



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANDRESSA SILVA SOUSA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CORONARIANA EM RATAS
DIABÉTICAS TIPO 1: EFEITOS DO CO-TRATAMENTO
COM INSULINA E PIRIDOXAMINA

CAMPINAS

2020

ANDRESSA SILVA SOUSA

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CORONARIANA EM RATAS
DIABÉTICAS TIPO 1: EFEITOS DO CO-TRATAMENTO
COM INSULINA E PIRIDOXAMINA**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do Título de doutora em Biologia
Funcional e Molecular, na área de
Fisiologia.*

Orientador: MARIA ANDRÉIA DELBIN

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ANDRESSA SILVA SOUSA E
ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A). MARIA
ANDRÉIA DELBIN.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So85a Sousa, Andressa Silva, 1990-
Avaliação da função coronariana em ratas diabéticas tipo 1 : efeitos do co-
tratamento com insulina e piridoxamina / Andressa Silva Sousa. – Campinas,
SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Maria Andreia Delbin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Artérias coronárias. 3. Ratos Wistar. 4.
Insulina. 5. Piridoxamina. I. Delbin, Maria Andreia, 1982-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of coronary function in type 1 diabetic rats : effects of co-
treatment with insulin and pyridoxamine

Palavras-chave em inglês:

Diabetes mellitus, Type 1

Coronary arteries

Rats, Wistar

Insulin

Pyridoxamine

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Andreia Delbin [Orientador]

Cláudio Chrysostomo Werneck

Eliana Hiromi Akamine

Fabiano Beraldi Calmasini

Adriano Polican Ciena

Data de defesa: 13-03-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6135-2909>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.orp.br/0973644867001595>

Campinas, 13 de março de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Andréia Delbin (Orientadora)

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine

Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Prof. Dr. Fabiano Beraldi Calmasini

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Dedico esse trabalho a Deus que me sustentou até aqui e à minha família, especialmente minha mãe Efigênia e minha irmã Andrielle.

AGRADECIMENTOS

Essa tese é resultado de muito trabalho, dedicação e esforço que não partiram somente de mim, mas de pessoas que estavam sempre próximas e vivendo comigo cada etapa desse longo processo formativo. Etapas difíceis, intensas, que me garantiram muitos choros, pensamentos e lutas, porém me trouxeram mais determinação e força. Vivi momentos também de alegrias, vitórias, autoconhecimento e identificação.

Mesmo sabendo que não há palavras que possam exprimir meus agradecimentos, aproveito esse momento para expressar minha gratidão a todos que de certa forma contribuíram e que me vem a memória no momento da escrita.

Inicialmente agradeço a Deus por guiar meus passos, ser meu maior ponto de apoio e sustento durante essa caminhada, ter me dado saúde para superar as dificuldades e com seu Amor Paterno ter me presenteado com momentos de grande consolo e paz.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que deram todo suporte nesta etapa da minha vida e ofereceram muitos recursos para meu crescimento profissional.

A minha orientadora Maria Andréia, pelo suporte, correções e incentivos. Sou muito grata pelos seus ensinamentos e sua motivação. Percebo nesses anos juntas, que cresceu em nós um grande amor pelo que fazemos, pela vida acadêmica e por fazer algo a mais nesse mundo tão necessitado. Agradeço muito por sua amizade, sua preocupação e cuidado comigo, sempre me trazendo segurança e confiança naquilo que sei que nasci para fazer. Obrigada!

Agradeço a minha mãe Efigênia que, com seu jeito, sempre me incentivou e nunca duvidou do meu potencial, me mostrou que vale a pena lutar com amor por tudo. Teve paciência, me sustentou muitas vezes na fé e me fez sempre lembrar de que vale a pena dar tudo de si, mesmo sem qualquer retorno. É a via que nos leva para o céu! Dar mais que receber.

A minha irmã Andrielle que sempre esteve ao meu lado e me fez acreditar em mim mesma. Sem seu amor de irmã não saberia o que é lutar e ter um abraço que entende tudo que vivo e que me recebe sempre sendo um porto seguro, me fazendo esquecer um pouco das preocupações e incertezas. Quantos momentos e descobertas você trouxe nesse tempo e todas me fizeram ser ainda mais feliz e forte.

Ao meu pai Walmir que me fortaleceu e foi muito importante para conclusão dessa etapa. E aos outros familiares que de alguma forma deixaram sua marca nesse processo de aprendizagem.

Ao meu namorado, Mateus, por sua paciência e cuidado comigo. Sua companhia apareceu mais no fim desse processo todo, mas diria que foi uma presença essencial e um presente em meio a tantas atividades. Um reflexo daquilo que Deus tem para mim! Uma graça nesse tempo de luta! Sua parceria fez toda diferença nessa reta final.

Meus agradecimentos aos amigos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza. Aos amigos da Comunidade Católica Shalom, amigos da minha cidade natal (principalmente a Bárbara) e aos colegas de laboratório Jamaira, Daniele Guizoni, Karla e Israelle, companheiros de trabalho que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Agradeço em especial a equipe que esteve mais próxima a mim nesse projeto: Matheus, Olivia, Lucas, Aline e Daniele Feriani. Vocês fizeram toda diferença e foram peças fundamentais para eu conseguir chegar até aqui. Tantos experimentos, tantas rotinas, finais de semana que precisei ter vocês ao meu lado, revezando, partilhando ou simplesmente tomando um café. Sou muito grata a amizade de vocês e ao trabalho acolhido com tanta dedicação!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- PROCESSO: 2016/16351-5), essas agências possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e participação em eventos científicos.

E agradeço por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

Introdução: Evidências mostram que o diabetes mellitus (DM) leva a um maior risco para doença arterial coronariana (DAC), principalmente em mulheres. As abordagens farmacológicas utilizadas na prática clínica demonstraram-se insatisfatórias na prevenção das complicações vasculares associadas ao DM. O alto risco de eventos cardiovasculares fatais em mulheres diabéticas ainda é uma questão a ser estudada, a fim de melhorar a prevenção e prognóstico das complicações vasculares. A formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) é uma importante via envolvida nessas complicações, assim terapias farmacológicas alternativas e inovadoras são necessárias. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a função coronariana em ratas diabéticas tipo 1 (DM1) e os efeitos do co-tratamento com insulina e piridoxamina (inibidor dos AGEs). **Métodos:** Ratas Wistar (210-220 gramas) foram divididas em: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1, aloxana 170 mg/kg IP), DM1 tratadas com insulina (DM1+INS, 2U manhã + 4U noite) e DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX, 180 mg/kg gavagem). Uma semana após a confirmação do DM1 as ratas iniciaram os tratamentos por mais três semanas (período total do protocolo de quatro semanas). Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP) e ao análogo do tromboxano A₂ (U46619) foram realizadas em artéria coronária septal. Também foram avaliados parâmetros bioquímicos plasmáticos: glicose, estradiol, N^f-carboximetilisina (CML), atividade da enzima catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A produção vascular de óxido nítrico (NO) foi mensurada. **Resultados:** Observamos aumento nos valores de glicose e redução no peso corporal, peso dos ovários e peso do útero no grupo DM1 comparado ao grupo CTR. Nos grupos DM1+INS e DM1+INS+PDX os valores de glicose foram significativamente reduzidos quando comparados ao grupo DM1, porém não foram normalizados quando comparados ao grupo CTR. A redução no peso corporal, do útero foi prevenida nos grupos DM1+INS e DM1+INS+PDX. As respostas máximas (E_{MAX}) à ACh foram reduzidas no grupo DM1 (72±5,7%) comparado ao grupo CTR (100±9,14%), essa resposta foi restaurada apenas no grupo DM1+INS+PDX (93±7,0%) e não no grupo DM1+INS (77±7,4%), não foram observadas alterações nos valores de potência (pEC₅₀). Nenhuma alteração foi observada nas curvas ao SNP e ao U46619. Observamos um aumento na concentração de CML e MDA no grupo DM1 comparado ao CTR e uma redução de CML em ambos os grupos DM1+INS e DM1+INS+PDX. As concentrações de SOD somente estiveram aumentadas no grupo DM1+INS+PDX, com redução nos valores de MDA. A produção de NO na artéria coronária foi reduzida após a estimulação por ACh nos grupos DM1 e DM1+INS e os valores foram restaurados no grupo DM1+INS+PDX. **Conclusão:** A redução na resposta relaxante dependente de endotélio em artéria coronária septal de ratas DM1 foi normalizada com a combinação do tratamento com insulina e piridoxamina, associada com redução na peroxidação lipídica, aumento da atividade antioxidante e produção de NO vascular. **Palavra chave:** diabetes mellitus tipo 1, artéria coronária septal, fêmeas, insulina e piridoxamina (inibidor dos AGEs).

ABSTRACT

Introduction: Evidence shows that DM is at high risk for coronary artery disease (CAD), especially in women. The pharmacological approaches used in clinical practice have proved unsatisfactory in preventing vascular complications associated with DM. The high risk of fatal cardiovascular events in diabetic women is still an issue to be studied, in order to improve the prevention and prognosis of vascular complications. The formation of advanced glycation end products (AGEs) is an important pathway involved in these complications, so alternative and innovative pharmacological therapies are required. **Objective:** The aim of this study was to evaluate coronary function in type 1 diabetic rats (DM1) and the effects of insulin and pyridoxamine (AGE inhibitor) co-treatment. **Methods:** Wistar rats (210-220 grams) were divided into: control (CTR), type 1 diabetes (DM1, alloxan 170 mg / kg IP), insulin- treated DM1 (DM1+INS, 2U morning + 4U night) and Insulin and pyridoxamine treated DM1 (DM1+INS+PDX, 180 mg / kg gavage). One week after DM1 confirmation, the rats started treatment for another three weeks (total protocol period of four weeks). Concentration-response curves for acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP) and thromboxane analogue A2 (U46619) were performed on the septal coronary artery. Plasma biochemical parameters were also evaluated: glucose, estradiol, N ϵ - carboxymethyllysine (CML), catalase enzyme activity (CAT), superoxide dismutase (SOD) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Vascular production of nitric oxide (NO) was measured. **Results:** We observed an increase in glucose values and a reduction in body weight, ovarian weight and uterine weight in the DM1 group compared to the CTR group. In the DM1+INS and DM1+INS+PDX groups, glucose values were significantly reduced when compared to the DM1 group but were not normalized when compared to the CTR group. Reduction in uterine body weight was prevented in the DM1+INS and DM1+INS+PDX groups. The maximal responses (EMAX) to ACh were reduced in the DM1 group ($72 \pm 5.7\%$) compared to the CTR group ($97 \pm 8.4\%$), this response was restored only in the DM1+INS+PDX group ($99 \pm 5, 3\%$) and not in the DM1+INS group ($78 \pm 8.0\%$), no changes in power values (pEC₅₀) were observed. No changes were observed in the SNP and U46619 curves. We observed an increase in the concentration of CML and MDA in the DM1 group compared to the CTR and a reduction in CML in both the DM1+INS and DM1+INS+PDX groups. SOD concentrations were only increased in the DM1+INS+PDX group, with a reduction in MDA values. The NO production in the coronary artery was reduced after ACh stimulation in the DM1 and DM1+INS groups and the values were restored in the DM1+INS+PDX group. **Conclusion:** The reduction in the endothelium-dependent relaxing response in the septal coronary artery of DM1 rats was normalized with the combination of insulin and pyridoxamine treatment, associated with reduced lipid peroxidation, increased antioxidant activity and vascular NO production. **Keyword:** type 1 diabetes mellitus, septal coronary artery, females, insulin and pyridoxamine (AGE inhibitor).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ramos das artérias coronárias esquerda e direita.....	18
Figura 2: Resumo do processo de formação de AGEs.....	23
Figura 3: Via de sinalização dos AGEs na célula endotelial.....	24
Figura 4: Grupos experimentais.....	29
Figura 5: Peso corporal inicial e peso corporal final.....	34
Figura 6: Glicemia inicial e glicemia final	35
Figura 7: Consumo alimentar e consumo hídrico.....	35
Figura 8: Proteinúria.....	36
Figura 9: Peso total dos ovários, peso dos ovários/comprimento da tíbia. Peso do útero e peso do útero/comprimento da tíbia.....	38
Figura 10: Concentração de Estradiol plasmático.....	39
Figura 11: Níveis séricos de Carboximetilisina, malondialdeído, atividade da SOD e atividade da enzima catalase	40
Figura 12: Curvas concentração-resposta à acetilcolina, nitroprussiato de e análogo do tromboxano A ₂ em anéis de coronária septal de ratas dos grupos.....	41
Figura 13: Imagens com marcador fluorescente de óxido nítrico em artéria coronária septal na condição basal e após estímulo de acetilcolina (30 µM)..	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: glicemia casual, hora a hora, para cada um dos grupos.....	37
Tabela 2: Valores de potência (pEC50) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP) e análogo do tromboxano A2 (U46619) em anéis de coronária septal de ratas dos grupos.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO VASCULAR - ARTÉRIA CORONÁRIA	17
2.2 DIABETES MELLITUS E COMPLICAÇÕES VASCULARES.....	20
2.3 PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) E INIBIDORES DE AGEs PARA O TRATAMENTO DA DM.....	22
3 OBJETIVOS.....	27
3.1. OBJETIVO GERAL.....	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 ANIMAIS	28
4.2 INDUÇÃO AO DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	28
4.3 TRATAMENTO COM INSULINA E PIRIDOXAMINA	29
4.4 PESO CORPORAL E MEDIDA DE GLICEMIA	29
4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA, SANGUE E TECIDO.....	30
4.6 MASSA DO ÚTERO, CICLO ESTRAL E DOSAGEM DE ESTRADIOL... 30	
4.7 ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS), SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CARBOXIMETILISINA (CML) E ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	31
4.8 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA EM ANÉIS DE ARTÉRIA CORONÁRIA SEPTAL.....	31
4.9 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM ARTÉRIA CORONÁRIA SEPTAL.....	32
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 PESO CORPORAL, GLICEMIA, CONSUMO ALIMENTAR, CONSUMO HÍDRICO E PROTEINÚRIA.....	34
5.2 GLICEMIA CASUAL E O TRATAMENTO COM INSULINA	36
5.3 PESO DOS OVÁRIOS E ÚTERO.....	38
5.4 CICLO ESTRAL E NÍVEIS DE ESTRADIOL.....	37
5.5 TBARS, Nε-CARBOXIMETILISINA (CML), SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	39
5.6 REATIVIDADE VASCULAR.....	40

5.7 PRODUÇÃO DE NO NA ARTÉRIA CORONÁRIA SEPTAL.....	43
6 DISCUSSÃO.....	44
6.1 ALTERAÇÕES METABÓLICAS.....	45
6.2 ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO VASCULAR DA ARTÉRIA CORONÁRIA.....	49
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
8 ANEXO.....	65
8.1 ANEXO A-PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	65
8.2 ANEXO B- DECLARAÇÃO DIREITOS AUTORAIS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é considerado um conjunto de distúrbios metabólicos de etiologia múltipla, sendo caracteriza pela elevação da glicose sanguínea, hiperglicemia crônica (valores de glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl). A Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2019) estima que atualmente 463 milhões de pessoas no mundo tenham diabetes, sendo 232 milhões dos casos não diagnosticados. O Brasil ocupa o 5º lugar, com cerca de 16,8 milhões de adultos diabéticos (entre 20-79 anos). As estimativas para o ano de 2035 são preocupantes podendo o número de diabéticos atingir cerca de 592 milhões (IDF, 2019). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017) afirmou que em 2015 mais de 1,6 milhões de mortes foram causadas diretamente por esta doença.

De acordo com o Ministério da Saúde – Brasil (2006), o impacto do DM na expectativa de vida é considerável. Contudo, embora os distintos tipos de DM compartilhem do estado hiperglicêmico como característica principal, a expectativa de vida, em média, é reduzida em 15 anos para o indivíduo com DM tipo 1 (DM1) e em 5 a 7 anos no DM tipo 2 (DM2) em comparação ao não diabético, sugerindo a existência de possíveis diferenças na condição apresentada em cada um dos tipos de DM.

O diagnóstico precoce do DM e a prevenção das complicações são essenciais na área de saúde pública, principalmente das complicações cardiovasculares. As complicações macro e microvasculares comumente encontradas no indivíduo com DM são frequentemente a causa das doenças cardiovasculares (DCV), como infarto do miocárdio (IM), doença arterial periférica e acidente vascular cerebral (AVC), que resultam em baixa expectativa de vida e elevados custos a saúde (HENNESSY; O'DRISCOLL, 2008).

Diversos autores sugerem que este elevado risco cardiovascular está associado à disfunção endotelial, tanto no DM1 quanto no DM2 (DELBIN; TRASK, 2014; TIENGO; FADINI; AVOGARRO, 2008). Assim, acredita-se que a perda da capacidade funcional do endotélio em regular a homeostase cardiovascular, favoreça efeitos vasoconstritores, pró-inflamatórios e pró-trombóticos (ROBERTS; PORTER, 2013). É importante salientar, que a maioria dos estudos envolvendo a função endotelial e DM foi desenvolvido em modelos de DM2, nesse sentido, sabendo que a integridade funcional do endotélio é crucial para a prevenção de doenças cardiovasculares, estudos envolvendo modelos animais de DM1 tornam-se essenciais

para o entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos.

