

Remodelamento vascular em artérias
mesentéricas de resistência de camundongos
diabéticos db/db

Flávia Moreira Souza

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
(Ciências Fisiológicas)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Fevereiro de 2009

Souza, Flávia Moreira, 1978

Remodelamento vascular em artérias mesentéricas de resistência de camundongos diabéticos db/db. [Vitória] 2009

XXIII, 150 p., 29,7 cm (UFES, D. Sc, Ciências Fisiológicas, 2009)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Remodelamento Vascular 2. Artéria Mesentérica 3. Estresse Oxidativo
4. Angiotensina II 5. Fluxo Sanguíneo

Ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todo o mistério e toda a ciência, e ainda que eu tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria (Coríntios 1, 13:2).

Dedico esse trabalho ao meu marido
Chuck, meus enteados George e Julia e
a minha mãe Tânia.

Agradecimentos

A Deus, pelo suporte nos momentos de maior dificuldade e pela força e coragem para sempre continuar, independente do tamanho do problema.

Ao Chuck pelo amor e paciência quando eu não podia conversar ou participar de coisas importantes para ele por causa do meu trabalho.

À minha mãe e irmã pelo amor, amizade e compreensão pela minha total ausência durante os anos em que essa pesquisa foi realizada.

Ao Dalton pela orientação, amizade e paciência. Obrigada por acreditar em mim e por confiar no meu trabalho. Obrigada pelo apoio para ir fazer a minha pesquisa em New Orleans. Você contribuiu muito na minha vida profissional. Muito Obrigada.

A Dra Lucchesi por ter me dado uma oportunidade e um voto de confiança em seu laboratório, por ter me orientado nos Estados Unidos e por ter aberto a minha mente tremendamente para pesquisa. Obrigada por tudo mesmo.

À Prof^a. Dr^a. Alessandra Padilha, Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon e ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira por terem aceitado o convite de fazerem parte da banca.

À Paige que muito me ajudou no laboratório e nos experimentos, além de me ajudar a superar situações difíceis. Eu nunca vou esquecer o que você fez por mim.

Ao Dr. Kevin Lord por ter implantado os probes de pressão para mim e ter me ajudado nos registros de pressão arterial.

Ao Dr. Barry Potter por ter feito as medidas dos níveis de estresse oxidativo para mim.

Ao Dr. Kurt Varner e Dr. Daniel Kapusta por toda ajuda no final.

Ao Ryan, Jámmie, Kurk e Sylvia pela companhia nos dias de experimento, por toda a ajuda no laboratório e por toda a paciência com o meu inglês no começo.

Ao Dr. Khalid Matrougui por ter me ensinado a técnica de isolamento e canulação da artéria mesentérica.

Ao Washington, Wanize e Catô, sempre por todo o incentivo inicial onde tudo começou, me lembrarei disso sempre.

As minhas amigas Giulia, Patrícia e Karina que me deram tanto apoio para seguir a minha jornada.

Ao George e a Julia que tiveram que ficaram calados por longos minutos em casa, o que é quase impossível para eles, enquanto eu precisava de silêncio para me concentrar.

À Dra. Lucchesi e a CAPES pelo apoio financeiro.

Sumário

I. Introdução.....	24
1.1 Diabetes Mellitus.....	24
1.1.1 Patogênese da DMT2.....	25
1.1.2 Obesidade e DMT2.....	26
1.2 Complicações cardiovasculares da DMT2.....	26
1.3 Angiotensina e DMT2.....	31
1.4 Remodelamento Vascular.....	32
1.4.1 Mecanismos moleculares do remodelamento vascular.....	34
1.4.1.1. Fatores de crescimento e remodelamento vascular.....	38
1.4.2 Fluxo sanguíneo e remodelamento vascular.....	39
II. Objetivos.....	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
III. Materiais e Métodos.....	42
3.1 Animais Experimentais.....	42
3.2 Modelo experimental.....	42
3.3 Medidas de pressão arterial e glicose sanguínea.....	43
3.4 Metodologia e protocolos experimentais utilizados nos estudos da artéria mesentérica de camundongos.....	44
3.4.1 Metodologia para obtenção e isolamento da artéria mesentérica.....	44
3.4.2 Protocolos experimentais.....	47
3.4.2.1. Medidas realizadas usando os parâmetros extraídos dos experimentos em artérias mesentéricas de resistência.....	47
3.4.2.2. Efeito da inibição do estresse oxidativo e do receptor AT-1 sobre a resposta passiva das artérias mesentéricas de resistência.....	49
3.5 Análise histológica das artérias mesentéricas.....	50

3.6 Medidas de estresse oxidativo por ressonância eletro paramagnética espectrópica (ESR ou EPR)	50
3.7 Medidas de expressão protéica de MMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2, PAI-1 e TGF- β através da técnica de Western blot	51
3.7.1 Eletroforese e transferência das amostras	52
3.7.2 Bloqueio e incubação com anticorpos, detecção e análise das subunidades	52
3.8 Expressão dos dados e análise estatística	53
3.9 Fármacos e reagentes utilizados	54
IV. Resultados.....	56
4.1 Resposta vasoconstrictora à fenilefrina e resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina	56
4.2 Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca.....	57
4.3 Medidas de glicose sanguínea e peso corporal	58
4.4 Medidas na artéria mesentérica através do uso do miógrafo de pressão	59
4.4.1 Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmem dos animais diabéticos e não diabéticos	59
4.4.2 Medidas de área da camada média, complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos	62
4.4.3 Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos	65
4.4.4 Efeito da ação do estresse oxidativo e angiotensina II sobre as propriedades estruturais e mecânicas do terceiro ramo das artérias mesentéricas de camundongos diabéticos e não diabéticos.....	67
4.4.4.1. Medidas dos níveis de estresse oxidativo nos animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com antioxidantes.....	67
4.4.4.2. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o antioxidante Apocinina	69

4.4.4.2.1 Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmen dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina.....	69
4.4.4.2.2 Medidas de área da camada média, complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina	72
4.4.4.2.3 Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina.....	75
4.4.4.3. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o antioxidante Tempol.....	78
4.4.4.3.1 Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmen dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Tempol.....	78
4.4.4.3.2 Medidas de área da camada média, complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Tempol.....	81
4.4.4.3.3 Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Tempol.....	84
4.4.4.4. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o bloqueador AT-1 Candesartan.....	87
4.4.4.4.1 Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmen dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan	87
4.4.4.4.2 Medidas de área da camada média, complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan	90
4.4.4.4.3 Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan ..	93
4.5 Expressão das proteínas regulatórias de matriz extracelular (ECM) em tecidos de artérias mesentéricas de resistência de animais diabéticos e não diabéticos	96
4.5.1 Matriz Metaloproteinase- 2, 9 e 12 (MMP-2, MMP-9 e MMP-12)	96
4.5.2 Inibidores de metaloproteinase tecidual- 1 e 2 (TIMP-1 e TIMP-2)	98

4.5.3 Fator de crescimento transformador- β e inibidor de ativador de plasminogênio- 1 (TGF- β e PAI-1).....	100
V. Discussão.....	102
5.1 Resposta vasoconstrictora à fenilefrina e resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina	103
5.2 Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca.....	103
5.3 Medidas de glicose sanguínea e peso corporal	104
5.4 Medidas na artéria mesentérica através do uso do miógrafo de pressão	105
5.4.1 Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede, relação média/lúmen e área da camada média dos animais diabéticos e não diabéticos.	105
5.4.2 Medidas de complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos	107
5.4.3 Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos	108
5.4.4 Efeito da ação do estresse oxidativo e angiotensina II sobre as propriedades estruturais e mecânicas do terceiro ramo das artérias mesentéricas de camundongos diabéticos e não diabéticos.....	110
5.4.4.1. Medidas dos níveis de estresse oxidativo nos animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com antioxidantes.....	111
5.4.4.2. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com antioxidantes.....	113
5.4.4.2.1 Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede, relação média/lúmen e área da camada média dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina ou Tempol	113
5.4.4.2.2 Medidas de complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina ou Tempol	115
5.4.4.2.3 Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina ou Tempol.....	116

5.4.4.3. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o bloqueador AT-1 Candesartan.....	118
5.4.4.3.1 Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede, relação média/lúmen e área da camada média dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan	118
5.4.4.3.2 Medidas de complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan	121
5.4.4.3.3 Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan	122
5.5 Expressão das proteínas regulatórias de matriz extracelular (ECM) e de fatores de crescimento em tecidos de artérias mesentéricas de resistência de animais diabéticos e não diabéticos	124
5.6 Associação do remodelamento hipertrófico externo das artérias mesentéricas de resistência de camundongos diabéticos db/db.....	127
VI. Conclusão.....	130
VII. Referências bibliográficas	131

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1: Valores da porcentagem de contração à fenilefrina e relaxamento a acetilcolina nos grupos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético.

56

Tabela 2: Valores da pressão arterial média e frequência cardíaca dos camundongos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético.

57

Tabela 3: Glicose sanguínea e peso corporal dos camundongos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético.

58

Tabela 4: Valores de diâmetros interno e externo (μm), espessura de parede e relação média lúmem dos grupos Controle e Diabético.

60

Tabela 5: Valores da área da camada média, complacência e distensibilidade dos grupos Controle e Diabético.

63

Tabela 6: Valores de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da média dos grupos Controle e Diabético.

65

Tabela 7: Valores de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média lúmem dos grupos Apocinina Controle e Apocinina Diabético.

70

Tabela 8: Valores da área da camada média, complacência, e distensibilidade dos grupos Apocinina Controle e Apocinina Diabético.

73

Tabela 9: Valores de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da média dos grupos Apocinina Controle e Apocinina Diabético.

75

Tabela 10: Valores de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média lúmem no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Tempol Controle e Tempol Diabético sob diferentes pressões.

79

Tabela 11: Valores da área da camada média, complacência e distensibilidade dos grupos Tempol Controle e Tempol Diabético.

82

Tabela 12: Valores de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da média dos grupos Tempol Controle e Tempol Diabético.

85

Tabela 13: Valores de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média lúmem no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético.

88

Tabela 14: Valores da área da camada média, complacência e distensibilidade dos grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético.

91

Tabela 15: Valores de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da média dos grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético.

94

Lista de Figuras

Página

Figura 1: O diagrama mostra a maneira em que o remodelamento vascular pode modificar as secções transversais dos vasos sanguíneos.

33

Figura 2: Foto representativa de camundongo homozigoto (db/db) a esquerda heterozigoto (Db/db) à direita.

43

Figura 3: Figura representativa da artéria mesentérica a ser canulada (A) e já canulada (B).

45

Figura 4: Foto representativa do leito mesentérico (A) onde a seta indica o terceiro ramo da artéria mesentérica partindo da artéria mesentérica superior. Foto do terceiro ramo da artéria mesentérica (B) montada e pressurizada no miógrafo de pressão como vista no monitor.

46

Figura 5: Medidas de diâmetros interno (A) e externo (B) (μm), espessura de parede (C) (μm) e relação média/lúmem (D). Foto micrografia representativa de artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C - esquerda) (E) e diabéticos (db - direita) (F) corados com hematoxilina-eosina.

61

Figura 6: Medidas da área da camada média, complacência e distensibilidade em camundongos controles e diabéticos.

64

Figura 7: Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da em camundongos controles e diabéticos.

Figura 8: Medidas de estresse oxidativo por EPR através do uso do marcador CMH em tecidos de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles – C, diabéticos – db, Tempol Diabético– Tdb, Apocinina Diabético– Adb e Candesartan Diabético– CANdb.

Figura 9: Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmen em camundongos Controle, Diabético Apocinina Controle e Apocinina Diabético.

Figura 10: Medidas da área da camada média, complacência e distensibilidade em camundongos Controle, Diabético Apocinina Controle e Apocinina Diabético.

Figura 11: Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da média em camundongos Controle, Diabético Apocinina Controle e Apocinina Diabético.

Figura 12: Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmen em camundongos Controle, Diabético, Tempol Controle e Tempol Diabético.

Figura 13: Medidas da área da camada média, complacência e distensibilidade em camundongos Controle, Diabético, Tempol Controle e Tempol Diabético.

Figura 14: Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da média em camundongos Controle, Diabético, Tempol Controle e Tempol Diabético.

Figura 15: Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmem em camundongos Controle, Diabético, Candesartan Controle e Candesartan Diabético.

89

Figura 16: Medidas da área da camada média, complacência e distensibilidade em camundongos Controle, Diabético, Candesartan Controle e Candesartan Diabético.

92

Figura 17: Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain da média em camundongos Controle, Diabético, Candesartan Controle e Candesartan Diabético.

95

Figura 18: Imuno-deteccção por western blot indicando a expressão vascular de MMP-2, MMP-9 e MMP-12.

97

Figura 19: Imuno-deteccção por western blot indicando a expressão vascular de TIMP-1 e TIMP-2

99

Figura 20: Imuno-deteccção por western blot indicando a expressão vascular de TGF- β e PAI-1.

101

Resumo

Pouco se sabe sobre a indução de remodelamento estrutural em artérias mesentéricas de resistência por diabetes tipo II. O presente estudo comparou diferenças estruturais em pequenas artérias mesentéricas de camundongos diabéticos (db/db) e heterozigotos controles (Db/db). Os vasos foram isolados de camundongos com 16 semanas de idade e as propriedades estruturais foram acessadas pelo miógrafo de pressão. A pressão arterial média (PAM) foi registrada in vivo por telemetria. Os animais foram tratados por 4 semanas com antioxidantes tempol ou apocinina ou com o bloqueador do receptor AT-1 candesartan. Análises de western blot foi utilizada para acessar a expressão das proteínas regulatórias da matriz. A PAM foi similar entre todos os grupos estudados. Os níveis de glicose sanguínea em jejum estavam aumentados nos camundongos db/db (505 ± 28) vs. controle (115 ± 10 mg/dl, $p < 0.001$). O diâmetro interno e a área da média estavam significativamente aumentados em db/db comparado com controle, sugerindo remodelamento hipertrófico externo. A complacência estava significativamente maior nas artérias diabéticas. A curva stress-strain estava desviada para a direita nas artérias mesentéricas de camundongos diabéticos comparados com controles. Nenhum dos tratamentos foram capazes de alterar o remodelamento apresentado pelos camundongos db/db bem como de mudar a complacência e a relação stress-strain. A expressão das proteínas regulatórias da matriz extracelular MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2, TGF- β e PAI-1 estavam aumentadas em artérias diabéticas, enquanto que a expressão de MMP-2 não se mostrou diferente entre os grupos. Esses dados sugerem que as artérias mesentéricas de resistência de camundongos com diabetes tipo II sofrem remodelamento hipertrófico externo, alta complacência vascular e reduzida rigidez que estava associada com turnover de matriz extracelular secundária a um desequilíbrio entre fatores pro e anti-fibróticos. Nem o estresse oxidativo ou as vias da angiotensina II em diabetes tipo II estavam envolvidas no remodelamento ou nas mudanças estruturais apresentadas pelos camundongos diabéticos db/db com 16 semanas de idade tratados por 4 semanas.

