mesentery and aortae of rats with streptozotocin-induced diabetes: effect of treatment with the aldose reductase inhibitor, ponalrestat. **Br. J. Pharmacol.,** v. 111, n. 1, p. 42-48, 1994.

TESFAMARIAM, B.; BROWN, M.L.; COHEN, R.A. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. **J. Clin. Invest.,** v. 87, n. 5, p. 1643-1648, 1991.

TESFAMARIAM, B.; JAKUBOWSKI, J.A.; COHEN R.A. Contraction of diabetic rabbit aorta due to endothelium-derived PGH2/TXA2. **Am. J. Physiol.,** v. 257, n. 5 Pt 2, p. H1327-H1333, 1989.

TESFAMARIAM, B.; PALACINO, J.J.; WEISBROD, R.M.; COHEN, R.A. Aldose reductase inhibition restores endothelial cell function in diabetic rabbit aorta. **J. Cardiovasc. Pharmacol.,** v. 21, n. 2, p. 205-211, 1993.

TIMIMI, F.K.; TING, H.H.; HALEY, E.A.; RODDY, M.A.; GANZ, P.; CREAGER, M.A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Am. Coll. Cardiol.,** v. 31, n. 3, p. 552-557, 1998.

TOLEDO, D.P.; AKAMINE, E.; NIGRO, D.; PASSAGLIA, R.C.T.; CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B. Microvascular reactivity in experimental diabetes: responses of male and female rats. **Inflamm. Res.,** v. 52, n. 5, p. 191-198, 2003.

TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B.; CARVALHO, M.H. Effects of estrogen on the vascular system. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 36, n. 9, p. 1143-1158, 2003.

TUNSTALL-PEDOE, H.; KUULASMAA, K.; AMOUYEL, P.; ARVEILER, D.; RAJAKANGAS, A.M.; PAJAK, A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. **Circulation,** v. 90, n. 1, p. 583–612, 1994.

VAN BORTEL, L.M.; STRUIJKER-BOUDIER, H.A.; SAFAR, M.E. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. **Hypertension,** v. 38, n. 4, p. 914-921, 2001

VANDEPUTTE, C.; AIDEN MCCORMICK, P.; DOCHERTY, J.R. Responsiveness to noradrenaline in aorta from wild-type, nitric oxide synthase-2, nitric oxide synthase-3

and alpha2A/D-adrenoceptor knockout mice. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 466, n. 1-2, p. 129-136. 2003.

WIER, W.G., MORGAN, K.G. Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 150, p. 91–139. 2003.

WILLIAMS, B. Glucose-induced vascular smooth muscle dysfunction: the role of protein kinase C. **J. Hypertens.,** v. 13, n. 5, p. 477-486, 1995.

WILLIAMS, S.B.; CUSCO, J.A.; RODDY, M.A.; JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, M.A. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Am. Coll. Cardiol.,** v. 27, n. 3, p. 567-574, 1996.

WOHAIEB, S.A.; GODIN, D.V. Alteration in free radicals tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes**, v.36, n. 9, p. 1014–1018, 1987.

WONG, K.K.; TZENG, S.F. Norepinephrine-induced contractile responses in isolated rat aortae from different duration of diabetes. **Artery,** v. 19, n. 1, p. 1-13. 1992.

XAVIER, F.E.; DAVEL, A.P.; ROSSONI, L.V.; VASSALLO, D.V. Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. **Vascul. Pharmacol.,** v. 40, n. 1, p. 67-76, 2003.

YANG, S.; BAE, L.; ZHANG, L. Estrogen increases eNOS and NOx release in human coronary artery endothelium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.,** v. 36, n. 2, p. 242-247, 2000.

ZENERE, B.M.; ARCARO, G.; SAGGIANI, F.; ROSSI, L.; MUGGEO, M.; LECHI, A. Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. **Diabetes Care,** v. 18, n. 7, p. 975-982, 1995.

ZHU, B.H.; GUAN, Y.Y.; MIN, J.; HE, H. Contractile responses of diabetic rat aorta to phenylephrine at different stages of diabetic duration. **Acta Pharmacol. Sin.,** v. 22, n. 5, p. 445-449. 2001.