Foi demonstrado também que as mulheres que evoluem a partir de um estado não diabético para pré-diabetes apresentam altos índices de disfunção endotelial, aumento da pressão arterial e alteração plaquetária (DONAHUE *et al.*, 2007). Evidências mostram que o DM apresenta maior risco para doença arterial coronariana em mulheres (BARRETT-CONNOR; WINGARD, 1983). Além disso, mesmo após correção de outros fatores de risco associados (hipertensão, dislipidemia e obesidade), as mulheres diabéticas apresentaram o dobro de risco para eventos coronarianos em comparação às mulheres não diabéticas (BARRETT-CONNOR; COHN; WINGARD; EDELSTEIN, 1991). Adicionalmente, mulheres diabéticas são 2 vezes mais propensas a terem um segundo infarto e um risco 4 vezes maior de terem insuficiência cardíaca em comparação com mulheres sem diabetes (PETERS; HUXLEY; SATTAR; WOODWARD, 2015).

A Federação Internacional de Diabetes (2019) constatou que a taxa de mortalidade em mulheres com DM é maior do que homens com a mesma patologia, chegando a 2,3 milhões de mulheres e 1,9 milhões de homens. Contudo, o alto risco de eventos cardiovasculares fatais em mulheres diabéticas ainda é uma questão que precisa ser estudada, a fim de melhorar a prevenção e prognóstico de desfechos fatais nesta população.

Estudos realizados envolvendo experimentação animal em fêmeas demonstraram que o DM reduz a proteção dos estrógenos no sistema cardiovascular (SARTORETTO, *et al.* 2018; BOLEGO, *et al.* 1999; BOLEGO, *et al.* 1997). Adicionalmente, foi evidenciado aumento da expressão do receptor de estrógeno 2 (ESR2) e diminuição do receptor de estrógeno 1 (ESR1), sabe-se que o ESR2 induz a ativação de fatores inflamatórios no músculo liso vascular e alterações na produção e biodisponibilidade de NO, podendo estar associado a disfunção vascular (SARTORETTO, *et al.* 2018). Outros estudos mostram que alterações no perfil glicêmico para uma hiperglicemia crônica resulta em uma aceleração da aterosclerose, glicação de lipoproteínas e formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), os quais também podem trazer complicações macro e microvasculares (SIQUEIRA, *et al.* 2007; LAAKSO, 1999).

É importante salientar que as alterações vasculares e os mecanismos pelos quais o DM leva a essas alterações são estudadas principalmente em modelos experimentais envolvendo machos, sendo de extrema importância estudos que

envolvam fêmeas. Em especial, estudos desenvolvidos em artéria coronária são ainda mais escassos em modelos de DM1 em fêmeas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO VASCULAR - ARTÉRIA CORONÁRIA

Cada vaso sanguíneo apresenta características morfofisiológicas específicas que permitem a divisão em artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias (AIRD, 2004; DOS SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; FERREIRA, 2011). A coronária possui características de uma artéria muscular e é dividida em três segmentos, sendo que dois deles surgem de um tronco comum (artéria coronária esquerda) e são: a artéria descendente anterior e a artéria circunflexa, enquanto que o terceiro segmento é a artéria coronária direita (FALETRA; PANDIAN; HO, 2009). Além disso, como o próprio nome sugere, as artérias coronárias formam uma coroa ao redor do coração e fornecem um adequado fluxo sanguíneo ao músculo cardíaco (FALETRA; PANDIAN; HO, 2009; INSTITUTE, 2018).

O ramo descendente anterior da coronária esquerda inicialmente passa atrás do tronco pulmonar alcançando o sulco interventricular, a partir dessa artéria se origina os ramos: septais e diagonais (ANDRADE, 2006). Os septais se dirigem ao septo interventricular e são intramiocárdicos, eles irrigam perpendicularmente o septo ventricular e vão até o ápice cardíaco chegando a fornecer sangue ao feixe de His, já as diagonais seguem para a esquerda irrigando a lateral do ventrículo esquerdo (FALETRA; PANDIAN; HO, 2009). O ramo circunflexo da coronária esquerda posiciona-se no sulco atrioventricular esquerdo e emite outros ramos marginais que fornecem sangue para a lateral do ventrículo esquerdo e para o músculo papilar desse ventrículo (ANDRADE, 2006; FALETRA; PANDIAN; HO, 2009). A artéria coronária direita se origina no seio coronário direito e transita no ventrículo e átrio direito seguindo o sulco atrioventricular (ANDRADE, 2006) (fig.1).

Assim, as coronárias oferecem todo o aporte sanguíneo para o músculo cardíaco e qualquer patologia ou alteração nessas artérias pode levar a implicações sérias ao miocárdio, podendo reduzir o nível de oxigênio e nutrientes para esse músculo.

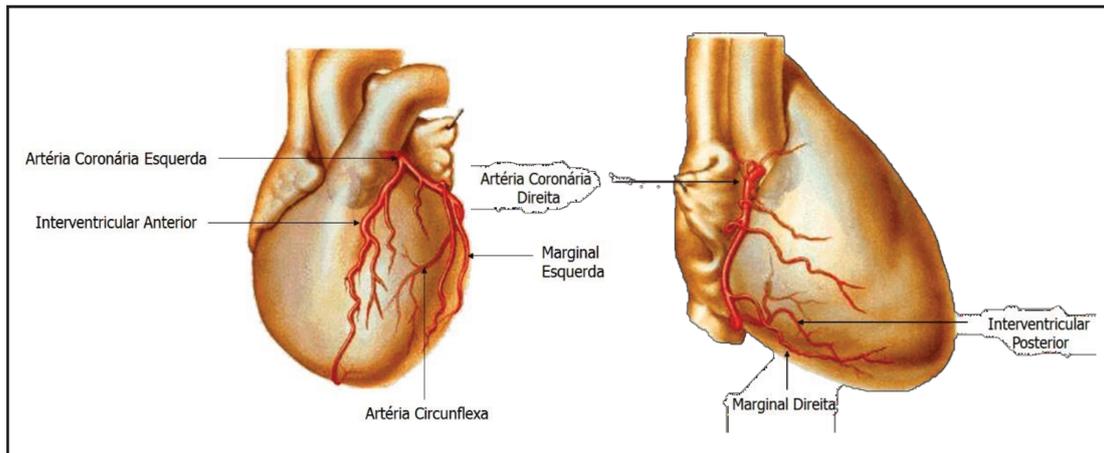


Figura 1: Ramos das artérias coronárias esquerda e direita. (Adaptado de Netter, 2000).

Os vasos sanguíneos são compostos basicamente por três camadas: a camada íntima, média e adventícia. A camada íntima é constituída pelas células endoteliais e está em íntimo contato com os elementos do sangue. A camada média é composta por células musculares lisas e a camada adventícia reveste a parte externa do vaso sendo composta por tecido conjuntivo, fibras colágenas e elásticas. (STANFIELD, 2013).

O endotélio é a camada mais íntima do vaso, é composto por uma monocamada de epitélio pavimentoso, fazendo comunicação entre o sangue e o músculo liso vascular (AIRD, 2004). As principais funções das células endoteliais incluem: modulação do tônus vascular, produção de mediadores envolvidos no crescimento, atividade, migração e morte celular, sensor de alterações hemodinâmicas, transmissor de sinais recebidos das células e da matriz extracelular entre outras funções importantes (CARVALHO; FORTES; TOSTES, 2003).

A modulação do tônus vascular pelo endotélio acontece através da síntese e liberação de substâncias vasoativas que promovem respostas vasodilatadoras como prostaciclina (PGI₂), óxido nítrico (NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Além de respostas vasoconstritoras como endotelinas (ET-1, ET-2 e ET-3), prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TXA₂), angiotensina II (ANGII) e as espécies reativas de oxigênio (EROS) (VANHOUTTE; MOMBOULI, 1996). Além de estar envolvido no controle da trombose pela interação de plaquetas e leucócitos na parede vascular e crescimento de novos vasos (RAJENDRAN *et al.*, 2013).

O NO é uma das substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio mais importante, é capaz de se difundir facilmente através das membranas biológicas e sua

produção é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) a partir de um aminoácido L-arginina, expresso em vários tecidos do organismo (FORSTERMANN; SESSA, 2012; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Em mamíferos, são identificadas três isoformas da NOS: a constitutiva NOS neuronal (nNOS ou NOS I), a NOS induzida (iNOS ou NOS II) e a constitutiva NOS endotelial (eNOS ou NOS III). Todas as isoformas apresentam-se como homodímero e utilizam os seguintes cofatores: dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e tetra-hidrobiopterina (BH₄) (FORSTERMANN; SESSA, 2012).

Embora haja associação entre as isoformas da NOS, há da mesma forma uma importante diferença entre as isoenzimas: enquanto a nNOS e eNOS ligam-se ao complexo cálcio (Ca²⁺)/ calmodulina (CaM) e sua ativação responde a mudanças fisiológicas na concentração intracelular de íons Ca²⁺, a iNOS possui a CaM ligada, sendo possível ativá-las em baixas concentrações de Ca²⁺ (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

A eNOS é amplamente expressa no endotélio vascular, muito sensível a estímulos químicos de agonistas como bradicinina, acetilcolina, entre outros. Do mesmo modo, ela pode ser ativada por estímulo mecânico resultante do aumento do fluxo sanguíneo, pela força de cisalhamento (ou shear stress), que é um dos importantes estímulos para as células endoteliais produzirem NO através do estímulo de mecanosensores que ativam diretamente a proteína G, canais iônicos, integrinas e enzimas quinases e fosfatases, desencadeando mecanismos intracelulares dependentes e independentes de Ca²⁺ (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Depois de sintetizado, o NO se difunde para a musculatura lisa vascular ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) convertendo o trifosfato de guanina (GTP) em monofosfato cíclico de guanina (GMPc). O GMPc estimula a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que pode induzir a hiperpolarização ativando canais de K⁺, contribuindo para o transporte de Ca²⁺ e inibindo a geração de IP₃, reduzindo as concentrações de Ca²⁺ levando a vasodilatação. A PKG também pode reduzir a sensibilidade CaM, reduzindo a contração muscular (IGNARRO *et al.*, 1987).

Além do controle vasomotor pela síntese de NO e outras substâncias, as células endoteliais também possuem capacidade de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo ativando fatores de crescimento celular promovendo o remodelamento da parede arterial e manutenção da integridade do endotélio (FISHER

et al., 2001; SHYY; CHIEN, 2002).

2.2 DIABETES MELLITUS E COMPLICAÇÕES VASCULARES

O diabetes mellitus (DM) é uma condição crônica que ocorre quando há níveis continuamente elevados de glicose sanguínea, devido a ausência ou má produção do hormônio insulina, ou ainda quando esse hormônio não reconhecido e utilizado de forma efetivamente pelos tecidos (DEFRONZO; FERRANNINI; ZIMMET, 2015). Segundo a Federação internacional de diabetes- IDF (2017) a insulina é um hormônio essencial produzido no pâncreas que transporta a glicose sanguínea para os tecidos e a falta desse hormônio ou a incapacidade das células responderem a ele eleva os níveis de glicemia, um dos sinais mais característicos do DM (hiperglicemia).

Associação Americana de Diabetes (2013) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (2014/2015), classificam o DM em quatro principais tipos, sendo: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes gestacional e diabetes em decorrência de outras causas específicas como desordens genéticas, doenças do pâncreas exócrino, induzida por drogas ou substâncias químicas.

O DM1 é uma doença autoimune, poligênica, decorrente de destruição das células β pancreáticas, ocasionando deficiência completa na produção de insulina. Como resultado, a glicose permanece no sangue, em vez de ser deslocada para os tecidos como fonte de energia. Esse processo concentra entre 5 a 10% do total de pessoas com a doença e geralmente aparece na infância ou adolescência, mas pode ser diagnosticado em adultos também (SBD, 2016).

O início do DM1 acontece por volta dos 14 anos de idade e a ausência de insulina diminui a utilização de glicose para os tecidos e aumenta os níveis de glicemia plasmática para cerca de 300 mg/dL (GUYTON e HALL, 2006, p.973). Todavia, indivíduos com DM1 com uma dose adequada de insulina diária, monitorização regular da glicemia e um estilo de vida saudável pode ter uma boa expectativa de vida e evitar muitas complicações associadas ao DM (IDF, 2017).

O DM2 é mais comum correspondendo a cerca de 90% dos casos de DM. É caracterizado por uma desordem na secreção de insulina e surgimento de resistência tecidual a esse hormônio, o nível de insulina nesses indivíduos pode estar normal ou elevado dependendo de quando o DM foi diagnosticado. Normalmente ocorre depois dos 30 anos, e é muito comum na faixa etária de 50 e 60 anos,

possuindo uma evolução gradativa (GUYTON e HALL, 2006, p.974). O DM2 está muito associado a obesidade, inatividade física e uma alimentação desbalanceada, começando a atingir crianças, adolescente e adultos jovens (IDF, 2017).

A DM gestacional é caracterizada pela hiperglicemia geralmente durante o segundo e terceiro trimestre da gestação e pode ocorrer durante toda gravidez. (IDF, 2017). E por fim, a DM relacionada a defeitos genéticos nas células β pancreáticas que prejudicam a secreção de insulina, mas não seu efeito. Normalmente são anormalidades herdadas com padrão autossômico dominante e há duas formas mais comuns: associada a mutações no cromossomo 12 em um fator de transcrição hepática ou mutações no gene da glucoquinase que converte a glicose em glicose-6-forfato essencial no estímulo da secreção de insulina pelas células β . Além da DM relacionada a outros fatores, como uso de drogas tóxicas ao pâncreas, infecções, entre outros (ADA, 2013; SBD, 2014/2015).

As complicações do DM podem ser agudas como hipoglicemia (por efeito do tratamento farmacológico), cetoacidose diabética, coma hiperglicêmico, convulsões e perda da consciência ou crônicas como neuropatias, retinopatias, doença arterial periférica e doença arterial coronariana (DAC) que pode levar a angina e infarto agudo do miocárdio (IAM) (IDF, 2017). Em especial, as doenças cardiovasculares (DCV) apresentam o maior índice de morbidade e mortalidade nos indivíduos com DM (FOX *et al.*, 2004; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2005), causando danos vasculares no coração, olhos, rins e sistema nervoso (IDF, 2017).

A doença arterial coronariana (DAC) está dentro das DCV mais comuns e é a principal causa de morte no mundo (BASTOS, 2016). Cerca de 75 a 90% de diabéticos desenvolvem DAC e alguns autores sugerem que a disfunção endotelial está relacionada ao grande risco cardiovascular apresentado no DM1 e DM2 (DELBIN; TRASK, 2014; TIENGO; FADINI; AVOGARRO, 2008). Comprovando estas hipóteses, a piora na função endotelial já foi demonstrada em vários estudos realizados em modelos experimentais de DM1 (CLAUDINO *et al.*, 2011; DELBIN *et al.*, 2012; SHI; VANHOUTTE, 2008) e de DM2 (BUNKER *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011; MINAMI; ISHIMURA; HARADA; SAKAMOTO *et al.*, 2002).

Contudo, os mecanismos que envolvem e causam as disfunções endoteliais no DM são diversas, complexas e pouco elucidadas (BERTOLUCI; CÉ *et al.*, 2008). O aumento e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio de agentes oxidantes e antioxidantes pode ser

a causa primária das complicações vasculares no DM (STUMP; CLARK; SOWERS, 2005; TIENGO; FADINI; AVOGARRO, 2008), esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do oxigênio (O_2) e também em situações não-fisiológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Cerca de 2 a 5% do O_2 metabolizado nas mitocôndrias é reduzido de forma univalente na cadeia respiratória, dando origem a primeira espécie reativa formada pela redução de O_2 : o ânion superóxido (O_2^-). Também outras reações acontecem envolvendo a via da xantina oxidase e NADPH oxidase, que produzem esse radical e outros radicais livres como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\cdot) (BARBOSA *et al.* 2010). No DM, o aumento na produção de O_2^- impede a ação benéfica do NO no sistema cardiovascular por reduzir sua biodisponibilidade, ao reagir com o NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$) que é instável, muito potente e causa danos a muitas moléculas biológicas (HAMILTON; WATTS, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Além desses fatores, sabe-se que a hiperglicemia crônica leva a um aumento na síntese de produtos finais da glicação avançada (AGEs), substâncias formadas a partir de interações não-enzimáticas entre açúcares, lipídios ou proteínas que se acumulam nos vasos sanguíneos (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; DEVANGELIO *et al.*, 2007). Nas células endoteliais, ao interagirem com seus receptores (RAGE), podem ativar vias de sinalização que causam respostas pró-inflamatórias e aumentam a produção de EROs (DELBIN; TRASK, 2014; TIENGO; FADINI; AVOGARRO, 2008). Além disso, os AGEs podem aumentar a degradação de RNAm bem como reduzir a fosforilação em serina da enzima eNOS, reduzindo sua atividade, e consequentemente a produção de NO (FARMER; KENNEDY, 2009; GOLDIN *et al.* 2006).