Abstract

Little is known about Type 2 diabetes-induced structural remodeling of mesenteric resistance arteries. This study compared structural differences in small mesenteric resistance arteries in diabetic (db/db) and control (Db/db) mice. Vessels were isolated from 16wks old mice and structural properties were assessed by pressure myography. Mean arterial pressure (MAP) was measured in vivo by telemetry. The animals were treated for 4 wks with antioxidants Tempol or apocynin or with AT-1 receptor blocker candesartan. Western blot analysis was used to assess the expression of matrix regulatory proteins. MAP was similar between all the groups studied. Fasting blood glucose levels were higher in db/db mice (505 ± 28 mg/dl) vs. control (115 ± 10 , $p < 0.001$). The lumen diameter and media cross-sectional area were significantly increased in db/db compared to control suggesting hypertrophic outward remodeling. Cross-sectional compliance was significantly larger in the diabetic arteries. The stress-strain curve was shifted to the right in mesenteric arteries from diabetic mice compared with controls. Neither one of the treatments were able to change the remodeling presented by the db/db mice, as well as compliance and stress-strain relationship. The expression of the matrix regulatory proteins MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2, TGF- β and PAI-1 were increased in db/db arteries, while MMP-2 expression was not different between the groups. These data suggest that diabetic mesenteric resistance arteries undergo hypertrophic outward remodeling, increased vessel compliance and reduced stiffness that was associated with extracellular matrix turnover secondary to an imbalance between pro and anti-fibrotic factors. Neither the oxidative stress nor the pathways of angiotensin II in type II diabetes were involved at the remodeling or structural changes presented by diabetic db/db mice with 16wks of age treated for 4 wks.

I. Introdução

1.1. Diabetes Mellitus

A diabetes mellitus é uma doença crônica de desordem metabólica que é caracterizada por aumento da glicemia e relativa ou absoluta falta de insulina. A diabetes pode levar a serias complicações como cegueira, dano renal, doença cardíaca, AVC, doença vascular periférica e neuropatia. Esta doença afeta 8% da população americana e atualmente representa a quinta causa de morte nos Estados Unidos. Está associada com inúmeras complicações de alto risco e muitas vezes não é considerada a causa de morte devido a varias patologias conseqüentes da doença que se tornam a causa imediata de óbito (Diagnoses and classification of diabetes mellitus, 2006; Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007, 2008). Recentes pesquisas estimam que 38,5% das mulheres e 32,8% dos homens nascidos em 2000 serão diagnosticados com diabetes (Narayan *et al.*, 2003). Globalmente, o número total de pessoas com diabetes esta projetado para aumentar em 47% de 2000 a 2030 e o Brasil passara de 4,6 milhões de pessoas com diabetes em 2000 para 11,3 milhões de pessoas com a doença em 2030 (Wild *et al.*, 2004).

A diabetes é classificada em diabetes gestacional, tipo 1 ou tipo 2 sendo que a do tipo 2 soma de 90-95% de todos os casos. Diabetes do tipo 1 é definida como uma desordem heterogênicamente caracterizada por grande perda de células beta do pâncreas resultando em dramática insuficiência de insulina, podendo ser letal se o organismo não receber efetivo tratamento com insulina exógena (Miura e Uchigata, 2008). A diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) é caracterizada por excreção anormal de insulina associada com diferentes graus de resistência a insulina. Mesmo com o desenvolvimento crescente de terapias estratégicas os problemas relacionados com diabetes continuam dramáticos. A mortalidade é até 5 vezes maior em pessoas diabéticas do que em não diabéticas e a hiperglicemia crônica é freqüentemente associada com danos em vários órgãos, especialmente o coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos (Zimmet *et al.*, 2001; Diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2006). Essa forma de diabetes pode não ser diagnosticada por anos devido ao fato de que a hiperglicemia se desenvolve gradualmente não sendo detectável nos primeiros estágios, o que leva a um alto risco desses pacientes não

diagnosticados de desenvolverem complicações macro vasculares e microvasculares (Diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2006). A hiperglicemia é um fator comum entre diabetes do tipo 1 e 2.

1.1.1. Patogênese da DMT2

A patogênese da DMT2 é um processo multifatorial complexo e não é totalmente compreendida. É bem aceito que fatores genéticos e ambientais possuem um grande papel no desenvolvimento da DMT2. Os fatores genéticos ainda estão sendo identificados, mas o mais importante fator ambiental é a obesidade que está fortemente associada com o sedentarismo (Zimmet, 1999; Beck-Nielsen *et al.*, 2003). A ligação entre obesidade e DMT2 é bem estabelecida. Na verdade, obesidade ou somente o sobrepeso e distribuição de gordura abdominal somam de 80 a 90% dos pacientes com DMT2 o que promove um grande suporte para o termo “diabesidade” usado para caracterizar obesidade relacionada com DMT2 (Astrup e Finer, 2000). É importante mencionar que enquanto a maioria dos pacientes com DMT2 são obesos muitos dos pacientes obesos não desenvolvem DMT2, provando a presença de predisposição genética naqueles que progridem com DMT2.

No estágio inicial da DMT2 a resistência a insulina é relativamente normal e a glicemia é mantida devido a uma secreção compensatória das células beta pancreáticas. Essa situação não é sustentada porque a resistência à insulina aumenta, o que eventualmente leva as células beta à exaustão e comprometimento da liberação de insulina. A redução da secreção de insulina descondensa a regulação dos níveis de glicose sanguínea e produz hiperglicemia na ausência de hiperinsulinemia. Leahy 2005 enfatiza que ambos, resistência a insulina e disfunção de células beta agem juntos e, que a disfunção da células beta está presente mesmo nos mínimos aumentos de glicemia (Leahy, 2005). Ainda não foi elucidado qual desses eventos acontece primeiro uma vez que resultados mostram que cada disfunção tem a habilidade de causar à outra. Por exemplo, a hiperglicemia crônica, o que leva a comprometimento da liberação de insulina pelas células beta, causa uma redução na sensibilidade a glicose pelas células betas através de um processo chamado glicotoxicidade (Yki-Järvinen, 1992; Poitout e Robertson, 2002). Outro exemplo se dá com a hiperinsulinemia sustentada, indicativo de resistência a

insulina, que pode levar a redução da liberação e ação da insulina (Del Prato *et al.*, 1994).

1.1.2. Obesidade e DMT2

A obesidade é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de DMT2. Entretanto, uma das características de obesidade é a resistência a insulina, que também está relacionada à DMT2 (Cangemi *et al.*, 1993). A obesidade vem sendo há muito tempo reconhecida como causa de resistência a insulina em tecidos alvos e os ácidos graxos livres são fortemente vistos como o principal fator etiológico (Ferrannini *et al.*, 1983). Similarmente aos efeitos deletérios da hiperglicemia crônica, os ácidos graxos, que são combustíveis essenciais para as células betas em estado normal, tornam-se tóxicos quando cronicamente presentes em níveis excessivos. A exposição prolongada de células beta pancreáticas a ácidos graxos aumenta a liberação basal de insulina mas inibe a secreção de insulina induzida pela glicose (McGarry e Dobbins, 1999), este fenômeno é chamado de lipotoxicidade (Poitout e Robertson, 2002). O aumento de ácidos graxos plasmáticos também promove hiperglicemia através da estimulação de glicogênese hepática ao mesmo tempo em que reduz o consumo e armazenamento de glicose tecidual (Singleton *et al.*, 2003). Finalmente, a obesidade aumenta significativamente o risco de desenvolver DMT2 devido aos efeitos combinados da glicotoxicidade e lipotoxicidade na produção, liberação e atividade da insulina.

1.2. Complicações cardiovasculares da DMT2

A doença cardiovascular (DCV) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com DMT2. As complicações mais comuns em diabetes mellitus são hipertensão, aterosclerose e doença vascular periférica. A combinação dos fatores de risco cardiovasculares com alteração de pressão arterial e colesterol e o uso do tabaco são preditores de mortalidade cardiovascular em pacientes com DMT2 (Fuller *et al.*, 2001). Desde que a obesidade é o maior e potencialmente modificável fator de risco para doença cardiovascular em DMT2, estudos têm dado ênfase a interação entre obesidade, risco de DCV e desenvolvimento de complicações macro vasculares (Daousi *et al.*, 2006; Ridderstrale *et al.*, 2006).

Das características proeminentes gerais da DMT2, a resistência a insulina e hiperglicemia são as prováveis causas das complicações cardiovasculares em diabetes (Dhalla *et al.*, 1998; Spector, 1998; Laakso, 1999; He *et al.*, 2003). Alguns mecanismos da sensibilidade a insulina quando alterados podem incrementar as chances de DCV, os principais são:

1) *Óxido nítrico (NO) (mediador da vasomotricidade)* - umas das mais conhecidas ações vasculares da insulina é de aumentar a produção de NO derivado do endotélio. Fora o papel de modulação da vasodilatação o NO também inibe a adesão de monócitos, a proliferação de células musculares lisas vasculares e a adesão e ativação de plaquetas na via da coagulação. Devido ao fato de todos esses fatores serem importantes para o desenvolvimento de aterosclerose, a diminuição da produção de NO em resistência a insulina e diabetes provavelmente possui um papel central no desenvolvimento de complicações vasculares em diabetes (Biegelsen e Loscalzo, 1999).

2) *Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)* - o VEGF regula a permeabilidade vascular e angiogênese e também inibe a proliferação de células musculares lisas vasculares e trombose (Zachary, 2001). A regulação do VEGF e seus receptores entre os tecidos microvascular e cardíaco é feita pela insulina. Na presença de diabetes, e conseqüentemente de resistência a insulina, a expressão cardíaca de VEGF esta reduzida (Chou *et al.*, 2002) o que deve comprometer suas funções e favorecer o desenvolvimento de complicações vasculares em diabetes. Acredita-se que vários dos mecanismos que tem papel importante nas complicações cardiovasculares em diabetes são sensíveis a insulina por isso o melhoramento da sensibilidade a insulina nos mecanismos cardiovasculares é um alvo plausível na prevenção das complicações em diabetes.

Em adição a resistência a insulina, a hiperglicemia pode causar disfunção vascular ou pela geração de metabolitos tóxicos e reativos ou pela alteração das vias de sinalização intracelular. Os principais causadores de disfunção vascular em conseqüência da hiperglicemia são:

1) *Produtos finais de glicação avançada (AGEs - Advanced glycation end-products)* - em condições de hiperglicemia, a modificação covalente irreversível e o *cross-linking* de proteínas feito por glicose, promove a geração de AGEs. Esta formação não é específica de diabetes, também ocorre com o envelhecimento e desordem neurodegenerativas (He e King, 2004). Sabe-se que AGEs agem através de várias proteínas na superfície celular, mas o desenvolvimento de complicações cardiovasculares através de AGEs está fortemente associado a suas ações em seus receptores (RAGEs), também localizados na superfície celular. RAGEs ativam as vias de sinalização intracelular estimulados por AGEs (Neeper *et al.*, 1992). A ativação de RAGE ativa processos pró-inflamatórios em tecidos vasculares (Hofmann *et al.*, 1999), a cascata da proteína quinase e uma independente via de ativação de TGF- β 1 (Li *et al.*, 2004). Também tem sido sugerido que a interação AGE-RAGE ativa NADP oxidase, gerando espécies reativas do oxigênio (Wautier *et al.*, 2001). A glicação das proteínas da matriz extracelular (ECM), como colágenos 1 e 4 e laminina (Tanaka *et al.*, 1988; Tsilibary *et al.*, 1988), pode mudar a sua função e subseqüentemente alterar as interações ECM-célula e a integridade da ECM (Haitoglou *et al.*, 1992). Essas mudanças afetam a plasticidade e o tônus vascular dos vasos sanguíneos podendo levar a um desequilíbrio da fisiologia celular vascular (Brownlee, 2001). Um exemplo é que a glicação do colágeno tipo 4 e da laminina leva a redução da adesão a células endoteliais o que pode mudar o fenótipo da migração e proliferação dessas células (Haitoglou *et al.*, 1992). Jerums e colaboradores (2003) acreditam que as vias químicas que levam a formação de AGEs interagem junto ao sistema renina-angiotensina estimulando a geração de radicais livres e conseqüentemente estresse oxidativo, induzidos por ambos, glicose (hiperglicemia) e angiotensina II (Jerums *et al.*, 2003).