2.3 PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) E INIBIDORES DE AGEs PARA O TRATAMENTO DA DM

A hiperglicemia crônica associada ao estresse oxidativo, acelera a formação de AGEs (FORBES; COOPER, 2013). Esses produtos são resultado de uma reação não-enzimática chamada glicação, que se inicia quando açúcares redutores (como a glicose e frutose) reagem com grupos de aminoácidos, lipídeos ou ácidos nucleicos (HANSEN *et al.*, 2017). A glicação foi primeiramente descrita por Louis Camille

Maillard (1878-1936) e com isso também pode ser chamada de Reação de Maillard (HELLWIG; HENLE, 2014).

A via clássica da *reação de Maillard* envolve a formação inicial de *base de Schiff* instável. Essa base é gerada pela condensação do grupo carbonila de um açúcar redutor com um grupo amina oriundo de um aminoácido (VISTOLI *et al.*, 2013). Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos e se altera em uma estrutura chamada produto de Amadori, resultado inicial da reação de Maillard, um exemplo desse produto é a hemoglobina glicada e frutossamina. Esse produto Amadori é mais estável e possui grupo carbonila reativo que se condensa com grupos de aminas primárias, isso dá origem a ligações irreversíveis que são os produtos avançados da reação de Maillard- AGEs (fig.2), um AGE bastante comum e estudado é a carboximetilisina (CML) (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; VISTOLI *et al.*, 2013; YAMAGISHI, 2011).

Existem também outros mecanismos alternativos para formação de AGEs que incluem a via do *estresse carbonílico*, em que a oxidação de lipídeos ou de açúcares leva a produção de compostos altamente reativos chamados: compostos dicarbonílicos intermediários. Os AGEs formados a partir desses compostos podem ser denominados de produtos da glicoxidação ou da lipoxidação avançada (HUEBSCHMANN *et al.*, 2006).

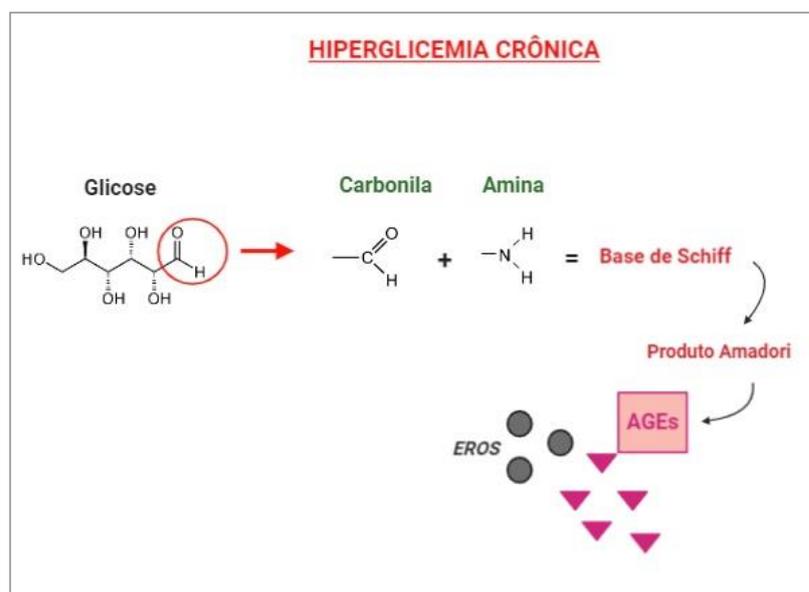


Figura 2: Resumo do processo de formação de AGEs.

Assim, a produção de AGEs acontece de forma endógena (intra ou extracelular) de acordo com os níveis de glicose sanguínea, contudo, existe uma via

necessária para que os AGEs realizem seus efeitos patológicos na célula. Esta via é através da interação desses produtos com seus receptores celulares (FORBES; COOPER, 2013). Existem muitos receptores para AGEs, porém o receptor mais amplamente examinado em complicações diabéticas é o RAGE. É um receptor transmembrana de 45 KDa, da família das imunoglobulinas e está em baixa concentração em vários tecidos humanos como: fígado, rins, sistema cardiovascular, nervoso e sistema imune (BONGARZONE *et al.*, 2017).

A ativação dos RAGEs inicia uma cascata de sinalização levando a produção de EROs, ativação de fatores de transcrição (AP-1 e NF- κ B), entre outros. Uma vez ativados, esses fatores de transcrição migram para o núcleo e aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e enzimas. Essa ativação da via inflamatória bem como a superprodução de EROs leva ao comprometimento da integridade vascular (BONGARZONE *et al.*, 2017). Além disso, a ligação AGE-RAGE reduz a biodisponibilidade e atividade de NO no endotélio através da redução da meia-vida e da fosforilação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), diminuindo e desativando a atividade dessa enzima, respectivamente (GOLDIN *et al.*, 2006).

É importante salientar que a ativação de NF- κ B através da ligação de AGEs ao seu receptor, regula a expressão de RAGE através de um feedback positivo, que promove ainda mais os sinais mediados por RAGE (HANSEN *et al.*, 2017). Ou seja, quanto mais ligação AGE-RAGE, maior a expressão de novos receptores RAGE e consequentemente maior alteração celular (fig. 3).

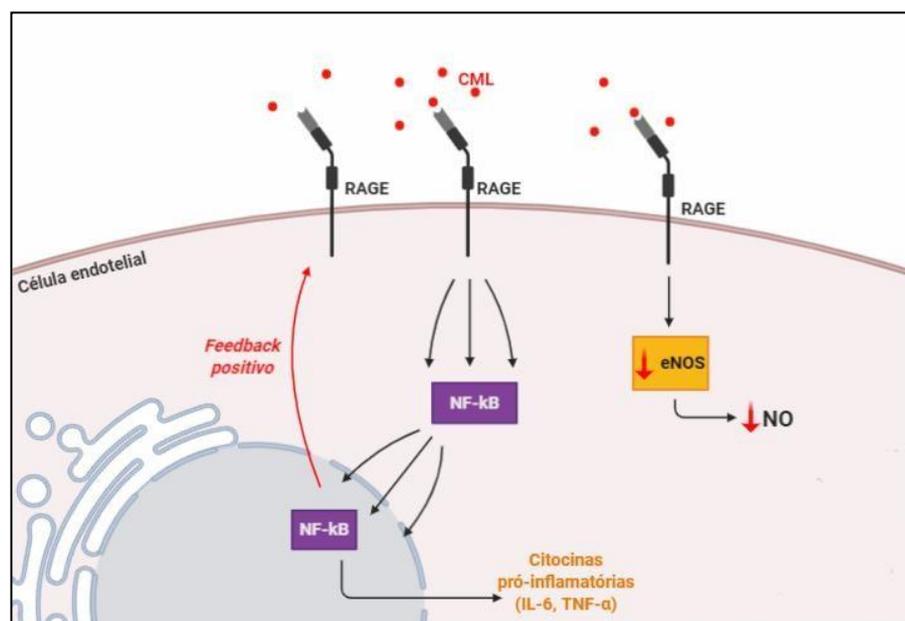


Figura 3: Via de sinalização dos AGEs na célula endotelial.

Diante de tudo isso, vemos o quanto é essencial a busca de terapias para o controle da DM e melhora das complicações geradas por ela, principalmente associadas ao sistema vascular. O tratamento primário do DM se baseia no controle da glicose sanguínea, e já foi demonstrado que há uma redução no risco de desenvolvimento das complicações vasculares associadas ao DM com o controle precoce da glicemia (NATHAN *et al.*, 2005). Avanços foram realizados no sentido de aprimorar o tratamento para os pacientes DM1 e DM2, incluindo o desenvolvimento e uso de insulina com diferentes tempos de ação (FULCHER; GILBERT; YUE, 2005; HOME *et al.*, 2005), bem como o desenvolvimento de novas classes de hipoglicemiantes orais (DEROSA *et al.*, 2004; FONSECA; ROSENSTOCK *et al.*, 2000; YKI-JARVINEN, 2004).

Contudo, foi demonstrado que pacientes jovens com DM1 possuem baixo controle glicêmico (ANARUMA *et al.*, 2016) e que menos dos 25% dos pacientes com DM1 atingem níveis recomendados de glicemia (FAGERUDD *et al.*, 2004). As abordagens farmacológicas utilizadas na clínica mantiveram-se insatisfatórias na prevenção das complicações diabéticas, com isso, terapias farmacológicas alternativas e inovadoras são necessárias para a prevenção das complicações vasculares induzidas pela hiperglicemia no DM.

Neste sentido, destacam-se os fármacos com propriedades que reduzem os produtos finais da glicação avançada (anti-AGEs). Essas substâncias e compostos estão sendo investigados, pois os AGEs estão associados a lesões endoteliais importantes. Interessantemente, alguns dos efeitos dos AGEs aparentam ser independentes do controle da glicose sanguínea, e de fato, mesmo com o controle do DM os níveis circulantes de AGEs continuam elevados, sugerindo que o controle glicêmico é importante, porém não é o suficiente para prevenir as complicações diabéticas (MONNIER *et al.*, 1999).

A piridoxamina é um componente da vitamina B6 e possui propriedade anti-AGEs por múltiplos mecanismos de ação, sendo eles: bloqueador da oxidação de intermediários dos produtos de Amadori, sequestrador de compostos dicarbonil e carbonil derivados dos produtos de Amadori e quelante de íons metálicos (NAGAI *et al.*, 2012; NENNA *et al.*, 2015). Seus efeitos benéficos foram demonstrados em ratos diabéticos na prevenção da progressão da doença renal (DEGENHARDT *et al.*, 2002). Em 2010, estudo clínico (HOUSE *et al.*, 2010) evidenciou que o uso de elevadas doses de vitamina B6 combinada com vitamina B12 e ácido fólico em

pacientes com nefropatia diabética, piorou a função renal e aumentou eventos cardiovasculares (IM e AVC), quando comparados ao grupo placebo. Posteriormente outros autores sugeriram que aparentemente a vitamina B6 não seria a causa destas alterações, apresentando segurança em seu uso (THORNALLEY; RABBANI, 2010). No Brasil, a SBD estabeleceu em sua recente diretriz, que devido ao número limitado de pacientes estudados e a segurança do uso em longo prazo, não existem evidências suficientes que justifiquem a recomendação do uso de suplementos no tratamento da nefropatia diabética (SBD, 2016).

Com relação aos efeitos vasculares da piridoxamina, foi demonstrada sua eficácia na prevenção das lesões vasculares da retina de ratos diabéticos (STITT *et al.*, 2002). Recentes estudos envolvendo animais, evidenciaram os efeitos benéficos da piridoxamina na prevenção das alterações cardiovasculares associadas ao envelhecimento, como redução da hipertrofia cardíaca, aumentou a complacência da aorta, redução do acúmulo de AGEs na aorta e redução da resistência vascular periférica. Mais recentemente, foi demonstrado seu importante papel na redução das alterações metabólicas, inflamatórias e vasculares associadas a obesidade (MAESSEN *et al.*, 2016; UNOKI-KUBOTA *et al.*, 2010), como redução da hipertrofia do adipócito, aumento na sensibilidade à insulina, redução na expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo e redução parcial da disfunção endotelial em aorta.

Até o momento, não existe prevenção para o DM1 e respostas para suas importante associação com o desenvolvimento de disfunção endotelial. Além disso, não existem estudos que tenham investigado os efeitos do co-tratamento com insulina e piridoxamina na função coronariana em ratas DM1.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a função coronariana em ratas diabéticas tipo 1 (DM1) e os efeitos do co-tratamento com insulina e piridoxamina (inibidor dos AGEs), visando a investigação de possíveis vias envolvidas nas complicações microvasculares.

3.2 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a resposta relaxante e contrátil em anéis de artéria coronária septal:
 - Resposta relaxante: acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP);
 - Resposta contrátil: análogo do tromboxano A₂ (U46619);

- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) na artéria coronária septal;

- Avaliação de fatores bioquímicos circulantes: glicose, estradiol, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e N ϵ - carboximetilisina (CML).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEUA-IB-UNICAMP-Protocolo: 4532-1/2017).

Ratas Wistar com quatro semanas de idade foram fornecidas pela UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório-CEMIB) e foram mantidas no Biotério-2 da área de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP (IB-UNICAMP). Os animais foram mantidos em salas com temperatura entre 20-21°C, ciclo normal de 12 horas claro/escuro, caixas coletivas com dois ou três animais em cada e livre acesso à água e a ração comercial (Nuvilab, BRA). As ratas com 8-10 semanas de idade (210-220 gramas) foram então divididas nos seguintes grupos experimentais:

- 1-Ratas controle (CTR, n=30);
- 2-Ratas diabéticas tipo 1 (DM1, n=50);
- 3-Ratas diabéticas tipo 1 tratadas com insulina (DM1+INS, n= 50);
- 4-Ratas diabéticas do tipo 1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX, n=50).

4.2 INDUÇÃO AO DIABETES MELLITUS TIPO I

As ratas permaneceram em restrição alimentar por 15 horas e logo após este período receberam injeção única de aloxana 170 mg/kg intraperitoneal (Sigma Aldrich, MO-EUA), diluída em solução salina (cloreto de sódio 0,9%). No grupo CTR foi injetado solução salina em igual volume. Após dois dias foi confirmada a indução do diabetes tipo 1 utilizando uma gota de sangue caudal e os valores foram constatados por fitas reativas de teste (Advantage Roche, SP-BRA) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche) seguindo as instruções do fabricante. Apenas as ratas que apresentaram glicemia de jejum de 8 horas > 200 mg/dL foram utilizadas no estudo (DIAS *et al.*, 2015). Os animais foram mantidos por 4 semanas.

4.3 TRATAMENTO COM INSULINA E PIRIDOXAMINA

O tratamento com insulina de ação intermediária NPH (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) foi iniciado uma semana após a indução do DM1. As ratas receberam diariamente por 3 semanas, 6 UI de insulina NPH divididas em: 2 UI entre as 6:00-8:00 horas e 4 UI entre as 18:00-20:00 horas. Este esquema foi escolhido de acordo com os resultados obtidos em estudo prévio (SARTORETTO *et al.*, 2013). Os grupos CTR e DM1 receberam injeção de solução salina em igual volume.

O tratamento piridoxamina, inibidor dos AGEs, foi iniciado uma semana após a indução do DM e realizado por gavagem durante 3 semanas (180 mg/kg/dia, Sigma Aldrich), seguindo protocolo previamente descrito (ELSEWEIDY *et al.*, 2013). Os animais dos grupos CTR, DM1 e DM1+INS receberam gavagem contendo água em igual volume. O desenho experimental se encontra abaixo (Figura 4).

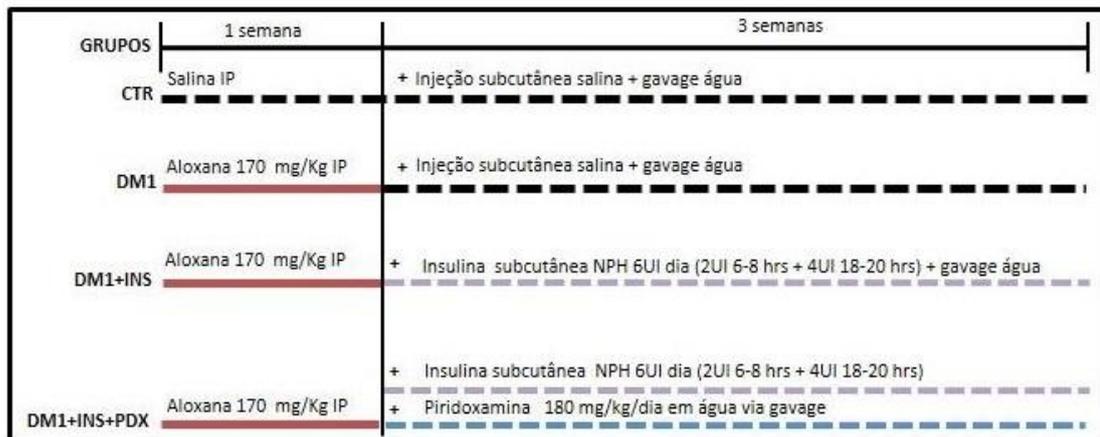


Figura 4: Grupos experimentais

O consumo de água e ração dos animais foram mensurados semanalmente desde o início do protocolo experimental até o final do estudo.