2) *Ativação de proteína quinase C (PKC)* - as PKCs são moléculas de sinalização intracelular que podem regular diversas funções cardiovasculares, como permeabilidade vascular, liberação de vasodilatadores, ativação endotelial, contratilidade dos cardiomiócitos e sinalização de fatores de crescimento. A elevação da glicemia a via glicolítica no diabetes e eleva o gliceraldeído-3-fosfato intracelular, o que leva a *upregulation* do diacilglicerol (DAG) e ativação da PKC (King *et al.*, 1996). Em animais diabéticos, induzidos geneticamente ou quimicamente, os níveis de DAG e PKC estão aumentados em vários tecidos

vasculares e não vasculares (Ishii *et al.*, 1998). A ativação da PKC nos vasos sanguíneos da retina, rins e nervos pode produzir danos vasculares como aumento da permeabilidade endotelial (Nagpala *et al.*, 1996), desregulação de NO através da inibição da expressão de eNOS (Kuboki *et al.*, 2000) ou da redução da sua formação endotelial in vivo (Bohlen e Nase, 2001) e alterações de fluxo sanguíneos (Shiba *et al.*, 1993);

3) *Estresse oxidativo* – a hiperglicemia no diabetes pode induzir aumento da formação das espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo. Sob condições fisiológicas normais, o oxigênio é essencial para as reações de fosforilação da mitocôndria e para a produção de ATP. As espécies tóxicas potenciais, ou seja, espécies reativas do oxigênio (ROS) e espécies reativas do nitrogênio (RNS), são formadas intracelularmente durante o transporte de elétron mitocondrial e da fosforilação oxidativa e são controlados pela defesa antioxidante mitocondrial. Como este processo mitocondrial produz água e ATP, cerca de 1-5% dos elétrons escapam da corrente do transporte de elétrons e são doados para o oxigênio molecular que formam os radicais livres superóxidos (Chance *et al.*, 1979). O ânion superóxido (O_2^-) é então convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) que pode ser localizada no citosol, na mitocôndria ou extracelular (Mccord e Fridovich, 1969). O peróxido de hidrogênio também é uma espécie reativa do oxigênio que pode formar radical hidroxil (OH^-), que por sua vez é a ROS mais ativa biologicamente. O H_2O_2 forma OH^- através da interação com O_2^- pela reação Harber-Weiss ou através da sua interação com cobre ou ferro (Halliwell e Gutteridge, 1985; Aruoma e Halliwell, 1987). Os antioxidantes possuem a função de neutralizar o H_2O_2 e de quebrar a cascata das ROS, entre eles incluem catalase (CAT) encontrada em peroxissomos, glutathione (GSH), peroxidase glutathione (GPX) localizada em ambos, mitocôndria e citosol, superóxido dismutase e vitamina C (Dekkers *et al.*, 1996). É importante notar que também existem as RNS que são produzidas por vias similares as das ROS e dentre as principais incluem radicais óxido nítrico (NO^-) e dióxido de nitrogênio (NO_2^-) bem como os não radicais peróxinitrito ($ONOO^-$) e óxido nítrico (HNO_2) (Forbes *et al.*, 2008).

Estresse oxidativo significa um aumento na produção de ROS, predominantemente ânion superóxido e peróxinitrito, que são capazes de provocar dano tecidual quando produzidos em excesso ultrapassando a capacidade normal

dos antioxidantes (Li e Shah, 2004; Zou *et al.*, 2004). O estresse oxidativo está aumentado em ambos, hiperglicemia e resistência a insulina/hiperinsulinemia. A hiperglicemia causa várias mudanças bioquímicas, como aumento da atividade da via poliol, formação de AGEs e ativação da via PKC. Todas essas mudanças podem resultar em produção de ROS e estresse oxidativo (He e King, 2004). O estresse oxidativo também pode ativar múltiplas vias como AGE-RAGE, PKC e vias da aldose redutase (poliol), induzindo danos em células vasculares diabéticas. Um exemplo é o de um estudo com células endoteliais expostas a um ambiente hiperglicêmico, onde foi observado um aumento da produção intracelular de ROS e a ativação de NF- κ B. Foram também observados níveis aumentados de AGE, sorbitol e da atividade da PKC. Neste mesmo estudo também foi observada a modulação da produção de ROS mitocondrial e cada uma das abordagens utilizadas bloqueou o aumento da produção de ROS induzido pela hiperglicemia, bem como a ativação das vias subcelulares descritas (Nishikawa *et al.*, 2000). Srinivasan e colaboradores (2004) observaram em camundongos geneticamente diabéticos (db/db) que a expressão e atividade da eNOS é regulada através da produção mitocondrial, mediada pela glicose, de estresse oxidativo, mais uma vez mostrando a importância do estresse oxidativo na disfunção endotelial (redução da produção de NO) e conseqüentemente nas complicações vasculares (Srinivasan *et al.*, 2004).

A produção de ROS vascular tem sido associada a vários sistemas incluindo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, lipoxigenases, cicloxigenase, xantina e glicose oxidase, NADPH oxidases, sintases do óxido nítrico, o citocromo P450, peroxidases e várias hemoproteínas (Wolin *et al.*, 2005). Entretanto, NADPH oxidases catalisam um elétron do oxigênio usando NADH ou NADPH como doador de elétrons resultando na formação do radical ânion superóxido. Este processo tem sido bem reconhecido como o meio mais freqüente de geração de ROS em células vasculares (Gorlach *et al.*, 2000; Griendling *et al.*, 2000; Lassegue e Clempus, 2003). Em um estudo em camundongos db/db, o tratamento com o antioxidante apocinina (um inibidor da NAD(P)H oxidase), levou ao aumento da vasodilatação mediada pelo NO em artérias coronárias, através da redução vascular de ânion superóxido derivado da NAD(P)H oxidase, e ao aumento da atividade da catalase (Bagi *et al.*, 2004).

Embora as conseqüências vasculares do estresse oxidativo em DMT2 tenham sido elucidadas pouco se sabe sobre a magnitude da influência do estresse oxidativo no remodelamento estrutural microvascular induzido por DMT2.

1.3. Angiotensina II e DMT2

Recentes pesquisas em diabetes tem enfatizado a sua associação com uma variedade de anormalidades vasculares que clinicamente se manifestam como um enorme risco de doença vascular. Estratégias de prevenção tem objetivado a correção dos fatores de risco. Em particular mecanismos que interrompem o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores dos receptores da angiotensina, são largamente usados em pacientes diabéticos com ou sem hipertensão. Vários ensaios clínicos tem mostrado não só a eficácia dessas drogas em reduzir hipertensão, mas também na prevenção ou atenuação de eventos vasculares (Cooper, 2004). Tem sido mostrado que angiotensina II esta intimamente envolvida na contribuição de Complicações vasculares em diabetes. Ela age via os seu efeitos hemodinâmicos vasoconstrictores bem como promovendo a produção de ânions superóxidos e agindo como uma molécula pro-inflamatória. Um potencial mecanismo mediador dos efeitos pró-inflamatórios deve ser via geração de ânions superóxidos pela NAD(P)H oxidase (Griendling *et al.*, 1994; Griendling e Harrison, 1999). O aumento da atividade da NAD(P)H oxidase estimulado pela angiotensina II deve ser via os seus receptores AT-1 pois esse efeito foi bloqueado pela pré-incubação de células endoteliais com o bloqueador do receptor AT-1 losartan (Rajágopalan, Kurz *et al.*, 1996). Na verdade é bem aceito que angiotensina II estimula a via PKC-NAD(P)H oxidase iniciando a produção de ânions superóxidos em cardiomiócitos e células musculares lisas vasculares (Griendling *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2003; Inoguchi e Nawata, 2005). No presente estudo nossos resultados demonstraram que o tratamento com o bloqueador do receptor AT-1 (Candesartan) reduziu significativamente os níveis de estresse oxidativo em artérias mesentéricas de camundongos diabéticos db/db (Figura 8).

Hiperglicemia crônica acelera a reação entre glicose e proteínas o que leva a formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), que formam cross-linking irreversíveis com varias macromoléculas como o colágeno (He e King, 2004). Em

diabetes as AGEs se acumulam nos tecidos e agem não só enrijecendo colágeno estrutural mas também agem como agonistas dos receptores de AGE (RAGE) em vários tipos celulares. A ação dos RAGEs estimulam a liberação de fatores de crescimento pro-fibróticos, promovem deposição de colágeno, aumentam a inflamação e finalmente levam a fibrose tecidual (Neeper *et al.*, 1992). Tem sido mostrado que AGEs induzem estresse oxidativo vascular através da ativação de NADP oxidase (Wautier *et al.*, 2001). Jerums e colaboradores (2003) acreditam que as vias químicas que levam a formação de AGEs interagem junto ao sistema renina-angiotensina estimulando a geração de radicais livres e conseqüentemente estresse oxidativo, induzidos por ambos, glicose (hiperglicemia) e angiotensina II (Jerums *et al.*, 2003). O tratamento com candesartan conferiu efeitos anti-ateroscleróticos em um modelo de diabetes com aterosclerose avançada e esses efeitos foram associados à via AGE/RAGE e estresse oxidativo (Calkin *et al.*, 2008).

1.4. Remodelamento vascular

A estrutura dos vasos sanguíneos varia refletindo as suas diferentes funções. Os vasos são basicamente compostos pelas túnicas íntima, média e adventícia. A parede vascular é composta, de um modo geral, pelo endotélio, fibras de elastina, músculo liso e fibras de colágeno, com exceção dos capilares que possuem apenas endotélio. O endotélio libera diferentes fatores de crescimento e mediadores vasoativos que regulam as propriedades físicas e bioquímicas dos vasos e afetam a contratilidade vascular e o crescimento celular. O músculo liso mantém o tônus e regula a contração vascular, o diâmetro vascular, a pressão sanguínea e a distribuição do fluxo sanguíneo. Grandes artérias têm mais tecido elástico em suas paredes, enquanto que vasos de alta resistência apresentam menos elastina e, proporcionalmente mais músculo liso em suas paredes, refletindo o seu papel no controle de fluxo da microcirculação (Withers, 1992).

As artérias elásticas, por possuírem sua túnica média rica em elastina, têm paredes muito distensíveis com grande capacidade de expansão. As artérias musculares possuem uma túnica média mais espessa que o lúmen, contendo mais músculo liso. Já os vasos de resistência possuem lúmen estreito e determinam a resistência ao fluxo, aumentando ou diminuindo os fluxos regionais de acordo com as necessidades locais (Eckert e Randall, 1983).

Em adição aos fatores hemodinâmicos, como fluxo e pressão, a parede vascular é constantemente exposta a uma variedade de fatores humorais incluindo fatores coagulatórios, peptídeos vasoativos, citocinas, fatores de crescimento e alguns hormônios. A mudança do balanço homeostático entre esses fatores pode induzir alterações adaptativas da estrutura, arquitetura e função vascular. Esses processos são conhecidos como remodelamento vascular.

O fluxo sanguíneo é governado por leis físicas. Essas leis dependem de um fluxo laminar que pode ser determinado pelo número de Reynolds, com os parâmetros que controlam o fluxo sanguíneo descrito pela lei de Poiseuille (shear stress) e de forças agindo na parede descrita pela lei de Laplace (Korshunov *et al.*, 2007). Em adição, os parâmetros relacionados ao fluxo (Reynold), a tensão de parede (Laplace) e o shear stress (Poiseuille) determinarão o transporte de fluidos na parede do vaso (Pappenheimer *et al.*, 1951). O remodelamento deve depender dos resultados físicos da ação das forças na parede arterial através da transdução dos sinais bioquímicos do shear stress, transferência térmica, tensão de parede ou transporte de fluidos (Malek *et al.*, 1999).

O remodelamento é caracterizado como uma reorganização ou renovação de uma estrutura. Infelizmente a terminologia usada para descrever remodelamento é controversa e inconsistente (Bund e Lee, 2003; Mulvany, 2003). O remodelamento vascular envolve a reorganização das células existentes e da matriz extracelular ao redor de um lúmen maior ou menor, ou mudanças no crescimento da musculatura lisa vascular e deposição de matriz sem necessariamente alterar a área da camada média e sem necessidade de evocar resposta de crescimento (Heagerty *et al.*, 1993). O remodelamento vascular pode ser caracterizado de diferentes formas e estão representados na Figura 1. Mulvany (1996) propôs uma terminologia para classificar remodelamento vascular baseados no diâmetro interno e área da camada média (Bund e Lee, 2003). Baseado na área da camada média o remodelamento pode ser caracterizado como remodelamento hipotrófico (redução da área da camada média), eutrófico (inalteração da área da camada média) ou hipertrófico (aumento da área da camada média). Esses processos estão associados à nomenclatura baseada no diâmetro interno que engloba remodelamento interno (diâmetro interno menor) ou externo (diâmetro interno maior) (Mulvany *et al.*, 1996).

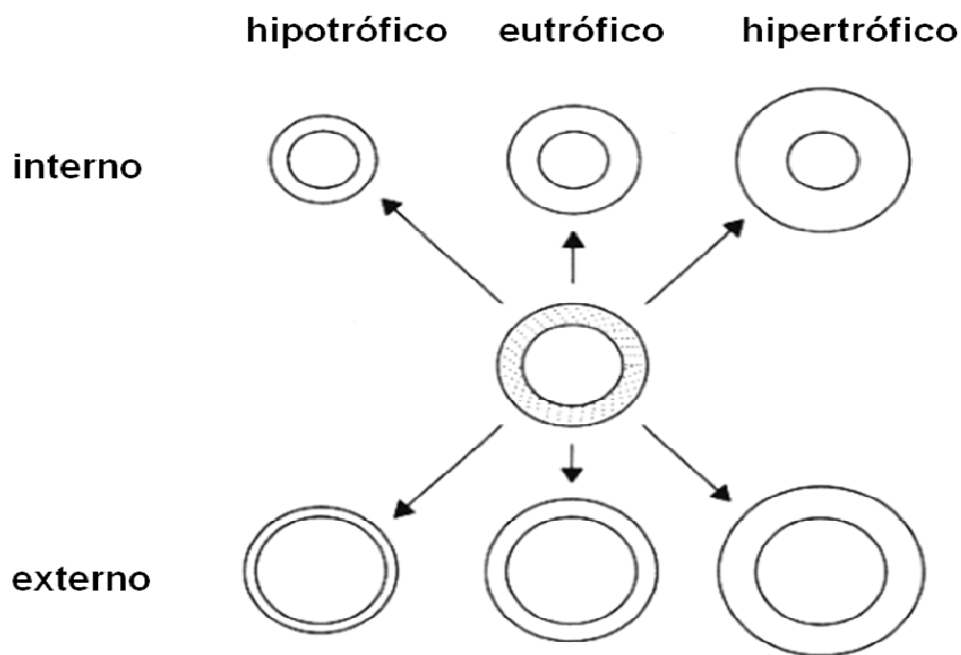


Figura 1: O diagrama mostra a maneira em que o remodelamento vascular pode modificar as secções transversais dos vasos sanguíneos. O ponto de partida é o vaso no centro (sombreado). O remodelamento pode ser hipertrófico (maior área da camada média, vasos na coluna direita), eutrófico (sem mudanças na área da camada média, vasos na coluna do meio) ou hipotrófico (menor área da camada média, vasos na coluna esquerda). Essas formas de remodelamento podem ser interna (redução do diâmetro interno, vasos na linha superior) ou externa (aumento do diâmetro interno, vasos na linha inferior) (Mulvany *et al.*, 1996).