4.4 PESO CORPORAL E MEDIDA DA GLICEMIA

O peso corporal e a glicose sanguínea dos animais foram mensurados ao início do protocolo experimental e semanalmente até o final do protocolo. A glicose sanguínea casual foi mensurada utilizando uma gota de sangue caudal e os valores constatados por fitas reativas de teste (Advantage Roche, SP, BRA) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche) seguindo as instruções do fabricante. Em um lote de ratas a glicemia foi avaliada em diferentes tempos após a injeção de 2UI e 4UI de

insulina NPH. A glicemia foi determinada imediatamente antes ao tratamento pela manhã (inicial) e depois de hora em hora após a injeção de 2UI de insulina NPH até as 18h. Neste horário, 4UI de insulina NPH foi administrada e a glicemia foi determinada de hora em hora até as 20h (SARTORETTO *et al.*, 2013).

4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA, SANGUE E TECIDO

Após este período foram anestesiados com ketamina 80 mg/kg e xilasina 12 mg/kg, uma incisão longitudinal foi feita no abdômen do animal para coleta de amostra de sangue arterial, obtida do ramo descendente da aorta abdominal. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rotações/minuto para obtenção do plasma ou soro, e depois congelados em freezer a -80 °C para posteriores análises. Amostras de urina foram coletadas para posterior análise dos níveis de proteína utilizando kit comercial (Pierce BCA Protein Assay kit, IL-EUA). Em seguida, os animais foram eutanasiados e o coração cuidadosamente removido e banhado em solução preparada de Krebs contendo (mM): NaCl- 118; NaHCO₃- 25; glicose- 5,6; KCl- 4,7; KH₂PO₄- 1,2; MgSO₄.7H₂O- 1,17 e CaCl₂.2H₂O- 2,5.

4.6 MASSA DO ÚTERO, CICLO ESTRAL E DOSAGEM DE ESTRADIOL

O ciclo estral foi avaliado por meio do esfregaço vaginal. As células do esfregaço vaginal foram observadas em microscópio óptico, onde as alterações celulares cíclicas no aparelho reprodutor feminino são refletidas na secreção vaginal e analisadas, permitindo diferenciar as diversas fases do ciclo estral (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Após a eutanásia, o peso total do útero e dos ovários, foi determinado. A concentração do hormônio estradiol foi determinada no soro utilizando-se um kit (Cayman Chemical, MI-EUA / Alpcó, NH-EUA / Cell Biolabs Inc, CA-EUA).

4.7 ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS), SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CARBOXIMETILISINA (CML) E ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

Foram utilizadas amostras de plasma para avaliar a peroxidação lipídica utilizando kit comercial colorimétrico (Cayman, USA) através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é determinada a partir de um padrão de malondialdeído (MDA). Além disso, também avaliamos a concentração de N ϵ -carboximetilisina (CML), análise de superóxido dismutase (SOD, U/ml) e atividade da enzima catalase (CAT) (Cayman Chemical, MI-EUA / Alpco, NH-EUA / Cell Biolabs Inc, CA-EUA) no soro dos animais. A concentração de proteína sérica foi mensurada utilizando kit comercial (Pierce BCA Protein Assay kit, IL-EUA)

4.8 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA EM ANÉIS DE ARTÉRIA CORONÁRIA SEPTAL

O ventrículo direito foi removido, e do septo cuidadosamente foi isolada a artéria coronária. O ramo da artéria coronária foi cortado em anéis de 2 milímetros (mm) e para medir o comprimento de cada anel foi utilizado um microscópio e retículo micrométrico (Nikon Instruments, NY, EUA). Os anéis foram então amarrados utilizando dois fios de tungstênio com 20 μ M de diâmetro cada, utilizando sistema de miógrafo multicanais para vasos de pequeno calibre (Model 610M, DMT A/S, Aarhus NA, Dinamarca). Os anéis depois foram mantidos em 5 ml da solução de Krebs aquecida a 37 °C, pH 7,4 e aerada com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. A tensão basal inicial foi calculada através da normalização da dimensão dos vasos utilizando uma curva de circunferência interna por tensão da parede (MULVANY; HALPERN, 1977) e através dos valores gerados de circunferência interna o diâmetro de cada anel foi calculado. As alterações de tensão do tecido foram registradas em sistema PowerLab 400TM de aquisição de dados (Software versão 7,0, AD Instruments, MA, EUA).

Após o período de 45 min de estabilização, os anéis foram contraídos com KCl 80 mM até a contração máxima, para verificar a viabilidade de cada tecido. Após o teste, os anéis foram lavados com solução de Krebs. Curvas cumulativas concentração-resposta com endotélio intacto aos agonistas vasodilatadores:

acetilcolina (ACh; 1nM - 30 μ M) e nitroprussiato de sódio (SNP; 100pM - 10 μ M) foram obtidas. O relaxamento foi plotado como porcentagem da contração induzida pelo U46619 (em concentração de 100 nM). O efeito contráteis desse agonista U46619 (1nM - 10 μ M) também foram avaliados. Os valores de contração foram plotados em mN por milímetro de artéria (mN/mm).

As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: resposta máxima que o agonista produz (E_{MAX}), concentração do agonista necessária para produzir metade da resposta máxima ($\log EC_{50}$ - pEC_{50}) e coeficiente angular ou inclinação da curva concentração-resposta (n) foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EUA).

4.9 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM ARTÉRIA CORONÁRIA SEPTAL

A produção tecidual de NO foi avaliada pela análise da fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma, Aldrich, St, Louis, MO, EUA), como previamente descrito (DELBIN; DAVEL; COUTO; DE ARAUJO *et al.*, 2012). O diacetato (DAF-2 DA) atravessa a membrana celular e é hidrolisado por esterases do citosol em DAF-2. Na presença de NO e oxigênio, DAF-2 é convertido em triazol emitindo uma fluorescência verde (KOJIMA *et al.*, 1998). O ensaio foi realizado em um anel de artéria coronária septal de aproximadamente 5 mm imerso em meio para congelamento Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek Inc., Torrance, EUA), e então criosecções de 20 μ m de espessura foram obtidas em criostato a -25°C. Entre 2-3 cortes de cada amostra foram colocados sobre lâminas com silanina e incubados com 100 μ l de tampão fosfato 0,1M (pH=7,4) contendo cálcio (0,45mM) por 10 minutos em câmara úmida a 37°C.

Posteriormente, uma nova incubação foi realizada com tampão fosfato e DAF-2 (8 μ M) por 25 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação basal. Um segundo corte da mesma amostra foi incubado com o mesmo tampão (contendo cálcio e DAF-2), porém após 15 minutos de incubação foi acrescentado 30 μ M de acetilcolina e a incubação permaneceu por mais 15 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação

ACh.

As imagens foram captadas em microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Japan), utilizando-se objetiva 20X acoplada a uma câmera fotográfica (DS-U3, Nikon). Para a fluorescência de DAF-2 utilizamos o filtro de fluoresceína e sua quantificação foi realizada utilizando o Software ImageJ 1.46p (NIH, EUA). Mediu-se a densidade integrada em 10 regiões aleatórias de cada corte com área fixa e a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra.

A quantificação da produção de NO pela fluorescência de DAF-2 foi apresentada pela diferença entre intensidade densitométrica após estímulo com 30 μ M de ACh e a intensidade densitométrica do basal. Os dados de fluorescência ao DAF-2 foram normalizados relativamente aos dados do grupo controle (CTR), para os quais foi atribuído um valor médio igual a 1.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores experimentais foram expressos como média \pm S.E.M. de n experimentos indicados em cada caso. Análise de variância, ANOVA uma via, seguida de post hoc de Bonferroni e Dunnet, foi empregada para avaliar diferenças entre os grupos experimentais utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 PESO CORPORAL, GLICEMIA, CONSUMO ALIMENTAR, CONSUMO HÍDRICO E PROTEINÚRIA

O peso corporal inicial foi similar em todos os grupos experimentais (Fig. 5A). No entanto, após quatro semanas de protocolo o grupo DM1 apresentou redução do peso corporal (aproximadamente 26%) comparado ao grupo CTR (Fig. 5B). O tratamento com insulina foi eficaz na prevenção da perda de peso no grupo DM1+INS, sendo esse resultado também observado no grupo DM1+INS+PDX quando comparados ao grupo DM1 (Fig. 5B).

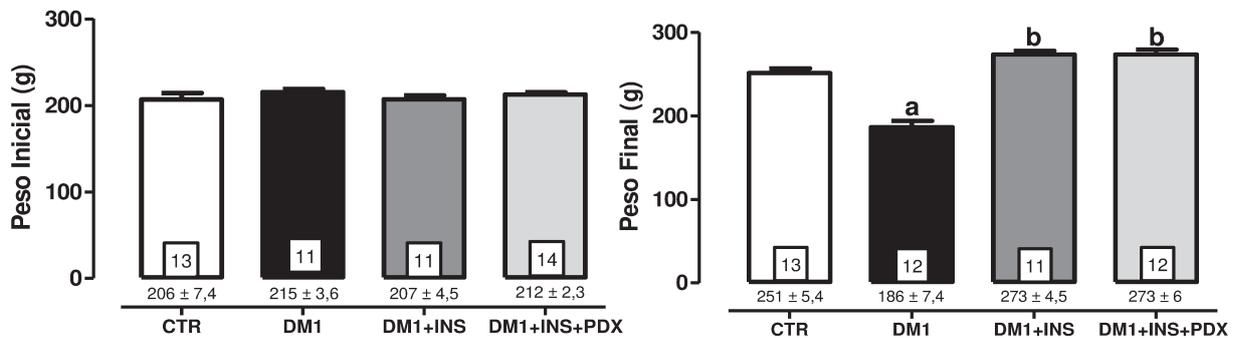


Figura 5: Peso corporal inicial (gramas, painel A), peso corporal final (gramas, painel B), Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. ^a p<0,05 comparado ao grupo CTR; ^b p<0,05 comparado ao grupo DM1.

Todos as ratas no início do protocolo experimental apresentaram glicemia normal, jejum de 8h (Fig. 6A). Ao final do protocolo experimental as ratas foram mantidas em jejum de 15 horas e conforme esperado, após quatro semanas, as ratas do grupo DM1 apresentaram glicemia elevada (aproximadamente 6,6 vezes) comparadas ao grupo CTR (Fig. 6B). O tratamento com insulina foi eficaz em reduzir os valores de glicemia no grupo DM1+INS comparado ao grupo DM1, porém ainda elevados (aproximadamente 3,7 vezes) quando comparados ao grupo CTR. Esse resultado também foi observado no grupo DM1+INS+PDX quando comparado ao grupo DM1 e CTR (aproximadamente 3,2 vezes) (Fig. 6B), sem efeito adicional na glicemia com o co-tratamento com INS+PDX. É importante salientar que na noite anterior à eutanásia, as ratas não foram tratadas com 4UI de insulina para prevenir o óbito por hipoglicemia, já que os animais não teriam livre acesso à alimentação.

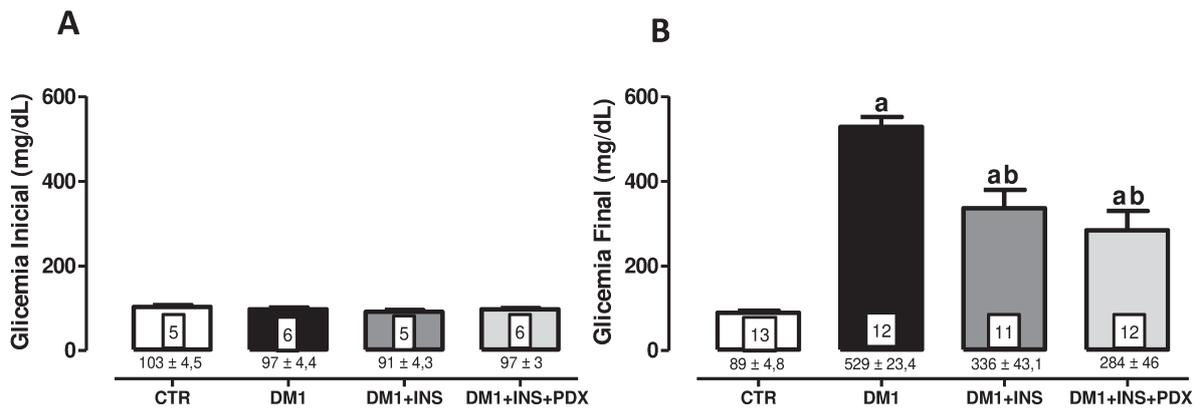


Figura 6: Glicemia inicial (mg/dL, painel A) e glicemia final (mg/dL, painel B). Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. ^a p<0,05 comparado ao grupo CTR; ^b p<0,05 comparado ao grupo DM1.

As ratas DM1 apresentaram um aumento no consumo alimentar e hídrico comparado ao CTR, o tratamento com insulina (DM1+INS) e o associado a piridoxamina (DM1+INS+PDX) não reverteu o consumo alimentar, contudo foi eficaz em reduzir o consumo hídrico desses animais (fig. 7).

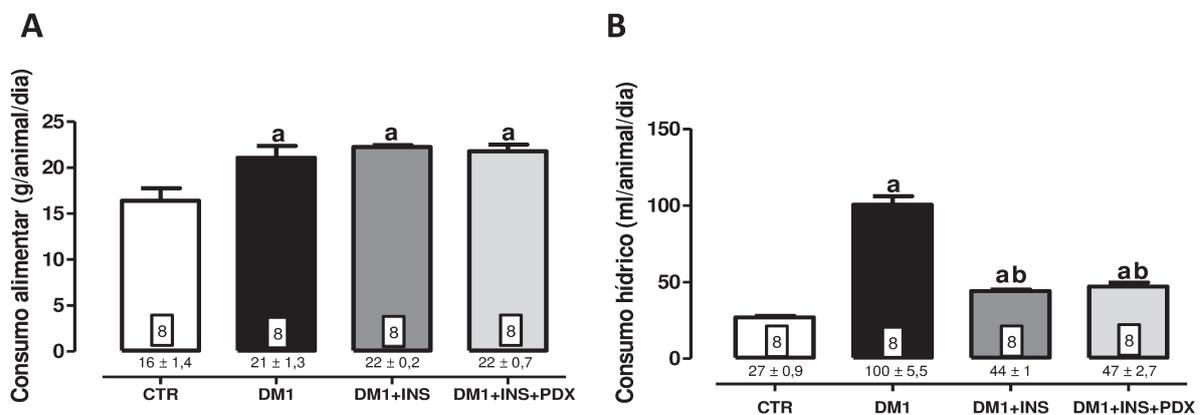


Figura 7: Consumo alimentar (g/animal/dia, painel A) e consumo hídrico (mL/animal/dia, painel B). Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. ^a p<0,05 comparado ao grupo CTR; ^b p<0,05 comparado ao grupo DM1.

Em relação a proteinúria, as ratas DM1 apresentaram um aumento na concentração de proteínas na urina (aproximadamente 2,4 vezes) comparado ao grupo CTR. Os tratamentos não alteraram os resultados dessa concentração nos grupos DM1+INS e DM1+INS+PDX, mantendo-se ainda elevado (fig. 8).

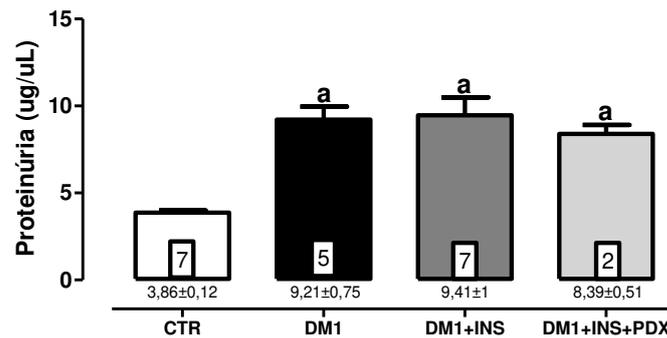


Figura 8: Proteinúria (ug/uL). Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. ^a p<0,05 comparado ao grupo CTR.

5.2 GLICEMIA E O TRATAMENTO COM INSULINA

A glicemia casual foi verificada hora a hora, medida das 08:00 às 20:00 horas. Após 1 hora da injeção de 2UI de insulina NPH, observamos redução nos valores de glicemia das ratas do grupo DM1+INS e após 2 horas redução no grupo DM1+INS+PDX, permanecendo inferior aos valores das 8:00 horas por aproximadamente 7 horas (até às 15:00 horas) no grupo DM1+INS e por aproximadamente 5 horas no grupo DM1+INS+PDX (até às 14:00 horas, Tabela 1). No período entre tratamentos, os valores de glicemia para esses grupos gradativamente voltavam ao valor inicial, observado antes da administração de insulina. Após 1 hora de 4UI de insulina NPH, observamos redução nos valores de glicemia das ratas do grupo DM+INS, permanecendo até às 20:00 horas (Tabela 1). No grupo DM1+INS+PDX, observamos tal redução somente após 2 horas (Tabela 1), permanecendo até às 20:00 horas.

Os grupos CTR e DM1, que não receberam tratamento com insulina não apresentaram alterações significativas nos valores de glicemia no decorrer das 12 horas analisadas. O grupo DM1 apresentou todos os valores maiores que 500 mg/dL, chegando a atingir valores médios maiores que 600 mg/dL (11:00), valor esse considerado limítrofe em relação à sensibilidade das fitas reativas (Tabela 1).

Tabela 1: Glicemia casual (em miligramas por decilitro), hora a hora, para cada um dos grupos: controle (CTR), diabéticas tipo 1 (DM1), com DM1 e tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX).

	CTR (n=13)	DM1 (n=11)	DM1+INS (n=13)	DM1+INS+PD X (n=6)
8:00	122,8 ± 2,3	570,8 ± 22,0	291,5 ± 47,6	209,7 ± 77,0
	-	-	Insulina 2UI	Insulina 2UI
9:00	127,4 ± 4,2	569,2 ± 31,0	173,2 ± 54,6 †	111,2 ± 29,4
10:00	126,3 ± 3,2	567,4 ± 32,6	157,7 ± 46,4 †	53,7 ± 5,3 †
11:00	132,0 ± 5,6	> 600	147,5 ± 39,2 †	54,8 ± 9,0 †
12:00	127,2 ± 4,3	561,8 ± 31,1	137,4 ± 36,7 †	67,0 ± 8,5 †
13:00	123,8 ± 5,4	551,5 ± 36,4	153,9 ± 38,1 †	59,8 ± 12,4 †
14:00	122,5 ± 6,0	525,4 ± 49,3	170,2 ± 43,8 †	76,2 ± 23,8 †
15:00	121,9 ± 4,7	532,1 ± 35,6	190,8 ± 42,7 †	151,0 ± 21,8
16:00	110,5 ± 5,3	545,9 ± 38,1	215,7 ± 41,2	169,7 ± 26,0
17:00	125,0 ± 5,0	552,2 ± 38,2	221,3 ± 44,2	213,8 ± 53,1
	-	-	Insulina 4UI	Insulina 4UI
18:00	126,5 ± 4,3	542,5 ± 41,2	111,6 ± 29,7 ‡	164,3 ± 82,7
19:00	129,4 ± 6,0	555,4 ± 44,7	69,5 ± 12,7 ‡	46,2 ± 2,7 ‡
20:00	115,9 ± 4,0	560,2 ± 40,0	111,1 ± 22,4 ‡	44,7 ± 4,9 ‡

5.3 PESO DOS OVÁRIOS E ÚTERO

Os valores de peso total dos ovários, peso dos ovários/comprimento da tibia, peso total do útero e peso do útero/comprimento da tibia, foram reduzidos no grupo DM1 comparado ao grupo CTR. O tratamento com insulina preveniu este resultado no grupo DM1+INS quando comparado ao grupo DM1 para o peso total dos ovários e

peso total do útero. No grupo DM1+INS+PDX também observamos a prevenção (Fig.9, painéis A e C). Esses resultados não foram observados para o peso dos ovários /comprimento da tibia e peso do útero/comprimento da tibia (Fig., painéis B e D).

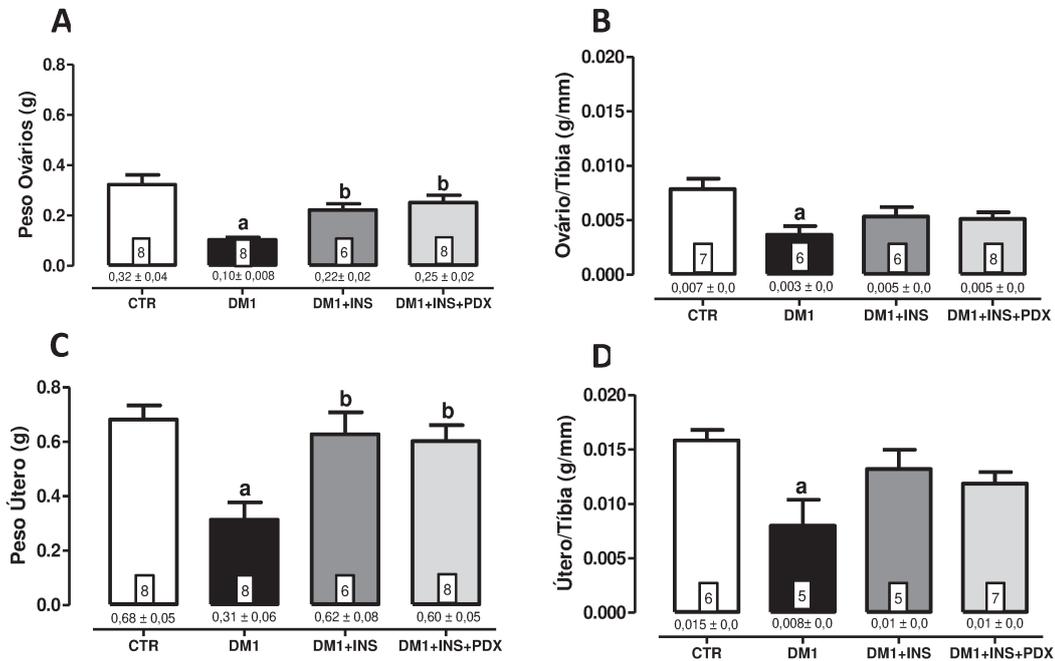


Figura 9: Peso total dos ovários (gramas, painel A) e peso dos ovários/comprimento da tibia (gramas/milímetro, painel B). Peso do útero (gramas, painel C) e peso do útero/comprimento da tibia (gramas/milímetro, painel D). Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. ^a p<0,05 comparado ao grupo CTR; ^b p<0,05 comparado ao grupo DM1.

5.4 CICLO ESTRAL E NÍVEIS DE ESTRADIOL

O estágio do ciclo estral no último dia do protocolo experimental foi determinado pela análise de esfregaço vaginal, porém por não encontramos diferenças nas respostas vasculares dos animais em diferentes dias do ciclo, os resultados não foram apresentados, conforme resultados anteriores (SANZ; FERNANDEZ; MONGE; MARTINEZ *et al.*, 2003).

A concentração sérica de estradiol foi semelhante entre todos os grupos experimentais (fig. 10).

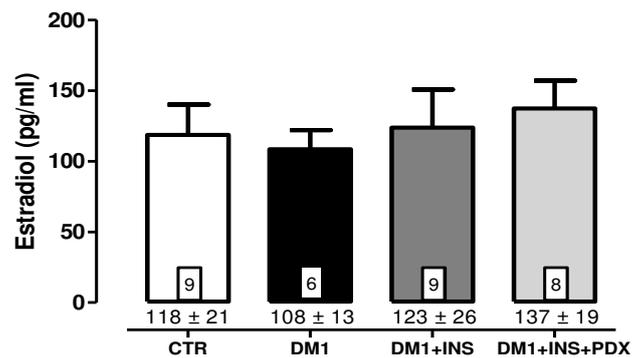


Figura 10: Concentração de Estradiol plasmático (pg/ml). Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura.

5.5 TBARS, N ϵ -CARBOXIMETILISINA (CML), SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A concentração plasmática de CML esteve elevada no grupo DM1 comparado ao CTR (fig.11, painel A) e os tratamentos reduziram esse valor. Já em relação a produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), verificamos um aumento nos níveis séricos de malondialdeído (MDA) no grupo DM1 e DM1+INS comparado ao CTR. O tratamento com PDX foi eficaz para reduzir esse valor (fig.11, painel B). A atividade da SOD esteve elevada somente no grupo DM1+INS+PDX (fig 12, painel C) e além disso, não houve alteração na atividade da enzima catalase entre os grupos experimentais (fig.11, painel D).

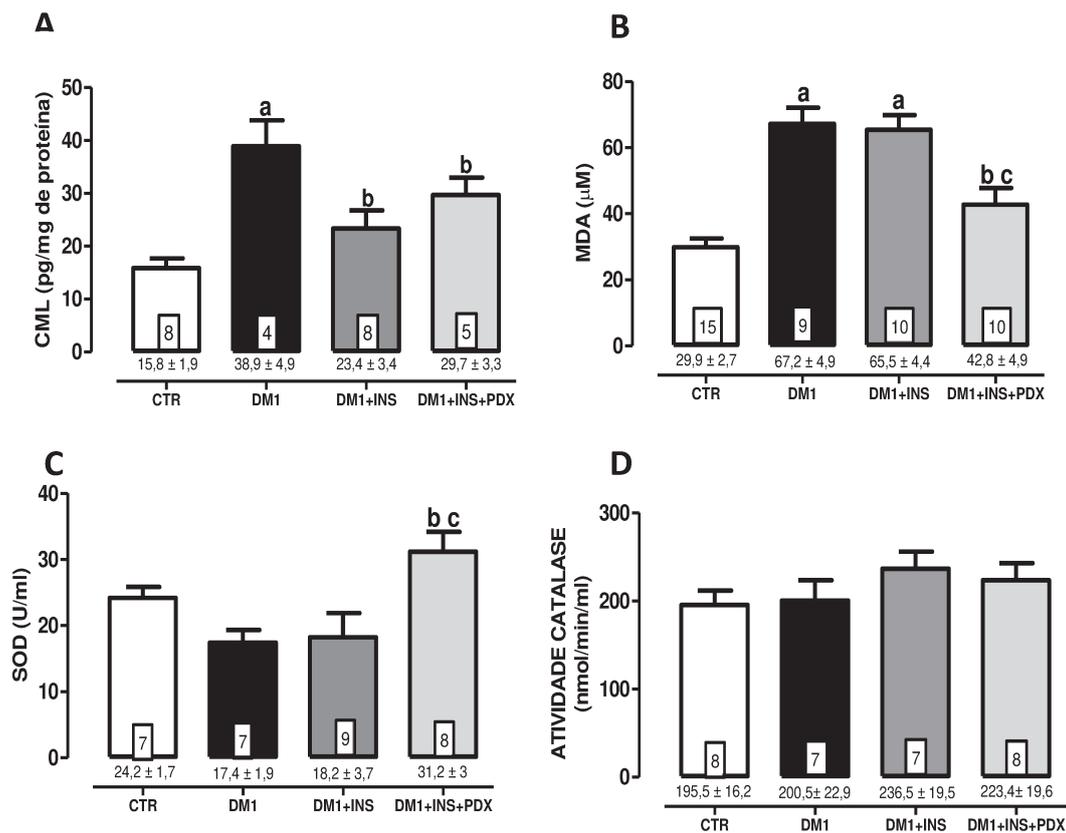


Figura 11: Níveis séricos de Carboximetilisina (ng/mL), painel A; malondialdeído (μM), painel B; atividade da SOD (U/ml), painel C e atividade da enzima catalase (mmol/min/mL), painel D. Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. ^a p<0,05 comparado ao grupo CTR; ^b p<0,05 comparado ao grupo DM1; ^c p<0,05 comparado ao grupo DM1+INS.

5.6 REATIVIDADE VASCULAR

A tensão basal inicial na artéria coronária septal foi calculada através do método de normalização, considerando a circunferência interna de cada anel. Através dos valores de circunferência interna foi calculado o diâmetro interno dos anéis e nenhuma alteração foi constatada no diâmetro vascular em todos os grupos experimentais (Fig. 12A).

Os agonistas acetilcolina (ACh: 1 nM - 100 μM) e nitroprussiato de sódio (SNP: 10 pM - 10 μM) produziram relaxamento concentração-dependente em anéis de coronária septal de ratas. Redução significativa nos valores de resposta máxima (EMAX) à ACh foi constatada no grupo DM1 (aproximadamente 25% de redução), quando comparado ao grupo CTR (Fig. 12B). Apenas o tratamento com insulina no grupo DM1+INS não foi eficaz em normalizar a reatividade vascular quando

comparado ao grupo CTR (aproximadamente 19% de redução). Por sua vez o co-tratamento no grupo DM1+INS+PDX foi capaz de prevenir essa diminuição quando comparado aos grupos DM1 e DM1+INS (Fig. 12B). Os valores de potência (pEC50) Não foram alterados em todos os grupos experimentais. Porém, existe uma tendência de redução da pEC50 no grupo DM1 (aproximadamente 3,9 vezes) quando comparado ao grupo CTR. Nos grupos DM1+INS e DM1+INS+PDX essa tendência não foi observada (Tabela 2). Os valores de EMAX e pEC50 ao doador de óxido nítrico, SNP não foram alterados em todos os grupos experimentais (Fig.12C, Tabela 2).

O análogo do tromboxano A2 (U46619: 100 pM - 3uM) produziu contração concentração-dependente em anéis em anéis de coronária septal de ratas. Os valores de EMAX e pEC50 não foram alterados em todos os grupos experimentais (Fig.12D, Tabela 2). Porém, existe uma tendência de aumento da pEC50 no grupo DM1+INS (aproximadamente 4,3 vezes) quando comparado ao grupo CTR. Nos grupos DM1 e DM1+INS+PDX essa tendência não foi observada (Tabela 2).

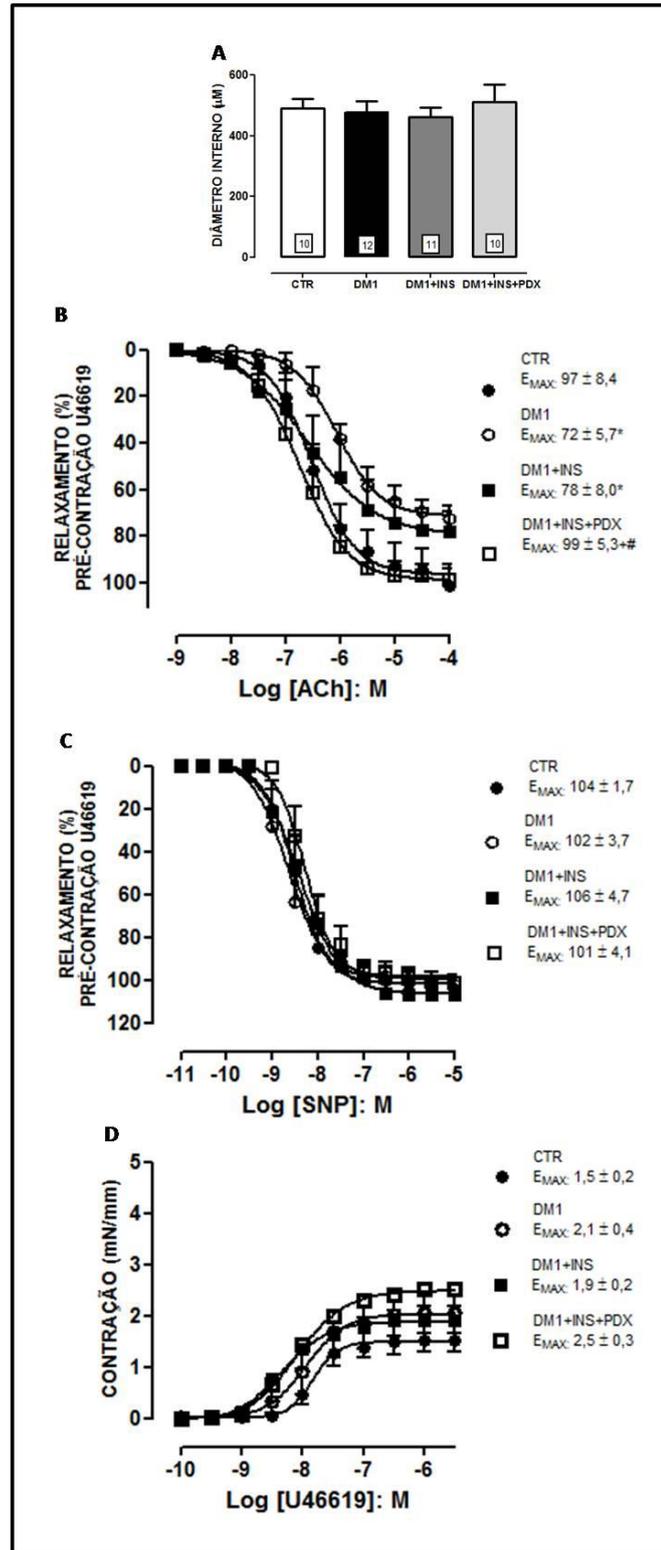


Figura 12: Diâmetro da artéria coronária septal (painel A). Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, painel B, n=5-6 animais), nitroprussiato de sódio (SNP, painel C, n= 7-9 animais) e análogo do tromboxano A2 (U46619, painel D, n=3-4 animais) em anéis de coronária septal de ratos dos grupos: controle (● CTR), com diabetes tipo 1 (○ DM1), com DM1 tratadas com insulina (■ DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (□ DM1+INS+PDX). *p<0,05 comparado ao grupo CTR; +p<0,05 comparado ao grupo DM1; # p<0,05 comparado ao grupo DM1+INS.

Tabela 2: Valores de potência (pEC_{50}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP) e análogo do tromboxano A_2 (U46619) em anéis de coronária septal de ratas dos grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX).