Pesquisas recentes sobre remodelamento em artérias de resistência tem sido bastante contraditórias. Por exemplo, o tratamento com streptozotocina (STZ) por 3 semanas, no intuito de induzir diabetes do tipo 1, produziu hipertrofia em artérias mesentéricas de resistência (Cooper *et al.*, 1994) e o tratamento com aminoguanidina (um inibidor da formação de AGEs) resultou em significativa melhora das alterações patológicas (Rumble *et al.*, 1997). Em adição, ratos tratados com frutose, um modelo aceitável de hiperglicemia crônica, mostraram um aumento na espessura de parede das artérias mesentéricas, bem como um aumento da área da camada média sem alteração do diâmetro interno (Puyo *et al.*, 2004). Diabetes tipo 2 em ratos Goto-Kakizaki causou significativo remodelamento cerebrovascular via modulação da cascata de metaloproteínases da matriz extracelular (MMPs) (Harris *et al.*, 2005). Em pequenas artérias de resistência de pacientes com DMT2 uma evidente disfunção endotelial foi detectada, seguida de remodelamento hipertrófico e

menos fibrose (Rizzoni, Porteri, Guelfi, Muiesan, Piccoli *et al.*, 2001). Em contraste, pacientes hipertensos com DMT2 preexistente apresentaram remodelamento predominantemente eutrófico e fibrose (Rizzoni, Porteri, Guelfi, Muiesan, Valentini *et al.*, 2001). As discrepâncias observadas refletem diferenças em DMT1 x DMT2, resistência a insulina, hiperglicemia, obesidade e leito vascular estudado. Embora a regulação da contração e dilatação das artérias de resistência tenha sido extensivamente estudada em DMT2, muito pouco se sabe sobre os mecanismos que levam a diabetes a induzir remodelamento estrutural na microvasculatura.

1.4.1. Mecanismos moleculares do remodelamento vascular

As células teciduais estão rodeadas de matriz extracelular (ECM), que são compostas de longos filamentos de fibras de proteínas promovendo força elástica e canais de comunicação e movimento de células no tecido. A ECM é capaz de trocar informações com as células e assim modular vários processos incluindo desenvolvimento, migração celular, adesão, diferenciação e reparo. A DMT2 é uma condição que está associada a múltiplas toxicidades metabólicas e estímulos crônicos prejudiciais que quando não estão controlados levam a ativação crônica de diversos processos tóxicos e o desequilíbrio de ECMs, resultando em fibrose, desarranjo estrutural, disfunção de órgãos ou tecidos e falência (Hayden *et al.*, 2005).

A estrutura geral da ECM é formada por dois domínios principais, um é a membrana basal que é uma camada de matriz condensada formada adjacente as células epiteliais, o outro esta cobrindo o forro celular (mesotélio, meningotélio e sinóvia), músculo, células de Schwann, adipócitos e matriz intersticial. O principal componente protéico da ECM é o colágeno produzido principalmente pelos fibroblastos. A ECM também contém proteoglicanas, fatores de crescimento latentes e ativos e proteínas em torno da matriz extracelular (Bosman e Stamenkovic, 2003). A membrana basal é um importante componente dos vasos sanguíneos, ela forma uma âncora para as células endoteliais e pericitos, o forro interno do cilindro vascular sendo alinhado pelas células endoteliais e pericitos cobrindo a parte exterior do cilindro. As células que produzem e secretam proteínas na membrana basal são as mesmas células que ela envolve, células endoteliais e pericitos. Os principais constituintes da membrana basal incluem colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanas

e nidogênio (glicoproteína). A estrutura básica da membrana basal é formada pela rede de colágeno e pela rede de laminina, elas interagem entre si através do nidogênio (Aumailley *et al.*, 1989; Timpl e Brown, 1996). A membrana basal e outros ECMs são submetidos a constantes mudanças dinâmicas em resposta a um número de estímulos celulares o que leva ao remodelamento da membrana basal vascular. Nos anos 80 e 90 pesquisadores costumavam dizer que “diabetes é uma doença da membrana basal”. Esta terminologia não é mais usada freqüentemente, entretanto o conceito é largamente aceito (engrossamento da membrana basal é um marcador ultra-estrutural de pacientes diabéticos) (Hayden *et al.*, 2005).

A ECM não só participa da integridade da parede vascular mas também é um importante determinante da complacência vascular. Os mecanismos moleculares que levam ao acúmulo ou degradação de ECM em vasos de resistência de DMT2 ainda não foram extensivamente estudados.

Como já foi revisado acima a DMT2 é caracterizada por perturbações na vasculatura arterial, especialmente a membrana basal do endotélio e capilar, que esta integralmente envolvida em profundas complicações cardiovasculares e microvasculares. O endotélio e sua membrana basal são a primeira linha de defesa contra estímulos prejudiciais no lúmem vascular e leito capilar e são responsáveis pela regulação do tônus vascular, circulação, fluidificação, coagulação, respostas inflamatórias, estresse oxidativo e remodelamento em resposta a estímulos danosos (Hayden *et al.*, 2005).

As proteínas vasculares da ECM não só possuem a função de ancorar proteínas mas também estão envolvidas na sinalização da matriz devido à interação com a família de proteínas integrinas promovendo sinalização de fatores de crescimento. A ECM promove um equilíbrio dinâmico perfeito, onde existe constante síntese, degradação e organização (Song e Ergul, 2006). O controle das proteínas da matriz é feito pela metaloproteinase da matriz (MMP) (Sellers e Woessner, 1980; Visse e Nagase, 2003). Acredita-se que a diminuição da atividade da MMP contribui para a diminuição da degradação e conseqüentemente o acúmulo de ECM em rins de diabéticos e em tecido vascular de pacientes diabéticos. Sabe-se que existe uma precoce ativação das MMPs em hipertensão e diabetes (Ammarguella *et al.*, 2002; Ergul *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2005). Entretanto a regulação transcricional das proteínas da ECM e MMPs em diferentes leitos vasculares no DMT2 ainda esta por ser determinada (Song e Ergul, 2006).

As MMPs são uma grande família de metaloendopeptidases dependente de zinco e sensíveis ao redox estresse oxidativo. Elas degradam componentes protéicos da ECM e da membrana basal. Existe um delicado balanço fisiológico entre degradação, reconstrução e esculpamento (remodelamento) dos colágenos na ECM. As MMPs apresentam uma larga especificidade por vários substratos como, fibras de colágeno nativas e parcialmente degradadas, colágenos da membrana basal, proteoglicanas, elastinas e fibronectinas. A habilidade de algumas MMPs, como MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-12, de hidrolisar elastina tem particular importância na parede vascular arterial (Gross e Lapiere, 1962; Hayden *et al.*, 2005). As MMPs também são conhecidas como colagenases (MMP-1, 8, 13 e 18), gelatinases (MMP-2 e 9) estromelinas (MMP-3, 10 e 11), matrilisinas (MMP-7 e 26) e MMPs de membrana ou MT-MMPs (MMP-14, 15, 16, 17, 24 e 25). Outras MMPs não estão caracterizadas em nenhuma das categorias citadas e uma delas é a MMP-12 ou macrófago metaloelastase. A MMP-2 ou gelatinase A (72 kDa) e a MMP-9 ou gelatinase B (92 kDa) são duas proteínases enzimáticas que são primariamente responsáveis em degradar colágeno do tipo 4 da membrana basal, eles são sintetizados por vários tipos celulares vasculares (Bosman e Stamenkovic, 2003; Visse e Nagase, 2003), elas também degradam gelatinas e elastinas (Shiple, Doyle *et al.*, 1996; Bosman e Stamenkovic, 2003; Visse e Nagase, 2003) (Shiple, Doyle *et al.*, 1996). MMP-2 pode ser considerada uma enzima constitutiva enquanto que MMP-9 pode ser considerada uma enzima induzível nos diferentes tipos celulares. Quanto maior a sinalização e ação das MMPs na ECM mais robusto será o mecanismo de reparo da síntese de colágeno recém formado (Hayden *et al.*, 2005). MMP-12 é uma metaloelastase principalmente encontrada em macrófagos que degrada elastina e esta relacionada com processos inflamatórios (Shapiro *et al.*, 1993; Shiple, Wesselschmidt *et al.*, 1996).

As MMPs não são encontradas somente na forma secretada no sistema circulatório. Elas também são encontradas na forma de zimogênio na ECM e são mantidas na forma latente inativa ou pró-MMP (MT1-MMP, MMP2 e MMP-3 na superfície celular) até que elas sejam ativadas pelo ativador de plasminogênio tecidual ou plasminogênio urokinase que transforma plasminogênio em plasmina e age diretamente na latente ou pró-MMP transformando-a em MMP ativa. A elevação do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), que será revisada mais adiante, pode ter um efeito devastador e detrimental na produção de plasmina e ativação de

MMPs, podendo ser de grande importância na acumulação de matriz extracelular (Hayden *et al.*, 2005). A MMP-9 pode ser ativada por MMP-2 e MMP-3, bem como por MT1-MMP que converte pro-MMP2 em MMP-2 ativa (Fridman *et al.*, 2003).

O balanço entre MMPs e os seus inibidores teciduais (TIMPs) são conhecidos por terem um papel central no remodelamento vascular (Nagase e Woessner, 1999). Quatro diferentes TIMPs (TIMP-1, 2, 3 e 4) já foram identificadas em vertebrados (Vincenti, 2001) e as suas expressões são controladas durante desenvolvimento e remodelamento tecidual. Sob condições patológicas associadas com um desequilíbrio das atividades das MMPs, mudanças nos níveis de TIMPs são consideradas importantes porque eles afetam diretamente os níveis das atividades das MMPs. As TIMPs inibem todas as MMPs testadas, exceto MT1-MMP por TIMP-1 (Visse e Nagase, 2003). O desequilíbrio entre MMPs e TIMPs pode levar a um excesso do acúmulo ou degradação de ECM (Brassard *et al.*, 2005). Por exemplo, a nefropatia e a vasculopatia em diabético envolve excessiva deposição de ECM secundária a uma diminuição da razão MMP/TIMP (Kenichi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2006). Upregulation de MMP-2 foi encontrada em artérias colaterais expostas à grande shear stress levando os autores a crer que a atividade das MMPs são essenciais para a completa resposta de remodelamento que leva a expansão externa do lúmen (Haas *et al.*, 2007). Outro exemplo é a associação de MMP e estresse oxidativo. Uemura e colaboradores 2001 observaram aumento da atividade de MMP-9 em DMT2 e o estresse oxidativo teve um importante papel nesta atividade (Uemura *et al.*, 2001).

1.4.1.1. Fatores de crescimento e remodelamento vascular

O aumento da deposição das proteínas da ECM e a proliferação de células musculares lisas vasculares são componentes chave, estruturais e funcionais, para a hipertrofia e remodelamento vascular induzido por diabetes. O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) é uma citocina proteolítica multifuncional que promove o crescimento de células musculares lisas vasculares (Stouffer e Owens, 1994), hiperplasia da íntima (Wolf *et al.*, 1994) e é um potente indutor da formação de ECM (Border e Noble, 1994). Estudos *in vivo* (Yang *et al.*, 1994) e *in vitro* (Throckmorton *et al.*, 1995) mostraram a habilidade de AGEs de aumentar TGF- β , o que está relacionado com hiperglicemia e diabetes. Na hipertrofia vascular do diabetes

experimental a expressão de TGF- β esta aumentada (Rumble *et al.*, 1998). O aumento da expressão de TGF- β é traduzida em efeitos nos componentes da ECM porque já foi mostrado que a expressão de colágeno é dependente de TGF- β (Ziyadeh *et al.*, 1994). Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) está cronicamente elevado em tecido adiposo na obesidade e contribui para a resistência a insulina e hiperinsulinemia, e aumento de TGF- β nessas condições. O TNF- α , a insulina e o TGF- β podem levar ao aumento do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) e consequentemente promover risco cardiovascular. Samad e colaboradores (1999) observaram que o TNF- α tem um papel central no aumento de PAI-1 na obesidade e que também contribui para os altos níveis de insulina no plasma e expressão de TGF- β no tecido adiposo na obesidade (Samad *et al.*, 1999). O agente pro-fibrótico PAI-1 está aumentado no diabetes, na resistência a insulina e na hipertensão (Mcfarlane *et al.*, 2003). Os mecanismos da ECM que levam ao aumento de PAI-1 estão envolvidos com o aumento da síntese de colágeno junto com a redução da degradação através da upregulation de inibidores das proteases da ECM como o PAI-1 (Border e Noble, 1994). Todas essas considerações enfatizam a importância potencial do excesso de tecido adiposo, resistência a insulina e hiperglicemia, na síntese de proteínas e outras moléculas que podem promover o desenvolvimento de complicações fisiopatológicas associadas com obesidade e DMT2, e que TGF- β e PAI-1 são importantes marcadores fisiológicos em remodelamento vascular e *turnover* da ECM.

1.4.2. Fluxo sanguíneo e remodelamento vascular

Vários grupos tem mostrado que um aumento crônico do fluxo sanguíneo em artérias de resistência resulta em remodelamento hipertrófico externo (Pourageaud e De Mey, 1997; Tulis *et al.*, 1998; Ceiler e De Mey, 2000; Buus *et al.*, 2001; Tuttle *et al.*, 2001). Como resultado de um aumento do *shear stress*, em consequência de um alto fluxo sanguíneo, vários vasodilatadores derivados do endotélio são liberados, como NO, prostaciclina, bradicinina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). O acúmulo desses vasodilatadores causa dilatação arterial e redução da resistência (Huang *et al.*, 2001). O aumento do diâmetro interno tende a normalizar o *shear stress* mas leva, juntamente ao aumento da pressão transmural, a um aumento do estresse de parede e do *strain* nas células musculares lisas de artérias

de resistência. Esses parâmetros estimulam a liberação de fatores de crescimento como TGF- β (Song *et al.*, 2000), e assim, contribuem para a hipertrofia em artérias de resistência cronicamente exposta a alto fluxo sanguíneo.

Provavelmente a vasodilatação não é a única alternativa vascular de produzir mudanças estruturais para normalizar o *shear stress*. Isso porque observações em artérias mesentéricas de primeira ordem que apresentavam remodelamento externo em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo in vivo, permaneceram apresentando remodelamento mesmo com o uso do inibidor da síntese de NO (Ceiler e De Mey, 2000).

O remodelamento externo de artérias de resistência: 1) pode ajudar a manter e restaurar a perfusão tecidual; 2) não está intimamente relacionado com a vasodilatação induzida por alto fluxo; 3) envolve diferenciação transiente de células musculares lisas e 4) é precedida por expressão de proteínas matricelulares que participam do acúmulo ou degradação da ECM (De Mey *et al.*, 2005).

Considerando os efeitos do remodelamento em artérias de resistência. Da hiperglicemia e hiperinsulinemia, que são características de diabetes do tipo 2. E da ação de antioxidantes e do sistema renina-angiotensina em diabetes. O presente estudo teve o intuito de examinar a estrutura de artérias mesentéricas de resistência de camundongos transgênicos que apresentam deficiência no receptor de leptina (db/db), um modelo hiperglicêmico, com resistência a insulina, hiperlipidêmico e obeso de diabetes do tipo 2. Para isso, um sistema de miógrafo de pressão foi utilizado, bem como análises bioquímicas e histológicas das artérias mesentéricas de resistência de camundongos desse modelo, para caracterizar se os animais diabéticos apresentavam algum tipo de alteração estrutural e qual seria a influência do estresse oxidativo e do sistema renina-angiotensina na alteração produzida. A expressão de algumas das proteínas regulatórias da matriz extracelular envolvidas em alterações estruturais de parede arterial também foram examinadas. A hipótese do nosso trabalho foi que as artérias mesentéricas de resistência dos camundongos diabéticos apresentariam alterações estruturais que estariam associadas ao estresse oxidativo.

II. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar se as artérias mesentéricas de resistência dos camundongos diabéticos (db/db) apresentam alguma alteração estrutural e qual seria essa alteração.

2.2. Objetivos específicos

- A. Estabelecer o papel do estresse oxidativo no remodelamento hipertrófico externo apresentado pelas artérias mesentéricas de resistência dos camundongos diabéticos (db/db)
 - A.1. Observar se a produção de espécies reativas do oxigênio estão aumentadas em camundongos diabéticos
 - A.2. Observar se o remodelamento das artérias mesentéricas de camundongos diabéticos (db/db) pode ser atenuado pelo tratamento com antioxidantes
- B. Definir a relação da angiotensina II na regulação do remodelamento hipertrófico externo apresentado pelas artérias mesentéricas de resistência dos camundongos diabéticos (db/db)
- C. Determinar o envolvimento da matriz extracelular (ECM) no remodelamento hipertrófico externo apresentado pelas artérias mesentéricas de resistência dos camundongos diabéticos (db/db)
 - C.1. Analisar a expressão das proteínas regulatórias (MMPs, TIMPs, TGF- β e PAI-1) de matriz extracelular (ECM) em tecidos de artérias mesentéricas de resistência de animais diabéticos e não diabéticos

III. Material e Métodos

3.1. Animais experimentais

Todos os experimentos foram feitos em camundongos, machos, com 16 a 17 semanas de idade, pesando entre 25-60g, fornecidos pelo Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME). Os animais foram mantidos em gaiolas comerciais para camundongos, sob condições controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12/12 horas, tendo livre acesso à ração e água. Os estudos foram realizados conforme os princípios do Instituto Nacional de Saúde “Guia para Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais” (NIH publicação No.85-12, revisado em 1996).

3.2. Modelo experimental

Para os experimentos foram usados camundongos machos geneticamente diabéticos (C57BL/KsJ-db/db). Os camundongos db/db apresentam mutação no receptor de leptina o que inviabiliza a intensa sinalização da leptina. Esse hormônio peptídeo de 16 kDa é secretado por adipócitos brancos e serve como um sinal de feedback de células gordurosas para o sistema nervoso central para regulação do consumo de comida, balanço energético e armazenamento de gordura. Os camundongos desenvolvem hiperglicemia com 8 semanas de idade e exibem várias características comuns de diabetes tipo 2, incluindo hiperlipidemia, obesidade (visível de 3-4 semanas) e resistência a insulina produzindo hiperinsulinemia. Com 12 semanas os animais são totalmente diabéticos. Camundongos heterozigotos (C57BL/KsJ-Db/db) Db/db foram usados como controle (Coleman e Hummel, 1975; Herberg e Coleman, 1977). Os animais foram usados entre 16 a 17 semanas de vida.

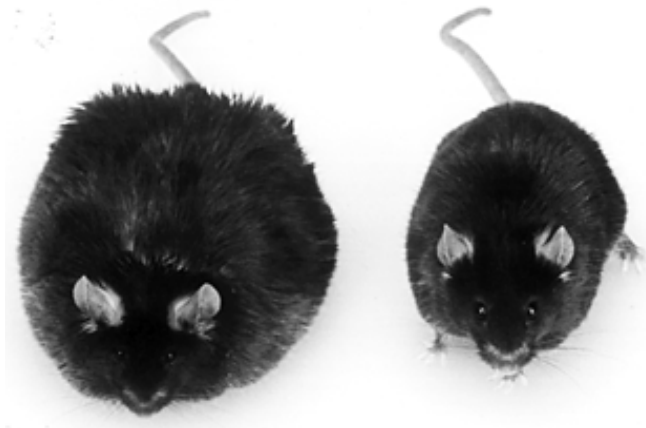


Figura 2: Foto representativa de camundongo homozigoto (db/db) a esquerda heterozigoto (Db/db) à direita.

3.3. Medidas de pressão arterial e glicose sanguínea

A pressão arterial e frequência cardíaca foram monitorados em camundongos conscientes e em movimento livre usando um *probe* de telemetria (Transoma Medical; St. Paul, MN) operado por bateria (PA-C10). Os animais foram anestesiados usando uma mistura de ketamina (200 mg/kg, i.p.) e xylazina (10 mg/kg). Foi realizada uma incisão ventral na pele do animal, depois que o pelo foi removido, da mandíbula inferior ao externo (aprox. 7mm). As glândulas submaxilares foram separadas e a artéria carótida comum foi isolada. Duas linhas cirúrgicas (6-0) foram colocadas sob a artéria. A linha proximal foi colocada caudalmente a bifurcação da carótida para ligar a artéria. A linha distal foi usada para ocluir temporariamente a artéria durante a inserção da cânula e então foi usada para amarrar e fixar a cânula dentro da artéria. Uma pequena incisão foi feita na artéria carótida, aproximadamente um terço da distancia entre as linhas proximal e distal, e a cânula foi inserida e amarrada. Usando a mesma incisão ventral um descolamento subcutâneo foi feito em direção ao flanco direito do animal para que o corpo do “*probe*” de telemetria fosse armazenado. Durante a cirurgia a temperatura dos animais foi mantida a 37°C usando uma almofada de aquecimento. Transoma acquisition software foi usado para monitorar a frequência cardíaca e a pressão arterial.

A inserção dos probes foi feita quando os animais estavam com 14 semanas de idade, 2 semanas antes de serem sacrificados. Depois de 7 dias de pós-operatório as medidas de frequência cardíaca e pressão arterial foram feitas. Os dados foram coletados durante 7 dias, no mesmo horário, 1 h por dia (Kramer *et al.*, 1993; Jámes *et al.*, 1998). Antes do experimento e depois de 12 horas de jejum a glicose sanguínea foi medida através de um medidor de glicose portátil (Accu-Check II) usando uma gota de sangue extraída da veia safena do animal acordado.

3.4. Metodologia e protocolos experimentais utilizados nos estudos da artéria mesentérica de camundongos

3.4.1. Metodologia para obtenção e isolamento da artéria mesentérica

Com 16 semanas de idade os camundongos foram anestesiados com a combinação de ketamina (200 mg/kg, i.p.) e xylazina (10 mg/kg) administrados via intraperitoneal. A região abdominal dos animais foi limpa com álcool. Uma incisão na linha média do abdômen foi feita e o mesentério foi cuidadosamente exposto, extraído e imediatamente transferido para um reservatório contendo solução de Krebs-Henseleit contendo NaCl, 130 mmol/l; NaHCO₃, 14.9 mmol/l; KCl, 3.7 mmol/l; CaCl₂_2H₂O, 1.6 mmol/l; KH₂PO₄, 1.2 mmol/l; MgSO₄_7H₂O, 1.2 mmol/l; glicose, 11 mmol/l; and HEPES, 10 mmol/l. O intestino foi limpo com o uso de pinças e a mesentérica foi fixada em um placa de Petri contendo silicone congelado. Com a ajuda de um microscópio para dissecação (Nikon SMZ-645) as artérias do terceiro ramo da artéria mesentérica superior ($87 \pm 5.4 \mu\text{m}$ de diâmetro interno e de 1 – 2 mm de comprimento) foram cuidadosamente dissecadas e isoladas do tecido adiposo e tecido conectivo ao redor do vaso usando micropinças e microtesoura sem tocar ou esticar o vaso. Dois pequenos buracos foram feitos nos fins da mesentérica e para evitar a manipulação do vaso a ser canulado, pequenos pedaços de mesentérica conectados a artéria a ser canulada foram deixados nas extremidades do vaso para facilitar a remoção e canulação.

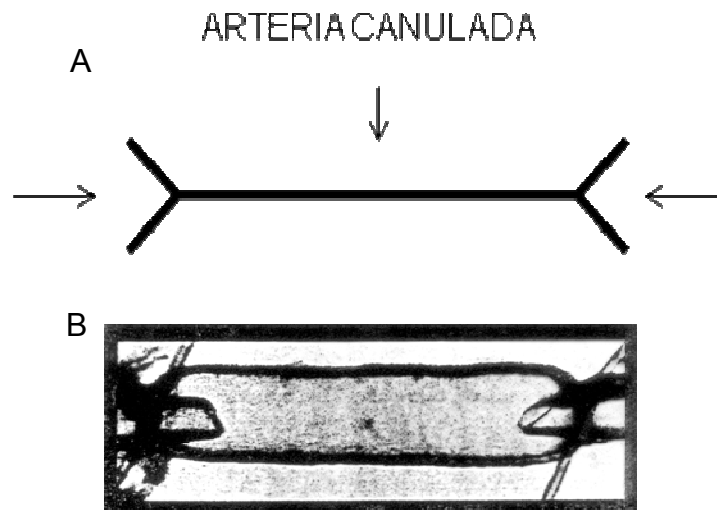


Figura 3: Figura representativa da artéria mesentérica a ser canulada (A) e já canulada (B). Em A as setas laterais indicam os locais da incisão com a microtesoura para que o vaso fosse canulado. Os braços laterais indicam onde o vaso foi tocado pelas cânulas para que danos fossem minimizados na artéria canulada.

Todos os tubos e cânulas foram preenchidos com Krebs-Hanseleit antes do começo do protocolo experimental, bem como o banho contendo as microcânulas de vidro (diâmetro de 60-90 μm). A solução de Krebs-Hanseleit no banho foi mantida a 37 $^{\circ}\text{C}$ por todo o experimento. Uma ponta da artéria mesentérica foi canulada e amarrada em uma microcânula de vidro com ajuda de uma fina linha de nylon (19 μm). Essa cânula, por sua vez, estava conectada via tubos a um reservatório contendo solução de Krebs-Hanseleit para perfusão do vaso via uma bomba peristáltica. Para cuidadosamente remover o sangue dentro do vaso a bomba peristáltica foi ligada para o modo fluxo e o sangue foi removido do lúmen do vaso que ainda não estava canulado na outra extremidade. A pressão de perfusão foi mantida em torno de 10 mm Hg. Depois disso, a outra ponta do vaso também foi canulada e amarrada. A extremidade dessa segunda cânula foi bloqueada usando uma torneira trifluxo. A pressão foi aumentada para 100 mm Hg dentro da artéria para verificar se havia algum buraco no vaso que era detectado por um fraco desenvolvimento de pressão e por uma rotação invertida da bomba peristáltica.

Somente vasos intactos foram usados nos experimentos. Depois a pressão foi ajustada para 50 mm Hg e a artéria estabilizada por um período de 45-60 minutos. O banho foi posicionado em um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100-F) com objetiva 20x. O banho foi posicionado embaixo de uma câmera CCD (Hitachi, Japão) conectada ao microscópio para a visualização do vaso. A amplificação da imagem foi transmitida a um monitor de TV de 12" via um analisador de dimensão de vídeo (Living Systems Instrumentation, Burlington, Vermont, USA) possibilitando que o diâmetro interno e paredes, esquerda e direita, do vaso fossem medidas. Todo o sistema estava ligado a um computador PC que com a ajuda do programa DATAQ (DI-720) permitia a exposição em tempo real, registro e análise de todas as medidas (Halpern *et al.*, 1978).

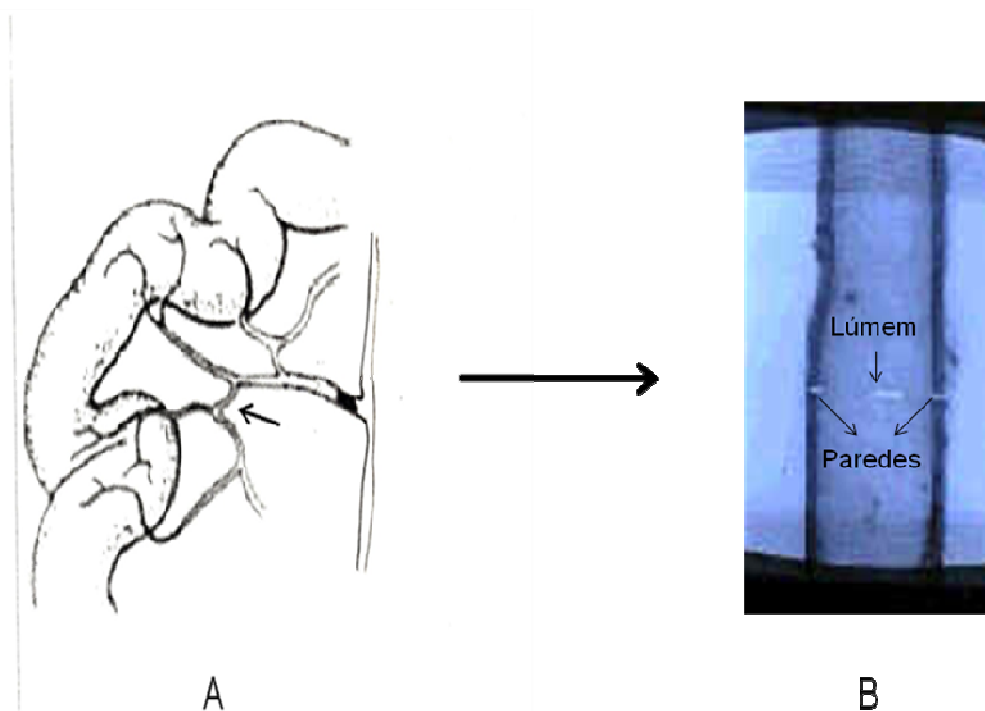


Figura 4: Foto representativa do leito mesentérico (A) onde a seta indica o terceiro ramo da artéria mesentérica partindo da artéria mesentérica superior. Foto do terceiro ramo da artéria mesentérica (B) montada e pressurizada no miógrafo de pressão como vista no monitor.