	GRUPOS - pEC_{50}			
	CTR	DM1	DM1+INS	DM1+INS+PDX
ACh	6,69±0,17	6,10±0,16	6,49±0,30	6,72±0,15
SNP	8,52±0,22	8,60±0,22	8,47±0,17	8,20±0,13
U46619	7,84±0,10	7,87±0,14	8,47±0,18	8,06±0,18

Valores de potência são representados como $-\log$ da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima.

5.7 PRODUÇÃO DE NO NA ARTÉRIA CORONÁRIA SEPTAL

Não observamos diferenças nos valores de NO basal em artéria coronária septal em todos os grupos estudados. Porém, após o estímulo com acetilcolina (30 μ M) uma redução significativa na produção de NO nos grupos DM1 e DM1+INS quando comparado ao grupo CTR foi observada. O co-tratamento com insulina e piridoxamina foi efetivo em prevenir essa alteração no grupo DM1+INS+PDX (Fig. 13).

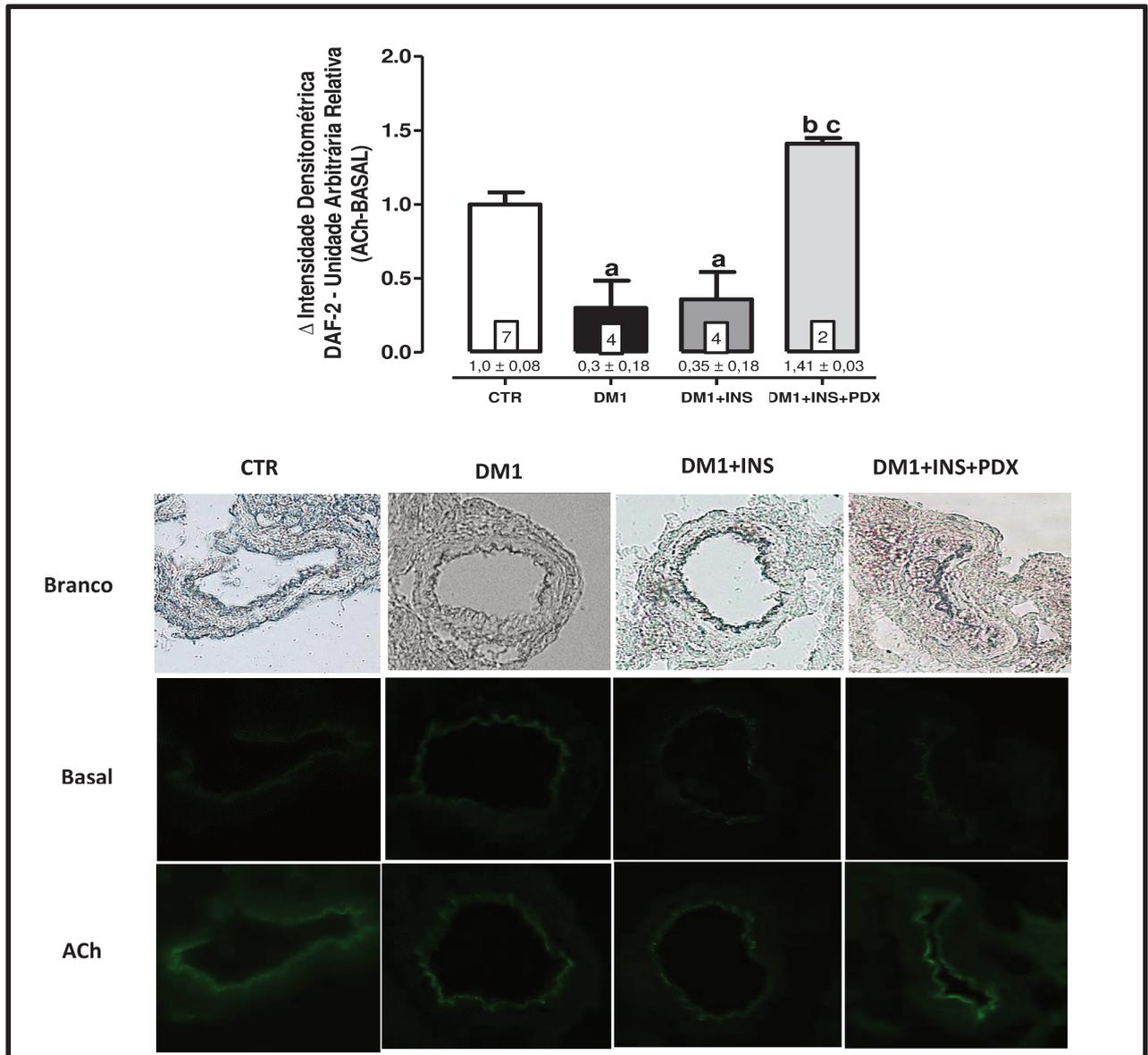


Figura 13: Imagens com marcador fluorescente de óxido nítrico em artéria coronária septal na condição basal e após estímulo de acetilcolina (30 μ M). Gráfico contendo a quantificação delta da acetilcolina menos basal (painel A). Grupos: controle (CTR), com diabetes tipo 1 (DM1), com DM1 tratadas com insulina (DM1+INS1) e com DM1 tratadas com insulina e piridoxamina (DM1+INS+PDX). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA 1 via. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo DM1; ^c comparado do grupo DM1+INS.

6 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus é uma doença crônica que afeta diversos sistemas fisiológicos, em especial, o sistema cardiovascular. Estudos que envolvem a indução do diabetes em modelos animais mostram-se essenciais para melhor conhecimento da área e a disfunção endotelial como consequência da hiperglicemia, desempenha papel principal no desenvolvimento das complicações vasculares associadas a essa doença (TIENGO; FADINI; AVOGARRO, 2008).

Em nosso estudo, conforme esperado, demonstramos que a hiperglicemia foi acompanhada por significativa redução na resposta relaxante dependente de endotélio em artéria coronária associada a diminuição do NO vascular. Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo e progressão da doença (SHI; VANHOUTTE, 2008), observamos aumento significativos nos níveis plasmáticos de MDA e CML, demonstrando assim possível alteração no mecanismo de produção e/ou disponibilidade de NO vascular nesse modelo experimental. Apenas o controle glicêmico realizado no grupo tratado com insulina não preveniu as alterações vasculares induzidas pelo DM1, mas reduziu os níveis circulantes de CML. Por sua vez, o co-tratamento com insulina de piridoxamina apresentou efeitos benéficos no estado redox com aumento da atividade da SOD e redução dos níveis de MDA e CML, com normalização do relaxamento dependente de endotélio em artéria coronária e produção de NO vascular.

6.1 ALTERAÇÕES METABÓLICAS

As ratas de 8-10 semanas de idade apresentaram características de DM1 após 48h de indução com aloxana intraperitoneal. A indução experimental do DM1 em animais através do uso de agentes químicos que possuem seletividade para a destruição das células β pancreáticas é muito utilizado, sendo a aloxana um dos agentes diabetogênicos mais utilizados no meio científico (LERCO *et al.*, 2003). Essa droga é captada pelas células pancreáticas através do transportador de glicose 2 (GLUT 2), sua ação intracelular resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais afetam o metabolismo oxidativo da célula, com subsequente necrose seletiva das células β e morte celular (LENZEN, 2008).

Sob esses efeitos, caracteriza-se no animal um modelo de DM1, haja vista uma ausência quase completa da secreção de insulina e conseqüente impedimento da captação de glicose por tecidos dependentes desse peptídeo (SARTORETTO, 2009; LENZEN, 2008). Ademais, sinais físicos observados nos animais condizem com sinais reportados nas condições de valores elevados de glicose sanguínea, como letargia, temperatura corporal mais baixa que o normal, costas arqueadas e pelos eriçados. Além de sinais e sintomas semelhantes aos encontrados em humanos diabéticos, tais como a perda de peso, glicosúria, polifagia, polidipsia, cetonúria e cetonemia (DIAS et al., 2015; LERCO et al., 2003).

Em nosso estudo, foi observado redução no peso corporal no grupo DM1, o que traz grande confirmação do estado diabético desses animais, isso associado a hiperglicemia. Alguns estudos também reportam, como esperado, essa redução do peso corporal tanto em fêmeas quanto em machos (SANZ *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2003), além de uma hiperglicemia acima de 200 mg/dL chegando a valores próximos de 600mg/dL (DELBIN *et al.*, 2012; SANZ *et al.*, 2003; SARTORETTO *et al.*, 2013), o que corrobora os dados que encontramos.

A ausência de insulina leva o organismo a um estado catabólico que afeta o metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas. A utilização de glicose pelos músculos e tecido adiposo se encontra reduzida ou abolida e com isso, o armazenamento de glicogênio no fígado e músculo esquelético é interrompido para suprir as demandas teciduais, acabando as reservas existentes através da glicogenólise (MAITRA *et al.*, 2005). Com a ausência de insulina a enzima lipase hormônio-sensível nas células adiposas ficam intensamente ativadas levando a hidrólise de triglicérides armazenados liberando ácidos graxos e glicerol no sangue, bem como reduzindo o peso corporal (GUYTON e HALL, 2006).

A insulina é o tratamento primário utilizado no DM1, sua aplicação exógena subcutânea melhora a capacidade corporal de metabolizar carboidratos, armazenar glicose no fígado e converter glicogênio em tecido adiposo. Tem efeito imediato e significativo na redução da glicemia mantendo os níveis de glicose sanguínea dentro da faixa de normalidade (FREELAND; FARBER, 2016). Esse conhecimento esclarece o motivo do tratamento com insulina ser tão eficaz no aumento do peso corporal e melhora da hiperglicemia dos animais em estudo. Até o momento, é o único hormônio capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue (SHERWOOD, 2011), dessa forma, sugerimos que a redução glicêmica seja potencialmente pela ação da insulina e não

da PDX nos animais tratados com insulina e PDX concomitantemente, embora alguns estudos trazem a ação isolada da PDX reduzindo a glicemia em animais DM1 e DM2 (ABOUZED *et al.*, 2016; CHIAZZA *et al.*, 2017; ELSEWEIDY *et al.*, 2013).

Conforme demonstrado pelo acompanhamento dos níveis glicêmicos, há expressiva flutuação de tais valores nos animais tratados com insulina, resultado que demonstra desafios do controle glicêmico e reafirma a importância de novas terapias ao DM1. Ainda que se utilizem as já desenvolvidas insulinas com diferentes tempos de ação, é sabido que a manutenção da glicemia em níveis desejados é difícil e abrange baixa parcela da população diabética (FAGERUDD *et al.*, 2004; TURNER *et al.*, 1999). Foi demonstrado que pacientes jovens com DM1 possuem baixo controle glicêmico (ANARUMA *et al.*, 2016) e que menos dos 25% dos pacientes com DM1 atingem níveis recomendados de glicemia (FAGERUDD *et al.*, 2004).

As ratas DM1 também apresentaram uma diminuição no peso do útero e dos ovários, que foi recuperada pelo tratamento com insulina e PDX. Já se sabe que a insulina também tem papel importante na manutenção e regulação da função reprodutiva (SARTORETTO *et al.*, 2009), com isso, as ratas DM1 por apresentarem uma ausência da síntese de insulina podem trazer alterações hormonais e nas fases reprodutivas desses animais.

A fase reprodutiva nos animais é chamada de ciclo estral, e nas ratas ele tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (MARCONDES *et al.*, 2002). Os ciclos estrais são caracterizados por alterações morfológicas nos ovários, útero e vagina, que ocorrem durante diferentes fases. As alterações estruturais observadas no epitélio vaginal de ratas durante o ciclo estral são induzidas por estrogênio e progesterona, refletindo a atividade dos hormônios sexuais na função ovariana (PACCOLA *et al.*, 2013).

Durante o proestro, o nível de estrogênio aumenta e os folículos ovarianos crescem rapidamente (MAEDA *et al.*, 2000). A ovulação ocorre durante a noite do estro, assim a receptividade sexual aparece essencialmente no período escuro a fase de estro (GOLDMAN *et al.*, 2007; JOHNSON, 2007). Na ausência de acasalamento no momento da ovulação, os corpos lúteos são transitoriamente funcionais e secretam uma pequena quantidade de progesterona (JOHNSON, 2007).

Alguns estudos demonstraram que o DM pode interferir na função

reprodutiva de ratas, havendo manutenção do ciclo estral em dias, porém com redução no período de estro e do número de oócitos no estro (JAWERNAUM et al., 1996; IRANLOYE et al., 2017), adicionalmente, foi demonstrado redução nas concentrações hipotalâmicas de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e séricas de estradiol, com aumento de hormônio luteinizante (LH) em ratas DM1 no diestro ou proestro, indicando anormalidade no eixo hipotálamo-hipófise-ovário (VALDES et al., 1990). Os níveis séricos de hormônio folículo estimulante (FSH) e LH estão reduzidos em estro, sem alterações nas demais fases do ciclo estral, com redução de estradiol em todas as fases do ciclo e de progesterona em proestro, estro e metaestro em ratas DM1 (IRANLOYE et al., 2017). No entanto, não foi constatada alteração de estradiol em diestro, apenas redução de progesterona associado com redução na massa uterina total e seca em ratas DM1, com normalização dos valores após tratamento com insulina (AKAMINE et al., 2006; SARTORETO 2013).

O estradiol está envolvido na homeostasia da glicose e resistência a insulina em homens e mulheres (BARROS et al., 2006). As taxas de estrógenos em mulheres diabéticas apresentaram reduzidas quando comparado as não diabéticas, sendo esses hormônios também essenciais para melhorar atividade antioxidante e anti-inflamatória (XU et al., 2014). Um estudo demonstrou que o estrógeno suprime a produção de glicose hepática através da ativação da sinalização do receptor de estrógeno, independente do receptor de insulina, demonstrando que a melhora da homeostasia da glicose pelo estrógeno por ser regulada pela gliconeogênese hepática. A reposição hormonal de estradiol subcutâneo em camundongos machos e fêmeas ovariectomizadas melhorou a sensibilidade a insulina e redução da gliconeogênese contribuindo ativamente na regulação da glicemia (YAN et al., 2018).

A progesterona no organismo pode ser considerada um esteroide sexual que inibe os efeitos proliferativos do estrógeno, regula a ovulação e garante alguns efeitos comportamentais incluindo a receptividade sexual, além de ser essencial para o desenvolvimento da lactação (LIEBERMAN e CURTIS, 2017). Contudo a progesterona também desempenha papel importante em vários tecidos não pertencentes ao sistema reprodutivo como o sistema cardiovascular, nervoso central e ósseo, além de aumentar os níveis basais de insulina e promover a liberação de insulina após a ingestão de carboidratos (TARABORRELLI, 2015). Dessa forma, a progesterona pode também auxiliar na homeostasia da glicose e controle do DM.

Em nossa pesquisa observamos que não houve alteração nos níveis de

estrógeno nos grupos estudados, dessa forma, não está claro que as ratas diabéticas possuem alterações hormonais, podendo estar associado aos níveis de progesterona produzida pelos ovários que atua principalmente no útero, levando a manutenção desse órgão (NOGUEIRA, 2018). Porém, o uso de terapia com insulina restaurou o peso dos úteros e ovários dos animais nessa pesquisa, o que nos leva acreditar que a insulina possui efeitos diretos no sistema reprodutor desses animais. Esse hormônio possui receptores amplamente distribuídos em todos os compartimentos ovarianos, permitindo sua ação e seus efeitos específicos nesse sistema, tais como: manutenção do crescimento dos folículos primários e aumento da estimulação de FSH para produção de estrógeno e progesterona (BHATIA; PRICE, 2001; CHAVES; SARAIVA; ALVES; FIGUEIREDO, 2011).

6.2 ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO VASCULAR DA ARTÉRIA CORONÁRIA

Tanto no DM1 quanto no DM2, não são as complicações metabólicas agudas as responsáveis pela maior taxa de morbidade e mortalidade, mas sim os efeitos a longo prazo (MAITRA *et al.*, 2005). Algumas das vias envolvidas nas complicações associadas ao DM1 e seus efeitos a longo prazo, é a disfunção endotelial e a formação de AGEs através da hiperglicemia crônica.

Os mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial no DM são multifatoriais, complexos e até o momento foram parcialmente elucidados (BERTOLUCI *et al.*, 2008). Diversos trabalhos mostram que o DM1 provoca redução na resposta relaxante dependente de endotélio em diferentes artérias, como aorta (HATTORI *et al.*, 1991; PIEPER, 1997; PIEPER; LANGENSTROER; SIEBENEICH, 1997), mesentérica (FUKAO *et al.*, 1997; HEYGATE *et al.*, 1995), carótida (LEO; JOSHI; WOODMAN, 2010; SHI *et al.*, 2006), femoral (SHI *et al.*, 2006) e coronária (DELBIN *et al.*, 2012; KOLTAI; HADHAZY *et al.*, 1997). Nossos dados mostraram um aumento da glicemia e uma redução no relaxamento a ACh associado com redução da produção e/ou biodisponibilidade de NO na artéria coronária de ratas DM1.