3.4.2. Protocolos experimentais

Apos a cânulação as artérias foram estabilizadas por 45 – 60 minutos a uma pressão intravascular de 50 mm Hg e fluxo zero. Os vasos foram mantidos em uma câmara de 4 ml contendo solução de Krebs-Hanseleit descrita previamente (3.4.1), pH 7,4 e temperatura 37 ° C. As medidas de diâmetro e espessura das paredes foram feitas quando a pressão intravascular foi aumentada em etapas de 10 – 125 mm Hg em medidas passivas de diâmetro. O diâmetro passivo foi determinado pela mudança do banho de Krebs-Hanseleit para Krebs-Hanseleit livre de Ca⁺² e adição de 60 µl de 100 mmol / l de nitroprussiato de sódio (NPS) e 60 µl de 2 mmol / l de etilenoglycol-bis (beta-aminoetileter)-N,N'-tetraacetico acido (EGTA). O diâmetro passivo mínimo foi determinado quando o vaso foi submetido a uma pressão intraluminal de 10 mm Hg antes do aumento gradativo de 25 – 125 mm Hg. Após o período de estabilização e antes da mudança do banho para solução de Krebs-Hanseleit livre de Ca⁺², foi realizada a avaliação da integridade do endotélio onde a artéria mesentérica foi submetida a uma pré-contração através da adição de 60 µl de fenilefrina (1 mmol / l) no banho e após o estabelecimento de um platô, 60 µl de acetilcolina (1 mmol / l) foi administrada. A avaliação do endotélio só foi realizada para ter certeza de que o vaso não sofreu nenhuma lesão mecânica durante o isolamento e cânulação porque na verdade a integridade do endotélio e musculatura lisa vascular não interferiram em nossos experimentos, uma vez que todas as medidas foram feitas nas condições passivas do vaso, ou seja, nenhuma propriedade contrátil foi necessária para esses experimentos.

3.4.2.1. Medidas realizadas usando os parâmetros extraídos dos experimentos em artérias mesentéricas de resistência

Tanto os diâmetros interno e externo (D_i and D_e , respectivamente) foram medidos durante os experimentos, bem como a espessura de parede (EP) em condições passivas de diâmetro. Os seguintes parâmetros estruturais e mecânicos foram determinados usando as seguintes formulas:

Relação média / lúmem = EP / D_i.

Área da Camada Média (ACM) = $\pi (D_e^2 - D_i^2) / 4$.

Tensão de Parede (T, $\mu\text{m} \cdot \text{mmHg}$) = PD_i / 2, onde P é a pressão intraluminal.

Estresse de Parede (E, mmHg) = T / EP, notar que é a mesma fórmula do *circunferencial stress*, o que muda é a unidade de pressão.

Circunferencial strain (ϵ) = (D - D₀) / D₀, onde D é o diâmetro interno observado para uma determinada pressão intraluminal requerida e D₀ é o diâmetro interno obtido quando a pressão intraluminal era de 10 mm Hg.

Circunferencial stress (σ) = (PD) / (2EP), onde P é a pressão intraluminal e D é o diâmetro interno. A pressão foi convertida para dinas por centímetro quadrado (1 mm Hg = 1,334 x 10³ dinas / cm²).

A relação stress–strain esta relacionada com a complacência vascular e foi determinada quando o *stress* da média foi examinado em função do *strain*. Essa complacência depende do diâmetro interno vascular e das propriedades elásticas da parede vascular.

Complacência (Ccs, $\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) = $\Delta A_i / \Delta P$, onde ΔA_i é a mudança da área do diâmetro interno induzida por uma mudança de pressão (ΔP).

Distensibilidade (D_{cs} , mm Hg⁻¹) = C_{cs} / A_i (Baumbach e Heistad, 1989; Schiffrin, 1992).

3.4.2.2. Efeito da inibição do estresse oxidativo e do receptor AT-1 sobre a resposta passiva das artérias mesentéricas de resistência

Com a finalidade de estudar os possíveis fatores envolvidos no remodelamento da artéria mesentérica de camundongos diabéticos os animais foram submetidos a 4 semanas de tratamento, da semana 12-16 semanas de vida, com dois tipos de antioxidantes e um antagonista do receptor de angiotensina II, na água de beber. A enzima superóxido dismutase cataliza a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo um importante antioxidante natural. A enzima NAD(P)H oxidase efetivamente reduz O_2 em $O_2^{\cdot-}$. Assim, para averiguar a participação do estresse oxidativo no remodelamento de artérias mesentéricas em diabetes do tipo 2 os animais foram tratados com um mimético da superóxido dismutase, ou seja, um varredor de radical livre permeável a membrana (Tempol, 1 mM) e com um inibidor da NAD(P)H oxidase (Apocinina, 5 mM) (Kawai *et al.*, 2004; Elmarakby *et al.*, 2005). Vários ensaios clínicos demonstraram efeitos benéficos dos bloqueadores do receptor AT-1 e dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) no desenvolvimento e progressão de complicações cardiovasculares em diabetes tipo 2 (Leiter e Lewanczuk, 2005). Sabe-se também que a hiperglicemia crônica induz a formação de AGEs, sistema renina-angiotensina (SRA), e citocinas inflamatórias, que todos eles são determinantes importantes de remodelamento vascular. Esses fatores estão aumentados em diabetes tipo 2 e estão relacionados com aumento de estresse oxidativo. Devido a estes fatos, a participação da angiotensina II também foi avaliada neste estudo através da utilização de um inibidor do receptor de angiotensina II, receptor AT-1 (Candesartan Cilexetil, 1 mg / kg / dia) (Shao *et al.*, 2006). Ao final dos tratamentos os animais foram submetidos ao protocolo experimental citado anteriormente (3.4.2.). Os animais foram divididos nos seguintes grupos em um N=8 por grupo:

C – Controles não tratados, heterozigotos Db/db.
db – Diabéticos não tratados, homozigotos db/db.
TC – Controles tratados com Tempol, heterozigotos Db/db.
Tdb – Diabéticos tratados com Tempol, homozigotos db/db.
AC – Controles tratados com Apocinina, heterozigotos Db/db.
Adb – Diabéticos tratados com Apocinina, homozigotos db/db.
CANC – Controles tratados com Candesartan, heterozigotos Db/db.
CANdb – Diabéticos tratados com Candesartan, homozigotos db/db.

3.5. Análise histológica das artérias mesentéricas

Os camundongos foram anestesiados com a combinação de ketamina (200 mg/kg, i.p.) e xylazina (10 mg/kg) administrados via intraperitoneal; o mesentério foi extraído e as artérias mesentéricas foram cuidadosamente dissecadas e mantidas em formalina 10 % até que fossem preparadas em blocos de parafina. Através do uso de um micrótomo os blocos foram seccionados a 6 μ m, transferidos para laminas de vidro e subseqüentemente coradas com hematoxilina e eosina (HE) para visualização de propriedades estruturais. A análise histológica foi realizada através do uso do microscópio Olympus Microsuite 5 .

3.6. Medidas de estresse oxidativo por ressonância eletroparamagnética espectroscópica (EPR ou ESR)

Ressonância eletro paramagnética (EPR) ou ressonância por rotação de elétron (ESR) é uma técnica usada para medir espécies reativas de oxigênio. O conceito físico básico da técnica de espectroscopia paramagnética é análogo a espectroscopia de ressonância nuclear magnética mas a diferença é que essa técnica estuda espécies químicas que tem um ou mais elétrons não pareados, como radicais livres e a espectroscopia magnética é utilizada em moléculas estáveis, ou seja, sem elétrons não pareados. Como os radicais livres são muito reativos eles não estão em altas concentrações em ambientes biológicos. Para isso antes de medir os elétrons não pareados é necessário usar um marcador (spin trap). Este é um dos métodos mais definitivos e sensitivos para a detecção de $O_2^{\cdot-}$ (Zhang *et al.*, 2000). Como marcador 1-hidroxi-3-methoxycarbonil-2,2,5,5-tetrametilpyrrolidina

(CMH) foi usado (Dikalov *et al.*, 2007). As artérias mesentéricas foram incubadas com 10 mM de CMH por 15 minutos a temperatura de 37 °C. As medidas de EPR (e-scan, Bruker, Karlsruhe, Germany) foram obtidas quando a oxidação do marcador CMH por espécies reativas de oxigênio formou um radical nitróxido estável e CM_•. A quantidade de nitróxido formado significa a quantidade de espécies reativas de oxigênio que foram formadas (Kuzkaya *et al.*, 2003).

3.7. Medidas de expressão protéica de MMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2, PAI-1 e TGF- β através da técnica de Western blot

Para a realização deste protocolo em torno de 12-16 leitões mesentéricos, para cada grupo, foram extraídos e todas as artérias do mesentério foram cuidadosamente isoladas, colocadas juntas em um tubo de eppendorff e congeladas a - 80 °C. As artérias foram descongeladas e homogeneizadas com 10 ml de solução tampão contendo 25 mM Hepes (pH 7,4), 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 10 mM Na- pirofosfato, 10 mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 0,1 % Triton X 100 e 0,1 % Deoxicolato de sódio misturados a 10 μ g / ml Aprotinina, 10 μ g / ml Leupeptina, 0,5 mM PMSF e 500 μ g Na₃VO₄. Foi adicionado ao tubo de mesentéricas 150 μ l da solução acima para homogeneização e então eles foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 14000 RPM e o sobrenadante foi retirado. A concentração total de proteína de cada amostra foi determinada usando *bicinchoninic acid assay* (BCA - Pierce Biotechnology) onde a concentração total de proteína foi exibida por mudança de cor na amostra de verde a roxo, na proporção da concentração de proteína, que pode ser medida usando técnica colorimétrica (Smith *et al.*, 1985).

3.7.1. Eletroforese e transferência das amostras

Quantidades iguais de proteína total para cada amostra (40 μ g) foram separadas em géis prontos 4-15 % (Tris-HCl, 50 μ l, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA) sódio dodecil sulfato-poliacrilamida gel (SDS-PAGE) e então transferidas eletroforéticamente para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (Imunn-Blot PVDF, Transfer Membrane, BIO-RAD), previamente ativada com

metanol. Para isso alíquotas das amostras de proteínas foram diluídas em água deionizada e solução tampão Laemmli 6x contendo 300 mM Tris – HCl (pH 6,8), 12 % SDS, 60 % Glicerol, 12 % de β – mercaptoetanol e 0,05 % Azul de Bromofenol totalizando um volume final de 42 μ l. As amostras foram então aquecidas a 100 °C em um prato aquecedor (Fisher Scientific) por 5 minutos, colocadas em gelo por 3 minutos para resfriarem e aplicadas no gel pronto SDS-PAGE (4-15 %) em um sistema mini protean tetra cell (BIO-RAD) contendo solução de eletroforese (25mM Tris, 192 mM glicina e 0,1 % SDS – pH 8,3). Inicialmente foi aplicada uma corrente de 30 V (Power Pac Basic, BIO-RAD) até que as amostras deixassem completamente as cavidades e então 60 V até que as amostras passassem completamente 1 cm abaixo do fim das cavidades e finalmente 90 V até que as amostras corressem todo o gel. Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma membrana PVDF em um sistema de sanduíche imerso em um mini trans-blot cell (BIO-RAD) contendo solução de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina e 20 % Metanol – pH 8,3). O mini trans-blot cell foi então colocado em um balde contendo gelo e a transferência foi feita durante 1 hora a 100V.

3.7.2. Bloqueio e incubação com anticorpos, detecção e análise das subunidades

É importante bloquear os sítios não reativos da membrana para reduzir a quantidade de ligações não específicas durante as seguintes fases do ensaio. As membranas foram bloqueadas por 1 hora, a temperatura ambiente em um agitador a 80 RPM (Rocking Plataform, BIO-RAD) com 5 % Caseína, 5 % Soroalbumina bovina (BSA) ou 5 % de leite em pó em solução salina 1 x TBS (50 mM Tris e 100 mM NaCl) contendo 0,5 % Tween 20 (TBS-T) ou solução salina 1 x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄) contendo 0,5 % Tween 20 (PBS-T), dependendo da proteína analisada. As membranas foram enxaguadas durante 5 minutos por 4 vezes com TBS-T ou PBS-T e incubadas durante a noite com os anticorpos primários no agitador a 4 °C. Os anticorpos primários usados neste estudo foram anti-MMP-2, 1:200 (Chemicon), anti-MMP-9, 1:2000 (Chemicon), anti-MMP-12, 1:200 (Santa Cruz), anti-TIMP-1, 1:200 (Chemicon), anti-TIMP-2, 1:200 (Chemicon), anti-PAI-1, 1:1000 (Transduction Laboratórios), anti-TGF- β , 1:1000 (Calbiochem) e anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 1:1000)

(AbCam) como fator de correção das expressões proteicas investigadas. As membranas foram então enxaguadas durante 5 minutos por 4 vezes com TBS-T ou PBS-T e incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários no agitador. Foram usados anti-camundongo (anti-mouse, 1:2000), anti-coelho (anti-rabbit, 1:2000) (Amersham Biosciences, UK) e anti-cabra (anti-goat, 1:2000) (Santa Cruz). As membranas foram então enxaguadas durante 5 minutos por 4 vezes com TBS-T ou PBS-T e incubadas por 5 minutos em Quimiluminescência (ECL, Amersham Biosciences, UK) que permitiu a detecção das bandas por reação de quimiluminescência. As imagens foram capturadas usando Molecular Imager VersaDoc Imaging Systems (BIO-RAD) e analisadas densitometricamente usando o programa Geleval (versão 1.04, Frogdance Software, 2005). A quantificação da proteínas foi expressa relativamente à quantidade de GAPDH que foi usado no mesmo gel após um processo de limpeza, onde a ação do primeiro anticorpo foi cancelada através do uso de Restore stripping buffer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) por 1 hora e enxaguado por 10 minutos por 2 vezes com PBS e todo o processo foi repetido mas o anticorpo primário usado foi o GAPDH.

3.8. Expressão dos dados e análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Os resultados das respostas de relaxamento induzidos pela acetilcolina são expressos como porcentagem de relaxamento induzida por este fármaco. Essas respostas foram avaliadas a partir do valor de tensão atingido durante o platô da pré-contracção com fenilefrina, sendo este considerado 100% de contracção. A partir deste dado, as respostas vasodilatadoras a acetilcolina foram expressas como porcentagem de contracção residual.

A análise estatística dos dados foi realizada por teste *t* de Student, não pareado, e análise de variância (ANOVA) de uma via, para medidas repetidas ou completamente randomizada, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5 Software (San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.9. Fármacos e reagentes utilizados

- 1-hydroxi-3-methoxycarbonil-2,2,5,5-tetrametilpyrrolidina (CMH) (Alexis)
- acetilcolina, cloridrato de (Sigma)
- álcool etílico (Reagen)
- ácido etilenoglicoltetraacético (EGTA) (Sigma)
- apocinina (Sigma)
- aprotinina (Sigma)
- azul de bromofenol (Sigma)
- beta-mercaptoetanol (Sigma)
- bicarbonato de sódio (Sigma)
- Candesartan Cilexetil (Takeda)
- cloreto de cálcio dihidratado (Sigma)
- cloreto de manganês (Fisher)
- cloreto de potássio (Fisher)
- cloreto de sódio (Fisher)
- deoxicolato de sódio (Sigma)
- éter etílico (Merck)
- formaldeído (Carl Roth)
- fosfato de monopotássio (Fisher)
- fosfato dihidrogenio de sódio (Sigma)
- fosfato disódico (Sigma)
- fluoreto de sódio (Sigma)
- glicerol (Sigma)
- glicose (Sigma)
- hepes (Fisher)
- ketanest (S-ketamine) (Parke-Davis)
- leite em pó (Nestle)
- leupeptina (Sigma)
- l-fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- metanol (Reagen)
- nitroprussiato de sódio, dihidratado (Sigma)
- pirofosfato de sódio (Sigma)
- PMSF (Sigma)

- reagente A e B para BCA (Pierce)
- sódio ortivanadante (Sigma)
- soroalbumina bovina (Sigma)
- sulfato de magnésio heptahidratado (Sigma)
- sulfato de manganês heptahidratado (Fisher)
- sulfato de sódio dodecil (Sigma)
- Tempol (Sigma)
- timerosal (Sigma)
- tween 20 (Sigma)
- Tris Base (Fisher)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (Fisher)
- triton X 100 (Fisher)
- restore stripping buffer (Pierce)
- xilazina, hidrocloreto (Sanofi/Ceva)

IV. Resultados

4.1. Resposta vasoconstritora à fenilefrina e resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina

Sob pressão de 50 mm Hg a fenilefrina diminuiu o diâmetro interno do terceiro ramo da artéria mesentérica em todos os grupos estudados, porém, não houve diferenças na porcentagem de contração entre os grupos.

A integridade endotelial do vaso foi avaliada através do relaxamento induzido pela acetilcolina (1 mmol / l). Na artéria mesentérica de resistência de todos os grupos, a acetilcolina foi capaz de reduzir a contração induzida pela fenilefrina. No entanto, não se observou alteração estatisticamente significativa dessa resposta de relaxamento nas artérias dos animais dos grupos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético (Tabela 1).

Tabela 1: Valores da porcentagem de contração à fenilefrina e relaxamento a acetilcolina nos grupos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético.

	Phe (%)	ACh (%)
Controle	23,8 ± 1,7	91,4 ± 3,8
Tempol Controle	23,3 ± 4,0	91,1 ± 5,3
Apocinina Controle	20,4 ± 0,9	95,1 ± 12,8
Candesartan Controle	22,5 ± 3,8	92,4 ± 6,3
Diabético	23,9 ± 4,7	101,5 ± 5,5
Tempol Diabético	23,1 ± 3,6	79,2 ± 4,3
Apocinina Diabético	23,0 ± 2,0	79,8 ± 5,2
Candesartan Diabético	22,4 ± 2,2	81,7 ± 5,4

Os valores representam as médias ± EPM. Os dados foram comparados por ANOVA (1 via) seguido de teste Tukey. Não houve diferenças significativas entre as médias ($p > 0,05$).

4.2. Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca

Usando um probe de telemetria a pressão arterial e frequência cardíaca foram monitoradas em camundongos conscientes e em movimento livre. As medidas de pressão arterial média e frequência estão representadas na Tabela 2. Os grupos foram divididos em Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético Controles, Diabéticos, Tempol Diabéticos e Apocinina Diabéticos. Para os grupos Controle e Diabético 6 animais foram utilizados para as medidas e para os grupos restantes 3 animais foram utilizados devido à disponibilidade de probes de pressão arterial. Não foi possível a realização de inserção do probe de telemetria nos animais do grupo Candesartan Diabéticos, pois a pressão arterial com 2 semanas de tratamento com o bloqueador dos receptores AT-1 para angiotensina II já estava bastante reduzida e os animais não resistiam à cirurgia.

Apos 7 dias de monitoramento a pressão arterial média não diferiu entre os grupos. A frequência cardíaca por sua vez estava reduzida nos animais diabéticos em comparação com o grupo controle. Os animais tratados com tempol e apocinina não diferiram significativamente dos outros grupos.

Tabela 2: Valores da pressão arterial média (mm Hg) e frequência cardíaca (bpm) dos camundongos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético.

	PAM (mm Hg)	FC (bpm)
Controle	115,7 ± 2,7	537,4 ± 11,7
Tempol Controle	117,0 ± 3,0	546,3 ± 18,3
Apocinina Controle	119,4 ± 8,0	533,6 ± 13,2
Diabético	114,2 ± 1,7	477,0 ± 17,7 *
Tempol Diabético	117,0 ± 0,6	519,6 ± 2,6
Apocinina Diabético	128,7 ± 8,47	476,1 ± 8,3

Os valores representam as médias ± EPM. Os dados foram comparados por ANOVA (1 via) seguido de teste Tukey, * p<0,05.

4.3. Medidas de glicose sanguínea e peso corporal

A glicose sanguínea foi medida usando um medidor de glicose portátil. O peso corporal foi quantificado previamente a cada experimento. Os grupos foram divididos em Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético. Com 16 semanas de idade todos os animais diabéticos (tratados e não tratados) apresentaram significativo aumento do peso corporal e glicose sanguínea, o que é esperado que ocorra nesses animais desde 4 semanas de idade. O tratamento com os antioxidantes Tempol e Apocinina e com o bloqueador do receptor AT-1 Candesartan não foram capazes de reduzir o peso corporal e níveis de glicose dos animais diabéticos (Tabela 3).

Tabela 3: Glicose sanguínea (mg / dl) e peso corporal (g) dos camundongos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético.

	Glicose sanguínea (mg / dl)	Peso Corporal (g)
Controle	128,4 ± 10,2	29,7 ± 0,4
Tempol Controle	142,8 ± 8,3	31,1 ± 0,9
Apocinina Controle	127,0 ± 10,1	30,3 ± 0,4
Candesartan Controle	131,2 ± 12,2	30,4 ± 0,8
Diabético	506,1 ± 35,6 ***	55,6 ± 1,0 ***
Tempol Diabético	533,3 ± 26,8 ***	53,9 ± 0,8 ***
Apocinina Diabético	560,2 ± 25,8 ***	56,3 ± 1,4 ***
Candesartan Diabético	500,8 ± 27,0 ***	54,7 ± 0,8 ***

Os valores representam as médias ± EPM. ANOVA (1 via) seguida de teste Tukey. *** p < 0,001 quando os animais diabéticos foram comparados com os seus respectivos controles.

4.4. Medidas na artéria mesentérica de resistência através do uso do miógrafo de pressão

As medidas das propriedades estruturais e mecânicas do terceiro ramo das artérias mesentéricas de camundongos foram realizadas em condições de completo relaxamento (meio extracelular livre de Ca^{2+}) e sob condições passivas do músculo liso (adição de EGTA + SNP). Tanto diâmetros interno e externo foram medidos durante os experimentos, bem como a espessura de parede. A partir dessas medidas e através do uso de formulas previamente descritas foi possível a quantificação de outros parâmetros, como: 1) Relação Média / Lúmem (Relação M/L); 2) Área da Camada Média (ACM); 3) Complacência; 4) Distensibilidade; 5) Tensão de Parede, 6) Estresse de Parede e 7) Relação Stress-Strain.

4.4.1. Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmem dos animais diabéticos e não diabéticos

Sob condições passivas da artéria mesentérica de resistência o diâmetro interno dos animais diabéticos se mostrou significativamente maior, nas pressões impostas, do que dos animais controles (Tabela 4; Figura 5A). O mesmo ocorreu com o diâmetro externo (Tabela 4; Figura 5B). O aumento do diâmetro externo nos animais diabéticos ocorreu em conseqüência do aumento do diâmetro interno pois a espessura de parede não foi alterada entre os grupos em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 4; Figura 5C). Em conseqüência de um maior diâmetro interno apresentado pelos animais diabéticos e inalteração na espessura de parede, a relação média / lúmem se mostrou reduzida nos animais diabéticos em comparação com os animais do grupo controle nas pressões 25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg. Foram utilizados 8 animais por grupo.

Com a finalidade de uma análise qualitativa e visualização de propriedades estruturais as artérias mesentéricas de resistência foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) como mostradas nas Figuras 5E e 5F.

Tabela 4: Valores de diâmetros interno e externo (μm), espessura de parede (μm) e relação média lúmem no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Controle e Diabético sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Diâmetro Interno		Diâmetro Externo	
	C	db	C	db
25	50,3 \pm 2,7	73,1 \pm 3,5 ***	86,6 \pm 3,8	110,3 \pm 3,0 ***
50	68,7 \pm 4,1	104,0 \pm 4,8 ***	102,5 \pm 5,1	138,2 \pm 4,6 ***
75	77,8 \pm 5,5	120,6 \pm 5,5 ***	110,3 \pm 6,4	153,1 \pm 5,2 ***
100	81,8 \pm 6,0	127,7 \pm 5,8 ***	113,3 \pm 6,5	158,2 \pm 5,5 ***
125	85,1 \pm 6,4	130,0 \pm 6,0 ***	116,12 \pm 6,8	159,7 \pm 5,7 ***

Pressão	Espessura de Parede		Relação M/L	
	C	db	C	db
25	18,1 \pm 0,8	18,6 \pm 0,5	36,4 \pm 2,0	26,0 \pm 1,9 **
50	16,8 \pm 0,7	17,1 \pm 0,4	24,9 \pm 1,3	16,7 \pm 0,9 ***
75	16,2 \pm 0,7	16,2 \pm 0,4	21,3 \pm 1,1	13,7 \pm 0,8 ***
100	15,7 \pm 0,6	15,2 \pm 0,5	19,8 \pm 1,3	12,1 \pm 0,8 ***
125	15,5 \pm 0,5	14,8 \pm 0,3	18,8 \pm 1,3	11,6 \pm 0,6 ***

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo Diabético foi diferente do grupo Controle nas pressões citadas.

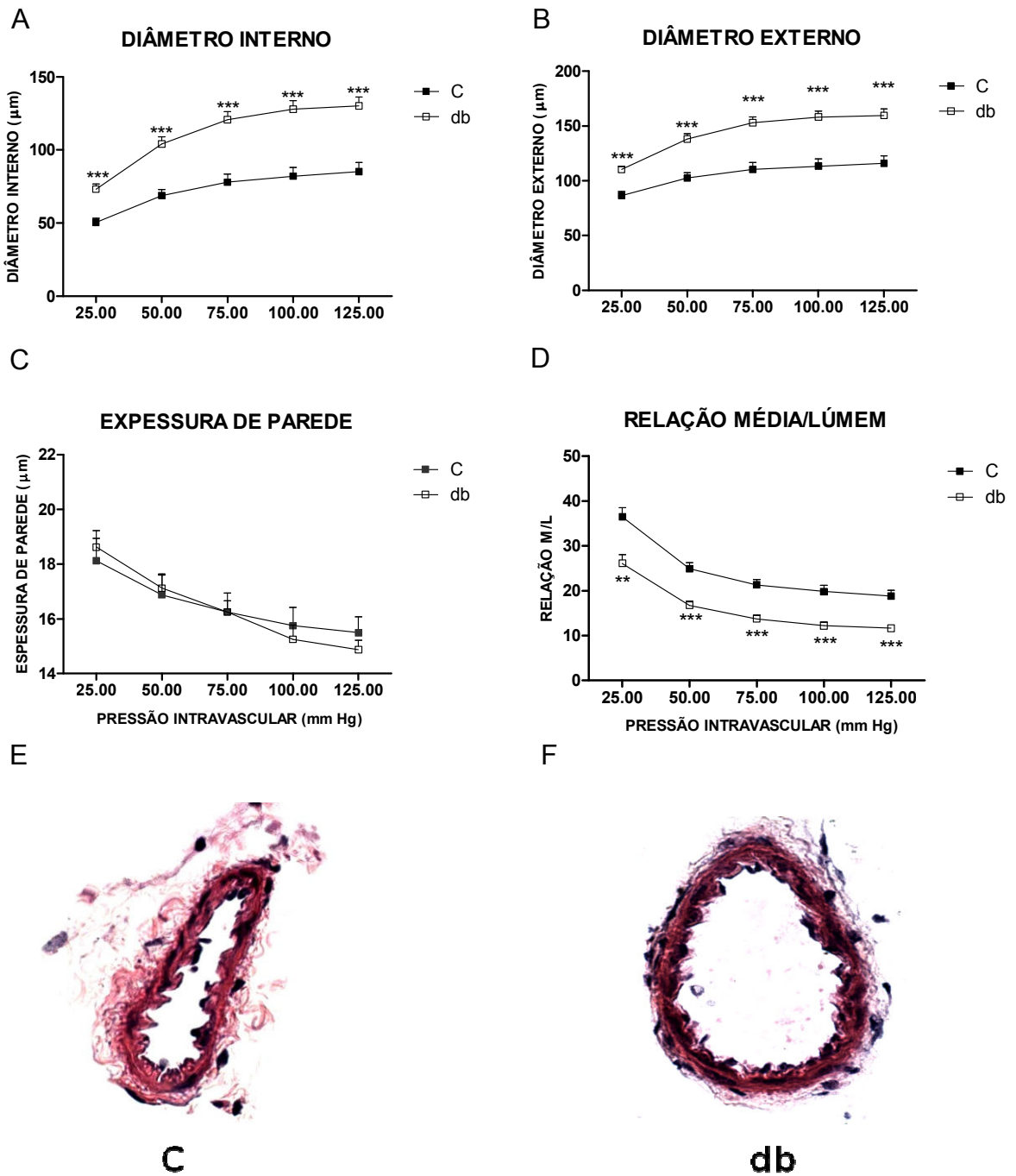


Figura 5: Medidas de diâmetros interno (A) e externo (B) (μm), espessura de parede (C) (μm) e relação média/lúmem (D) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C - quadrados cheios) e diabéticos (db - quadrados vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. Teste t de Student não pareado, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N=8 animais por grupo. Fotomicrografia representativa de artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C - esquerda) (E) e diabéticos (db - direita) (F) corados com hematoxilina-eosina.