Estudos realizados em fêmeas confirmam esse dado demonstrando que em aorta, artéria basilar e mesentérica de ratas diabéticas há uma menor vasodilatação (GOEL *et al.*, 2007; MAYHAN; SUN; IRVINE, 2002; TOLEDO *et al.*, 2003), o que pode estar associado a perda da proteção dos hormônios sexuais femininos relacionados ao DM. Sabe-se que o estrógeno está envolvido na

vasodilatação pelo aumento da produção e/ou biodisponibilidade de NO, regula os níveis de prostaglandinas, aumenta expressão de eNOS e inibe a ação vasoconstritora da endotelina 1 (MATURANA; IRIGOYEN; SPRITZER, 2007). Em modelo experimental de ratas ovariectomizadas e espontaneamente hipertensas, a deficiência de estrogênio leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em aorta e à vasoconstrição induzida pela angiotensina II via aumento da expressão vascular do receptor AT1, resultando em disfunção endotelial. A terapia de reposição de estrógeno e o antagonismo do receptor AT1 impedem essas alterações patológicas. Portanto, a superexpressão do receptor AT1 induzido pela deficiência de estrógeno e o estresse oxidativo podem desempenhar um papel importante nas doenças cardiovasculares associadas à redução dos hormônios sexuais femininos (WASSMANN et al., 2001). Não observamos alteração nos níveis de estradiol circulante, demonstrando que a disfunção endotelial encontrada nas ratas DM1 não está diretamente associada a diminuição dos níveis circulantes dos hormônios sexuais femininos.

Adicionalmente, nas complicações associadas ao DM1 a longo prazo, destacamos a formação de AGEs através da hiperglicemia crônica. Os AGEs se formam através da reação irreversível da glicose com proteínas ou ácidos nucleicos (GIACCO; BROWNLEE, 2010), eles podem modificar proteínas plasmáticas circulantes, que se ligam aos receptores de AGE (RAGE) principalmente nas células endoteliais, ativando NF-kB que resulta na liberação de citocinas (TNF α , IL6, etc) e outras moléculas inflamatórias (MAITRA et al., 2005; LABAZI; TRASK, 2017). Essa inflamação pode causar lesão tecidual e alterações endoteliais importantes em macro e microartérias (BASTA et al., 2002).

Foi demonstrado que a redução no relaxamento dependente de endotélio pode estar associado a um aumento de AGEs em ratos machos DM1 (DELBIN *et al.*, 2012). De fato, a interação de AGEs com o endotélio pode contribuir também no acúmulo de placas ateroscleróticas aumentando ainda mais a disfunção vascular (HADI; SUWAIDI, 2007). Em nosso estudo, as ratas co-tratadas com insulina e PDX apresentaram uma melhora no relaxamento dependente de endotélio comparado ao DM1 e ao DM1+INS, normalizando. A insulina é essencial para uma resposta vasodilatadora, através principalmente do aumento da produção de NO (MATHER; ANDERSON; VERMA, 2001; SUBRAMANIAM; ACHIKE; MUSTAFA, 2009; VERMA *et al.*, 1996), porém, o uso de piridoxamina associado a esse tratamento demonstrou

maior benefício na função vascular, associado com aumento na produção de NO.

Alguns estudos trazem que a PDX pode atuar como agente do acúmulo de colágeno na parede arterial (CHANG et al., 2009), que pode interferir diretamente na função vascular, porém poucos estudos mostram sua relação com a produção de NO demonstrando uma inativação da NOS através da expressão de receptores RAGE (BUCALA; TRACEY; CERAMI, 1991; GAO et al., 2008; RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2011; VLASSARA; PALACE, 2002), e diminuição da expressão de eNOS em aorta (SORO-PAAVONEN et al., 2010). Dessa forma, acreditamos que as alterações na resposta vascular de ratas DM1 está associada ao aumento de AGEs que pode causar uma disfunção na produção e/ou biodisponibilidade de NO.

Neste estudo os níveis plasmáticos de CML no grupo DM1 foram elevados quando comparados ao grupo CTR. Tanto o tratamento com insulina, DM1+INS, quanto sua associação com a piridoxamina, DM1+INS+PDX, geraram redução nos níveis de CML, não havendo efeito adicional da PDX. Estudo realizado em fêmeas de Sprague-Dawley induzidas ao DM1 com glicemia de aproximadamente 450 mg/dL (estreptozotocina i.v. 45 mg/kg) e tratadas com PDX (1g/l na água de beber) observou redução de CML na retina pela técnica de imunorreatividade (STITT; GARDINER; ALDERSON; CANNING *et al.*, 2002). Adicionalmente, ratos Wistar normoglicêmicos previamente tratados com metilglicoxal (75 mg/Kg/dia), um dicarbonil altamente reativo envolvido na formação de AGEs, e que posteriormente receberam PDX (100 mg/Kg/dia) tiveram redução nos níveis de carboxietilisina (CEL) no tecido cardíaco (ALMEIDA et al., 2013). Por outro lado, camundongos DM1 (estreptozotocina i.p. 165 mg/kg) tratados com PDX (1g/l na água de beber) e glicemia de aproximadamente 540 mg/dL, não apresentaram redução nos valores de CML na retina (CANNING *et al.*, 2007).

Junto a isso, o MDA é um dos produtos derivados da oxidação dos ácidos graxos insaturados e utilizado como método para avaliação da peroxidação lipídica. Os nossos resultados mostram que o diabetes aumentou os níveis de MDA plasmático no grupo DM1 e apenas o tratamento com insulina não foi eficaz em reduzir esses valores no grupo DM1+INS, quando comparados ao grupo CTR. Redução significativa foi observada no grupo DM1+INS+PDX quando comparado aos grupos DM1 e DM1+INS.

Embora a piridoxamina não tenha sido classificada como um composto antioxidante, recentes estudos demonstraram propriedades antioxidantes altamente

eficazes. Foi proposto que esse efeito poderia estar relacionado a possíveis atividades coenzimáticas, que não podem ser observadas em testes químicos, embora seus mecanismos antioxidantes não sejam totalmente esclarecidos. A deficiência na biosíntese de PDX pode estar associada a menor tolerância dos organismos vivos ao estresse oxidativo. Sugere-se então o envolvimento da piridoxamina na redução do oxigênio singlete, sendo também eficaz como sequestrador de radical superóxido (ou hidroperoxila, forma protonada do radical superóxido) e na prevenção da peroxidação lipídica (MATXAIN *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstraram que o co-tratamento com insulina e PDX auxiliou na redução da concentração de MDA, prevenindo a peroxidação lipídica. Confirmando a ação no estado redox pela PDX e melhorando a defesa antioxidante dos animais, com aumento da atividade da enzima SOD no grupo tratado com PDX.

Em relação a resposta contrátil vascular, interessante estudo avaliou em diferentes leitos vasculares (artérias: basilar, coronária, renal e caudal) os efeitos do DM1 em machos e fêmeas (SANZ *et al.*, 2003), sendo que o DM1 reduziu a contração ao U46619 em artéria coronária de machos e na artéria caudal de fêmeas. Ratas DM1 apresentam sensibilidade aumentada a noradrenalina em artéria mesentérica (TOLEDO *et al.*, 2003) e em aorta torácica sugerindo o envolvimento da iNOS (SARORETTO *et al.*, 2013). Os resultados sugerem que a reatividade vascular contrátil está alterada durante o DM1, com variações dependendo do leito vascular e também entre machos e fêmeas. Nosso estudo não observou alterações na contração induzida pelo U46619.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que a redução na resposta relaxante dependente de endotélio em artéria coronária septal de ratas DM1 foi normalizada por meio do co-tratamento com insulina e PDX. Os efeitos benéficos foram associados com o aumento da atividade antioxidante da SOD e redução do MDA e CML, demonstrando importante ação no estado redox e na formação de AGEs circulantes, aumentando assim a produção e/ou biodisponibilidade de NO vascular.

REFERÊNCIAS

- ABOUZED, T. K.; MUNESUE, S.; HARASHIMA, A.; MASUO, Y. *et al.* Preventive Effect of Salicylate and Pyridoxamine on Diabetic Nephropathy. **J Diabetes Res**, 2016, p. 1786-789, 2016.
- AIRD, W. C. Endothelium as an organ system. **Crit Care Med**, 32, n. 5 Suppl, p. S271-279, May 2004.
- AKAMINE, E. H.; KAWAMOTO, E. M.; SCAVONE, C.; NIGRO, D. *et al.* Correction of endothelial dysfunction in diabetic female rats by tetrahydrobiopterin and chronic insulin. **J Vasc Res**, 43, n. 4, p. 309-320, 2006.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, 357, n. Pt 3, p. 593-615, 2001.
- ALMEIDA, F.; SANTOS-SILVA, D.; RODRIGUES, T.; MATAFOME, P. *et al.* Pyridoxamine reverts methylglyoxal-induced impairment of survival pathways during heart ischemia. **Cardiovasc Ther**, 31, n. 6, p. e79-85, 2013.
- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, p. S67-74, 2013.
- ANARUMA, C. P.; FERREIRA, M., JR.; SPONTON, C. H.; DELBIN, M. A. *et al.* Heart rate variability and plasma biomarkers in patients with type 1 diabetes mellitus: Effect of a bout of aerobic exercise. **Diabetes Res Clin Pract**, 111, p. 19-27, 2016.
- ANDRADE, J. M. Coronary anatomy with multidetector computed tomography angiography. **Radiol Bras**, 39, n. 3, p. 233-236, 2006.
- BARBOSA, J. H.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. [The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 52, n. 6, p. 940-950, 2008.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARRETT-CONNOR, E.; WINGARD, D. L. Sex differential in ischemic heart disease mortality in diabetics: a prospective population-based study. **Am J Epidemiol**, 118, n. 4, p. 489-496, Oct 1983.
- BARRETT-CONNOR, E. L.; COHN, B. A.; WINGARD, D. L.; EDELSTEIN, S. L. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. **Jama**, 265, n. 5, p. 627-631, Feb 6 1991.
- BARROS, R.P. MACHADO, U.F.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. **Trends Mol Med**. 12(9), p. 425-431. 2006.
- BASTA, G.; LAZZERINI, G.; MASSARO, M.; SIMONCINI, T. *et al.* Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a

mechanism for amplification of inflammatory responses. **Circulation**, 105, n. 7, p. 816-822, 2002.

BASTOS, L. F. C. S. OPAS/OMS **Brasil - Doenças cardiovasculares**. 2016-09-29 19:29:01 2016.

BERTOLUCI, M. C.; P. A.; CÉ, G. V. *et al.* Endothelial dysfunction in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52, n. 2, p. 416-426, 2008.

BHATIA, B.; PRICE, C. A. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. **Steroids**, 66, n. 6, p. 511-519, 2001.

BOLEGO, C.; CIGNARELLA, A.; ZANCAN, A. Diabetes abolishes the vascular protective effects of estrogen in female rats. **Life Science**, 64, p. 741-9, 1999.

BOLEGO, C.; CIGNARELLA, A.; ZAAROUR, C. *et al.* Differential effects of low and high dose estrogen treatments on vascular responses in female rats. **Life Science**, v. 60, n. 25, p. 2291-2302, 1997.

BONGARZONE, S.; SAVICKAS, V.; LUZI, F.; GEE, A. D. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. **J Med Chem**, 60, n. 17, p. 7213-7232, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**. Brasília, DF, 2006.

BUCALA, R.; TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. **J Clin Invest**, 87, n. 2, p. 432-438, 1991.

BUNKER, A. K.; ARCE-ESQUIVEL, A. A.; RECTOR, R. S.; BOOTH, F. W. *et al.* Physical activity maintains aortic endothelium-dependent relaxation in the obese type 2 diabetic OLETF rat. *In: Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 298, p. H1889- 1901, 2010.

CANNING, P.; GLENN, J. V.; HSU, D. K.; LIU, F. T. *et al.* Inhibition of advanced glycation and absence of galectin-3 prevent blood-retinal barrier dysfunction during short-term diabetes. **Exp Diabetes Res**, 2007, p. 518-37, 2007.

CARVALHO, M. H. C.; FORTES, Z. B.; TOSTES, R. C. E. A. **Funções normais do endotélio-Uma visão geral**. Endotélio e Doenças cardiovasculares: Luiz, P.L.; Laurindo, F.R.M Chagas, A.C.P., 2003.

CHANG, K. C.; LIANG, J. T.; TSAI, P. S.; WU, M. S. *et al.* Prevention of arterial stiffening by pyridoxamine in diabetes is associated with inhibition of the pathogenic glycation on aortic collagen. **Br J Pharmacol**, 157, n. 8, p. 1419-1426, 2009.

CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M. C. V.; FIGUEIREDO, J. R. Implications of insulin in ovarian function and embryonic development. **ACTA Veterinaria Basilica**, 2011.

CHIAZZA, F.; CENTO, A. S.; COLLOTTA, D.; NIGRO, D. *et al.* Protective Effects of Pyridoxamine Supplementation in the Early Stages of Diet-Induced Kidney Dysfunction. **Biomed Res Int**, 2017.

CLAUDINO, M. A.; DELBIN, M. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; PRIVIERO, F. B. *et al.* Exercise training ameliorates the impairment of endothelial and nitrgic corpus cavernosum responses in diabetic rats. **Life Sci**, 88, n. 5-6, p. 272-277, 2011.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E.; ZIMMET, P. E. A. International Textbook of Diabetes Mellitus | Wiley Online Books. 2015.

DEGENHARDT, T. P.; ALDERSON, N. L.; ARRINGTON, D. D.; BEATTIE, R. J. *et al.* Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. **Kidney Int**, 61, n. 3, p. 939-950, 2002.

DELBIN, M. A.; DAVEL, A. P.; COUTO, G. K.; DE ARAUJO, G. G. *et al.* Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. **PLoS One**, 7, n. 12, p. e53318, 2012.

DELBIN, M. A.; TRASK, A. J. The diabetic vasculature: physiological mechanisms of dysfunction and influence of aerobic exercise training in animal models. **Life Sci**, 102, n. 1, p. 1-9, Apr 25 2014.

DEROSA, G.; CICERO, A. E.; BERTONE, G.; PICCINNI, M. N. *et al.* Comparison of fluvastatin + fenofibrate combination therapy and fluvastatin monotherapy in the treatment of combined hyperlipidemia, type 2 diabetes mellitus, and coronary heart disease: a 12-month, randomized, double-blind, controlled trial. **Clin Ther**, 26, n. 10, p. 1599-1607, 2004.

DEVANGELIO, E.; SANTILLI, F.; FORMOSO, G.; FERRONI, P. *et al.* Soluble RAGE in type 2 diabetes: association with oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 43, n. 4, p. 511-518, 2007.

DIAS, A. C.; BATISTA, T. M.; ROMA, L. P.; MODULO, C. M. *et al.* Insulin replacement restores the vesicular secretory apparatus in the diabetic rat lacrimal gland. **Arq Bras Oftalmol**, 78, n. 3, p. 158-163, 2015.

DONAHUE, R. P.; STRANGES, S.; REJMAN, K.; RAFALSON, L. B. *et al.* Elevated cystatin C concentration and progression to pre-diabetes: the Western New York study. **Diabetes Care**, 30, n. 7, p. 1724-1729, Jul 2007.

DOS SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; FERREIRA, A. J. **Curi-Procopio | Fisiologia Básica**. 2011.

ELSEWEIDY, M. M.; ELSWEFY, S. E.; YOUNIS, N. N.; ZAGHLOUL, M. S. Pyridoxamine, an inhibitor of protein glycation, in relation to microalbuminuria and proinflammatory cytokines in experimental diabetic nephropathy. **Exp Biol Med (Maywood)**, 238, n. 8, p. 881-888, 2013.

FAGERUDD, J.; FORSBLOM, C.; PETTERSSON-FERNHOLM, K.; GROOP, P. H. Implementation of guidelines for the prevention of diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, 27, n. 3, p. 803-804, 2004.

FALETRA, F. F.; PANDIAN, N. G.; HO, S. Y. **Anatomy of the Heart by Multislice Computed Tomography | Wiley Online Books**. 2009.

FARMER, D. G.; KENNEDY, S. RAGE, vascular tone and vascular disease. **Pharmacol Ther**, 124, n. 2, p. 185-194, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FISHER, A. B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A. I.; NEREM, R. M. Endothelial cellular response to altered shear stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 281, n. 3, p. L529-533, 2001.

FONSECA, V.; ROSENSTOCK, J.; PATWARDHAN, R.; SALZMAN, A. Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **Jama**, 283, n. 13, p. 1695-1702, 2000.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev**, 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, 33, n. 7, p. 829-837, 837a-837d, 2012.

FOX, C. S.; COADY, S.; SORLIE, P. D.; LEVY, D. *et al.* Trends in cardiovascular complications of diabetes. **Jama**, 292, n. 20, p. 2495-2499, 2004.

FREELAND, B.; FARBER, M. S. A Review of Insulin for the Treatment of Diabetes Mellitus. **Home Healthc Now**, 34, n. 8, p. 416-423, 2016.

FUKAO, M.; HATTORI, Y.; KANNO, M.; SAKUMA, I. *et al.* Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. **Br J Pharmacol**, 121, n. 7, p. 1383-1391, 1997.

FULCHER, G. R.; GILBERT, R. E.; YUE, D. K. Glargine is superior to neutral protamine Hagedorn for improving glycated haemoglobin and fasting blood glucose levels during intensive insulin therapy. **Intern Med J**, 35, n. 9, p. 536-542, 2005.

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**, 295, n. 2, p. H491-498, 2008.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**, 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

GOEL, A.; ZHANG, Y.; ANDERSON, L.; RAHIMIYAN, R. Gender Difference in Rat Aorta Vasodilation after Acute Exposure to High Glucose: Involvement of Protein Kinase C β and Superoxide but not of Rho Kinase. **Cardiovasc Res**, 76, n. 2, p. 351-360, 2007.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J. A.; SCHMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, 114, n. 6, p. 597-605, 2006.

GOLDMAN, J. M., MURR, A. S., COOPER R. L. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. **Birth Defects Research (part B)**, 80: pp. 84-97, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Insulina, Glucagon e Diabetes Melito. In: __. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p.961-977.

HADI, H. A.; SUWAIDI, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Vasc Health Risk Manag**, 3, n. 6, p. 853-876, 2007.

HAMILTON, S. J.; WATTS, G. F. Endothelial dysfunction in diabetes: pathogenesis, significance, and treatment. **Rev Diabet Stud**, 10, n. 2-3, p. 133-156, Summer-Fall 2013.

HANSEN, L. M.; GUPTA, D.; JOSEPH, G.; WEISS, D. *et al.* The receptor for advanced glycation end products impairs collateral formation in both diabetic and non-diabetic mice. **Lab Invest**, 97, n. 1, p. 34-42, 2017.

HATTORI, Y.; KAWASAKI, H.; ABE, K.; KANNO, M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am J Physiol**, 261, n. 4 Pt 2, p. H1086-1094, 1991.

HELLWIG, M.; HENLE, T. Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction. **Angew Chem Int Ed Engl**, 53, n. 39, p. 10316-10329, 2014.

HENNESSY, E.; O'DRISCOLL, L. Molecular medicine of microRNAs: structure, function and implications for diabetes. **Expert Rev Mol Med**, 10, p. e24, Aug 15 2008.

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**, 116, n. 8, p. 3251-3259, 1995.

HOME, P. D.; ROSSKAMP, R.; FORJANIC-KLAPPROTH, J.; DRESSLER, A. A randomized multicentre trial of insulin glargine compared with NPH insulin in people with type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, 21, n. 6, p. 545-553, 2005.

HOUSE, A. A.; ELIASZIW, M.; CATTRAN, D. C.; CHURCHILL, D. N. *et al.* Effect of B-vitamin therapy on progression of diabetic nephropathy: a randomized controlled trial. **Jama**, 303, n. 16, p. 1603-1609, 2010.

HUEBSCHMANN, A. G.; REGENSTEINER, J. G.; VLASSARA, H.; REUSCH, J. E.

Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, 29, n. 6, p. 1420-1432, 2006.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec 1987.

INSTITUTE, H. V. **Anatomy and Function of the Coronary Arteries**. 2018. Disponível em: <http://www.gwheartandvascular.org/education/anatomy-and-function-of-the-coronary-arteries/>. Acesso em: 21/05/2018.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Diabetes Atlas**. 8ed. 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Diabetes Atlas**. 9ed. 2019.

IRANLOYE, A.P. *et al.* Alloxan-induced diabetes and insulin resistant effects on ovulation and phases of estrous cycle in virgin female Sprague-Dawley rats. **J. Afr. Ass. Physiol. Sci.** 5 (1): 15-21, 2017.

JAWERBAUM, A., GONZALEZ, E. T., FALETTI, A., *et al.* Altered prostanoid production by cumulusoocyte complexes in a rat model of non-insulindependent diabetes mellitus. **Prostaglandins**. 52 (3): 209 – 219, 1996.

JOHNSON MH. **Essential Reproduction**. 6th. ed. New York, NY: Wiley-Blackwell. p. 316, 2007.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S. *et al.* Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. **Anal Chem**, 70, n. 13, p. 2446-2453, 1998.

KOLTAI, M. Z.; HADHAZY, P.; POSA, I.; KOCSIS, E. *et al.* Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. **Cardiovasc Res**, 34, n. 1, p. 157-163, 1997.

LABAZI, H.; TRASK, A. J. Coronary Microvascular Disease as an Early Culprit in the Pathophysiology of Diabetes and Metabolic Syndrome. **Pharmacol Res**, 2017.

LAAKSO, M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, 46, p. 937-42, 1999.

LEE, S.; PARK, Y.; DELLSPERGER, K. C.; ZHANG, C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 301, n. 2, p. H306-314, 2011.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LEO, C. H.; JOSHI, A.; WOODMAN, O. L. Short-term type 1 diabetes alters the mechanism of endothelium-dependent relaxation in the rat carotid artery. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 299, n. 2, p. H502-511, 2010.

LERCO, M. M.; UNESP; SPADELLA, C. T.; UNESP *et al.* Experimental alloxan diabetes-induced: a model for clinical and laboratory studies in rats. **Acta Cir. Bras.**, 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LIEBERMAN, A.; CURTIS, L. In defense of progesterone: a review of the literature. **Altern Ther Health Med**, 23 (6), p. 24-32, 2017.

MAEDA KI, OHKURA S, TSUKAMURA H. Physiology of Reproduction. In GJ Krinke. **The Laboratory Rat** (pp. 145-176). New York: Academic Press, 2000.

MAESSEN, D. E.; BROUWERS, O.; GAENS, K. H.; WOUTERS, K. *et al.* Delayed Intervention With Pyridoxamine Improves Metabolic Function and Prevents Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Diabetes**, 65, n. 4, p. 956-966, 2016.

MAITRA, A., ABBAS, A.K. O sistema endócrino. In: KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. (Ed.) Patologia Robbins & Cotran, Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1207-1282, 2005.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, 62, n. 4a, p. 609-614, 2002.

MATHER, K.; ANDERSON, T. J.; VERMA, S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. **J Vasc Res**, 38, n. 5, p. 415-422, 2001.

MATURANA, M. A.; IRIGOYEN, M. C.; SPRITZER, P. M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. **Clinics (Sao Paulo)**, 62, n. 1, p. 77-86, 2007.

MATXAIN, J. M.; RISTILA, M.; STRID, A.; ERIKSSON, L. A. Theoretical study of the antioxidant properties of pyridoxine. **J Phys Chem A**, 110, n. 48, p. 13068-13072, 2006.

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

MINAMI, A.; ISHIMURA, N.; HARADA, N.; SAKAMOTO, S. *et al.* Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. **Atherosclerosis**, 162, n. 1, p. 85-92, 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONNIER, V. M.; BAUTISTA, O.; KENNY, D.; SELL, D. R. *et al.* Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes**, 48, n. 4, p. 870-880, 1999.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res**, 41, n. 1, p. 19-26, Jul 1977.

NAGAI, R.; MURRAY, D. B.; METZ, T. O.; BAYNES, J. W. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. **Diabetes**, 61, n. 3, p. 549-559, 2012.

NATHAN, D. M.; CLEARY, P. A.; BACKLUND, J. Y.; GENUTH, S. M. *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med**, 353, n. 25, p. 2643-2653, 2005.

NENNA, A.; NAPPI, F.; AVTAAR SINGH, S. S.; SUTHERLAND, F. W. *et al.* Pharmacologic Approaches Against Advanced Glycation End Products (AGEs) in Diabetic Cardiovascular Disease. **Res Cardiovasc Med**, 4, n. 2, p. e26949, 2015.

NETTER, F.H. **Atlas de Anatomia Humana**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

NOGUEIRA, T. B. (2018). Influência dos hormônios da reprodução sobre a ação da insulina em cães. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Diabetes-Key facts. **World Health Organization**. Geneva, nov. 2017.

PACCOLA, C.C.; RESENDE, C.G. *et al.* The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Anim. Reprod.**, v.10, n.4, p.677-683, 2013.

PETERS, S. A.; HUXLEY, R. R.; SATTAR, N.; WOODWARD, M. Sex Differences in the Excess Risk of Cardiovascular Diseases Associated with Type 2 Diabetes: Potential Explanations and Clinical Implications. *In*: **Curr Cardiovasc Risk Rep**. United States, v. 9, p. 36, 2015.

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

PIEPER, G. M.; LANGENSTROER, P.; SIEBENEICH, W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. **Cardiovasc Res**, 34, n. 1, p. 145-156, 1997.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; THANGAVEL, J.; NISHIGAKI, Y. *et al.* The Vascular Endothelium and Human Diseases. **Int J Biol Sci**, 9, n. 10, p. 1057-1069, 2013.

RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. **Ann N Y Acad Sci**, 1243, p. 88-102, 2011.

ROBERTS, A.; PORTER, K. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. 2013-09-03 2013.

SANZ, E.; FERNANDEZ, N.; MONGE, L.; MARTINEZ, M. A. *et al.* Effects of diabetes on the vascular response to nitric oxide and constrictor prostanoids: gender and regional differences. **Life Sci**, 72, n. 13, p. 1537-1547, 2003.

SARTORETTO S.M. Estudo das alterações da resposta vasodilatadora e vasoconstritora em aorta de ratas diabéticas e os mecanismos envolvidos [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

SARTORETTO, S. M.; SANTOS-EICHLER, R.; DE CASSIA, A. T. R.; CARVALHO, M. H. *et al.* Role of nitric oxide and endothelin in endothelial maintenance of vasoconstrictor responses in aortas of diabetic female rats. **J Diabetes**, 5, n. 2, p. 197-206, 2013.

SARTORETTO, S. M.; SANTOS, F.F.; COSTA, B.P. *et al.* Involvement of inducible nitric oxide synthase and estrogen receptor ESR2(ER β) in the vascular dysfunction in female type 1 diabetic rats. **Life Science**, 216, p. 279-286, jan 2018.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. **Clin Sci (Lond)**, 109, n. 2, p. 143-159, 2005.

SHERWOOD, L. Controle endócrino do metabolismo de combustível. In:_. **Fisiologia Humana: das células aos sistemas**. 7 Ed. São Paulo: Cengage learning, 2011.

SHI, Y.; KU, D. D.; MAN, R. Y.; VANHOUTTE, P. M. Augmented endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxations attenuate endothelial dysfunction in femoral and mesenteric, but not in carotid arteries from type I diabetic rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 318, n. 1, p. 276-281, 2006.

SHI, Y.; VANHOUTTE, P. M. Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. **Br J Pharmacol**, 154, n. 3, p. 639-651, 2008.

SHYY, J. Y.; CHIEN, S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. **Circ Res**, 91, n. 9, p. 769-775, Nov 1 2002.

SIQUEIRA, A.F.A; ALMEIDA-PITITTO, B. de; FERREIRA, S.R.G. Doença Cardiovascular no Diabete Mellitus: Análise dos fatores de risco Clássicos e não-clássicos. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 51/2, p. 257-267, 2007.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes 2014/2015. **Sociedade Brasileira de diabetes**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de

diabetes 2015/2016. **Sociedade Brasileira de diabetes**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2016.

SORO-PAAVONEN, A.; ZHANG, W. Z.; VENARDOS, K.; COUGHLAN, M. T. *et al.* Advanced glycation end-products induce vascular dysfunction via resistance to nitric oxide and suppression of endothelial nitric oxide synthase. **J Hypertens**, 28, n. 4, p. 780-788, 2010.

STANFIELD, C. L. **Fisiologia Humana**. In: Sistema Cardiovascular: vasos sanguíneos, fluxo sanguíneo e pressão sanguínea. 5 ed. São Paulo: Pearson. P. 459-504. 2013.

STITT, A.; GARDINER, T. A.; ALDERSON, N. L.; CANNING, P. *et al.* The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. **Diabetes**, 51, n. 9, p. 2826-2832, 2002.

STUMP, C. S.; CLARK, S. E.; SOWERS, J. R. Oxidative stress in insulin-resistant conditions: cardiovascular implications. **Treat Endocrinol**, 4, n. 6, p. 343-351, 2005.

SUBRAMANIAM, G.; ACHIKE, F. I.; MUSTAFA, M. R. Characterizing the mechanisms of insulin vasodilatation of normal and streptozotocin-induced diabetic rat aorta. **J Cardiovasc Pharmacol**, 53, n. 4, p. 333-340, 2009.

TARABORRELLI, S. Physiology, production and action progesterone. **ACTA Obstetricia et Gynecologica**, 94, p. 8-16. 2015.

THORNALLEY, P. J.; RABBANI, N. Therapy: Vitamin B6, B9 and B12 in diabetic nephropathy--beware. *In: Nat Rev Endocrinol*. England, v. 6, p. 477-478, 2010.

TIENGO, A.; FADINI, G. P.; AVOGARO, A. The metabolic syndrome, diabetes and lung dysfunction. **Diabetes Metab**, 34, n. 5, p. 447-454, Nov 2008.

TOLEDO, D. P.; AKAMINE, E.; NIGRO, D.; PASSAGLIA, R. C. *et al.* Microvascular reactivity in experimental diabetes: responses of male and female rats. **Inflamm Res**, 52, n. 5, p. 191-198, 2003.

TRASK, A. J.; DELBIN, M. A.; KATZ, P. S.; ZANESCO, A. *et al.* Differential Coronary Resistance Microvessel Remodeling between Type 1 and Type 2 Diabetic Mice: Impact of Exercise Training. **Vascul Pharmacol**, 57, n. 5-6, p. 187-193, 2012.

TURNER RC *et al.* Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1999. **JAMA**, v. 281, n. 21, p. 2005-2012.

UNOKI-KUBOTA, H.; YAMAGISHI, S.; TAKEUCHI, M.; BUJO, H. *et al.* Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation end product (AGE) formation ameliorates insulin resistance in obese, type 2 diabetic mice. **Protein Pept Lett**, 17, n. 9, p. 1177-1181, 2010.

VALDES, C. T.; ELKIND-HIRSCH, K. E.; ROGERS, D. G. Diabetes-induced alterations of reproductive and adrenal function in the female rat. **Neuroendocrinology**, 51, n. 4, p. 406-412, 1990.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 143, p. 299-330, 1963.

VANHOUTTE, P. M.; MOMBOULI, J. V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. **Prog Cardiovasc Dis**, 39, n. 3, p. 229-238, Nov-Dec 1996.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Quím. Nova**, 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERMA, S.; BHANOT, S.; YAO, L.; MCNEILL, J. H. Defective endothelium-dependent relaxation in fructose-hypertensive rats. **Am J Hypertens**, 9, n. 4 Pt 1, p. 370-376, 1996.

VISTOLI, G.; DE MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N. *et al.* Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radic Res**, 47 Suppl 1, p. 3-27, 2013.

VLISSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation end products. **J Intern Med**, 251, n. 2, p. 87-101, 2002.

XU, Y.; LIN, J.; WANG, S. *et al.* Combined estrogen replacement therapy on metabolic control in postmenopausal women with diabetes mellitus. **Sciencedirect**, 30, 350-361, 2014.

WASSAMANN, S.; BAUMER, A.T.; STREHLOW, K. *et al.* Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress During Estrogen Deficiency in Spontaneously Hypertensive Rats. **Circulation**, 23, 2001.

YAMAGISHI, S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. **Exp Gerontol**, 46, n. 4, p. 217-224, 2011.

YAN, H.; YANG, W.; ZHOU, F. *et al.* Estrogen Improves Insulin Sensitivity and Suppresses Gluconeogenesis via the Transcription Factor Foxo1. **Diabetes**, 68, p. 291-304, 2018.

YKI-JARVINEN, H. Thiazolidinediones. **N Engl J Med**, 351, n. 11, p. 1106-1118, 2004.

8 ANEXO

8.1 ANEXO A-PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR EM RATAS DIABÉTICAS TIPO 1: EFEITOS DO TRATAMENTO COM OS INIBIDORES DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) E DA PROTEÍNA QUINASE C-BETA (PKC-β)**, registrada com o nº **4532-1/2017**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Maria Andréia Delbin e Andressa Silva Sousa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilio *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em **1º. junho de 2017**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/05/2017-01/05/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/06/2017-01/05/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	250
Peso / Idade:	04 semanas / 80g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBIO e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 1º. de junho de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Aleixo
Secretária Executiva

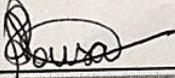
IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

8.2 ANEXO B- DECLARAÇÃO DIREITO AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação da função coronariana em ratas diabéticas tipo 1: efeitos do co-tratamento com insulina e piridoxamina**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, **11 de maio de 2020**

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **ANDRESSA SILVA SOUSA**

RG n.º **62.037.123-7**

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **MARIA ANDRÉIA DELBIN**

RG n.º **27.697.202-8**