4.4.2. Medidas de área da camada média, complacência e Distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos

Para avaliar se as artérias mesentéricas de resistência dos animais do grupo diabético possuíam algum tipo de remodelamento a área da camada média foi avaliada. A área da camada média das artérias dos animais diabéticos se mostraram significativamente maior do que no grupo controle (Tabela 5; Figura 6A) mesmo sem nenhuma diferença da espessura de parede. Juntamente com o aumento do diâmetro interno o aumento da área da camada média caracteriza remodelamento hipertrófico externo do vaso (Mulvany *et al*, 1996). A complacência da artéria mesentérica em função da pressão intravascular esta representada na Tabela 5; Figura 6B. A complacência estava significativamente aumentada no grupo diabético e os valores de complacência foram diminuindo gradativamente à medida que altas pressões foram aplicadas. As medidas de Distensibilidade por sua vez, não se mostraram diferentes entre os grupos controle e diabético em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 5; Figura 6C).

Tabela 5: Valores da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e Distensibilidade (mm Hg^{-1}) no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Controle e Diabético sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Área da Camada Média		Complacência	
	C	db	C	db
25	3937,5 ± 332,0	5350,1 ± 192,7**	81,4 ± 9,1	170,8 ± 16,5 ***
50	4589,0 ± 417,7	6508,2 ± 282,4**	70,8 ± 11,6	174,1 ± 19,0 ***
75	4860,4 ± 464,6	6972,3 ± 272,1**	45,0 ± 12,6	118,9 ± 11,9 ***
100	4866,3 ± 437,9	6829,0 ± 288,2**	21,3 ± 4,3	56,4 ± 0,0 **
125	4932,6 ± 429,4	6754,8 ± 262,7**	17,9 ± 4,7	18,6 ± 3,6

Pressão	Distensibilidade	
	C	db
25	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0
50	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,0
75	0,008 ± 0,002	0,01 ± 0,0
100	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001
125	0,001 ± 0,001	0,0 ± 0,0

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo Diabético foi diferente do grupo Controle nas pressões citadas.

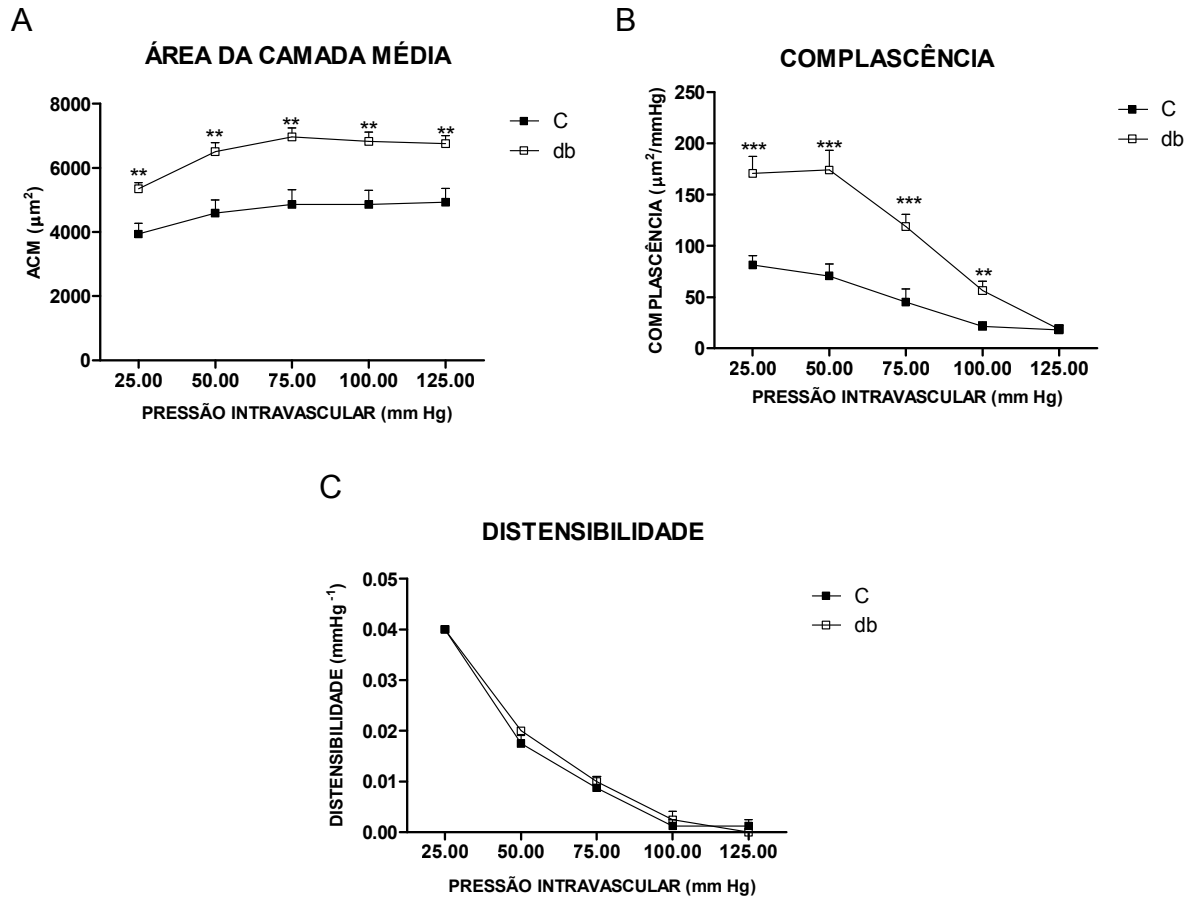


Figura 6: Medidas da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e Distensibilidade (mm Hg^{-1}) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C - quadrados cheios) e diabéticos (db - quadrados vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. Teste t de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. N=8 animais por grupo.

4.4.3. Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos

A tensão de parede estava significativamente maior nos animais diabéticos quando comparados com os controles em todas as pressões estudadas (Tabela 6; Figura 7A). O mesmo ocorreu com o estresse de parede nas pressões 25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg que foi aumentado à medida que as pressões foram aumentadas (Tabela 6; Figura 7B). Quando o estresse de parede (dinas / cm²) foi examinado em função do strain a curva stress/strain se mostrou deslocada para a direita nas artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos, indicando menos rigidez apresentada pelos animais diabéticos quando comparados com os animais controles (Tabela 6; Figura 7C).

Tabela 6: Valores de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Controle e Diabético sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Tensão de Parede		Estresse de Parede	
	C	db	C	db
25	629,6 ± 34,9	914,0 ± 44,7 ***	34,9 ± 1,7	49,7 ± 3,43 **
50	1718,7 ± 103,6	2600,0 ± 120,8 ***	102,5 ± 4,9	152,9 ± 16,2 ***
75	2920,3 ± 209,0	4523,4 ± 207,3 ***	179,8 ± 10,5	280,4 ± 16,2 ***
100	4093,7 ± 303,9	6387,5 ± 292,7 ***	261,1 ± 18,7	423,9 ± 27,1 ***
125	5220,3 ± 401,3	8125,0 ± 376,4 ***	343,9 ± 24,0	549,9 ± 32,2 ***

Pressão	Relação Stress/Strain			
	Stress ($\times 10^6$ dinas/cm ²)		Strain ($\Delta D_i/D_0$)	
	C	db	C	db
25	0,046 ± 0,002	0,066 ± 0,004	0,175 ± 0,012	0,323 ± 0,042
50	0,136 ± 0,006	0,203 ± 0,011	0,607 ± 0,047	0,882 ± 0,051
75	0,239 ± 0,014	0,373 ± 0,021	0,816 ± 0,079	1,182 ± 0,058
100	0,348 ± 0,024	0,565 ± 0,036	0,907 ± 0,091	1,316 ± 0,080
125	0,458 ± 0,032	0,733 ± 0,042	0,983 ± 0,092	1,356 ± 0,081

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo Diabético foi diferente do grupo Controle nas pressões citadas.

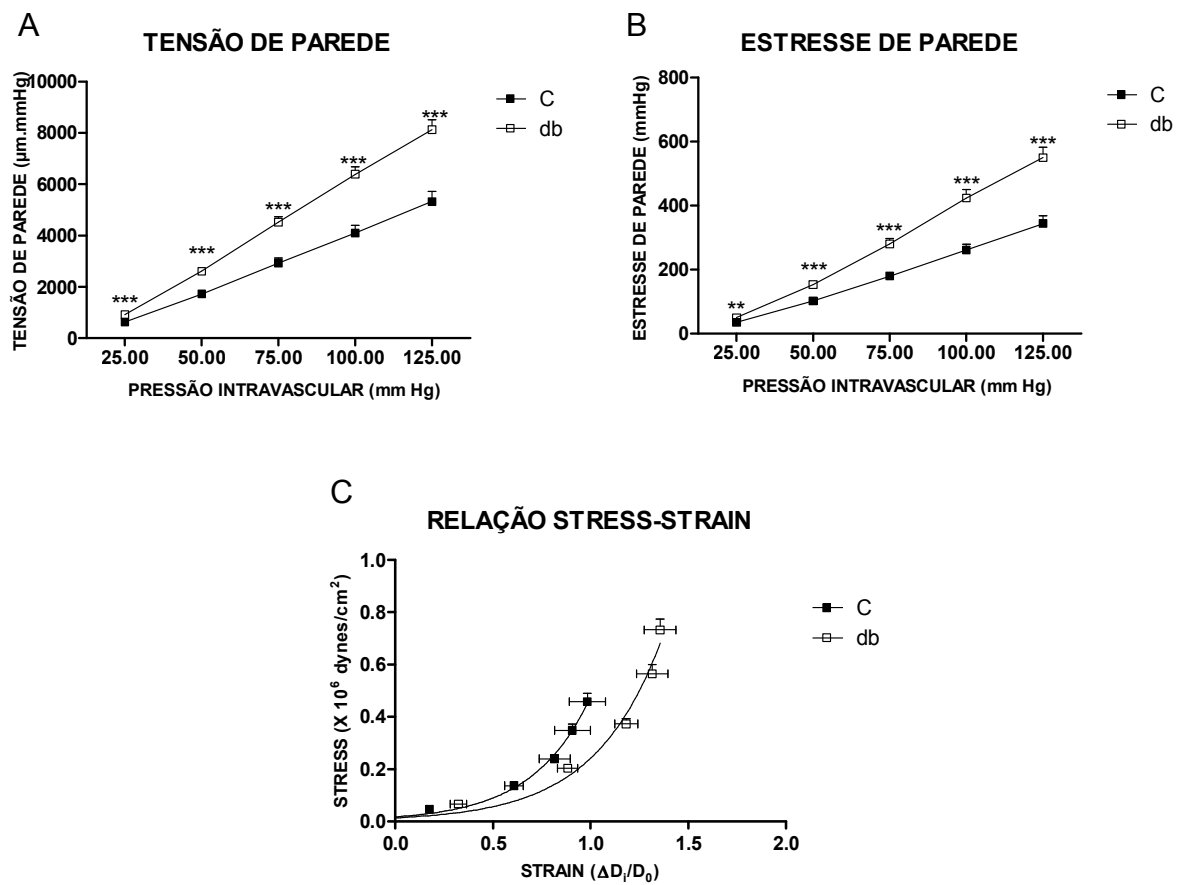


Figura 7: Medidas de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média ($\times 10^6$ dinas/cm²) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C - quadrados cheios) e diabéticos (db - quadrados vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. Teste t de Student não pareado, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N=8 animais por grupo.

4.4.4. Efeito da ação do estresse oxidativo e angiotensina II sobre as propriedades estruturais e mecânicas do terceiro ramo das artérias mesentéricas de camundongos diabéticos e não diabéticos

Para identificar a ação do estresse oxidativo sobre o remodelamento nas artérias mesentéricas de resistência dos animais diabéticos e não diabéticos os animais foram tratados com dois tipos de antioxidantes. Primeiramente os animais foram tratados com um mimético da superóxido dismutase, ou seja, um varredor de radical livre permeável a membrana (Tempol, 1 mM) e posteriormente com um inibidor da NAD(P)H oxidase (Apocinina, 5 mM). Para analisar a ação da angiotensina II nas artérias mesentéricas de resistência os animais diabéticos e não diabéticos foram tratados com um inibidor do receptor de angiotensina II, receptor AT-1 (Candesartan Cilexetil, 1 mg /kg /dia) durante 4 semanas na água de beber. Todos os experimentos foram realizados quando os animais estavam com 16 semanas de vida.

4.4.4.1. Medidas dos níveis de estresse oxidativo nos animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com antioxidantes

Antes de medir as ações dos antioxidantes no remodelamento em animais diabéticos e não diabéticos os tecidos das artérias mesentéricas de resistência foram submetidos à ressonância eletroparamagnética (EPR) para que as espécies reativas de oxigênio fossem medidas através do marcador CMH. As medidas foram realizadas nas artérias mesentéricas de resistência do animais dos grupos Controle (C), Diabético (db), Tempol Diabético (Tdb) e Apocinina Diabético (Adb). Como mostra a Figura 8 os animais do grupo Diabético (8B) apresentaram aumento das espécies reativas de oxigênio quando comparados com o grupo Controle (8A). O aumento de estresse oxidativo apresentados pelos animais diabéticos foi reduzido pelos os tratamentos com Tempol (8C) e Apocinina (8D).

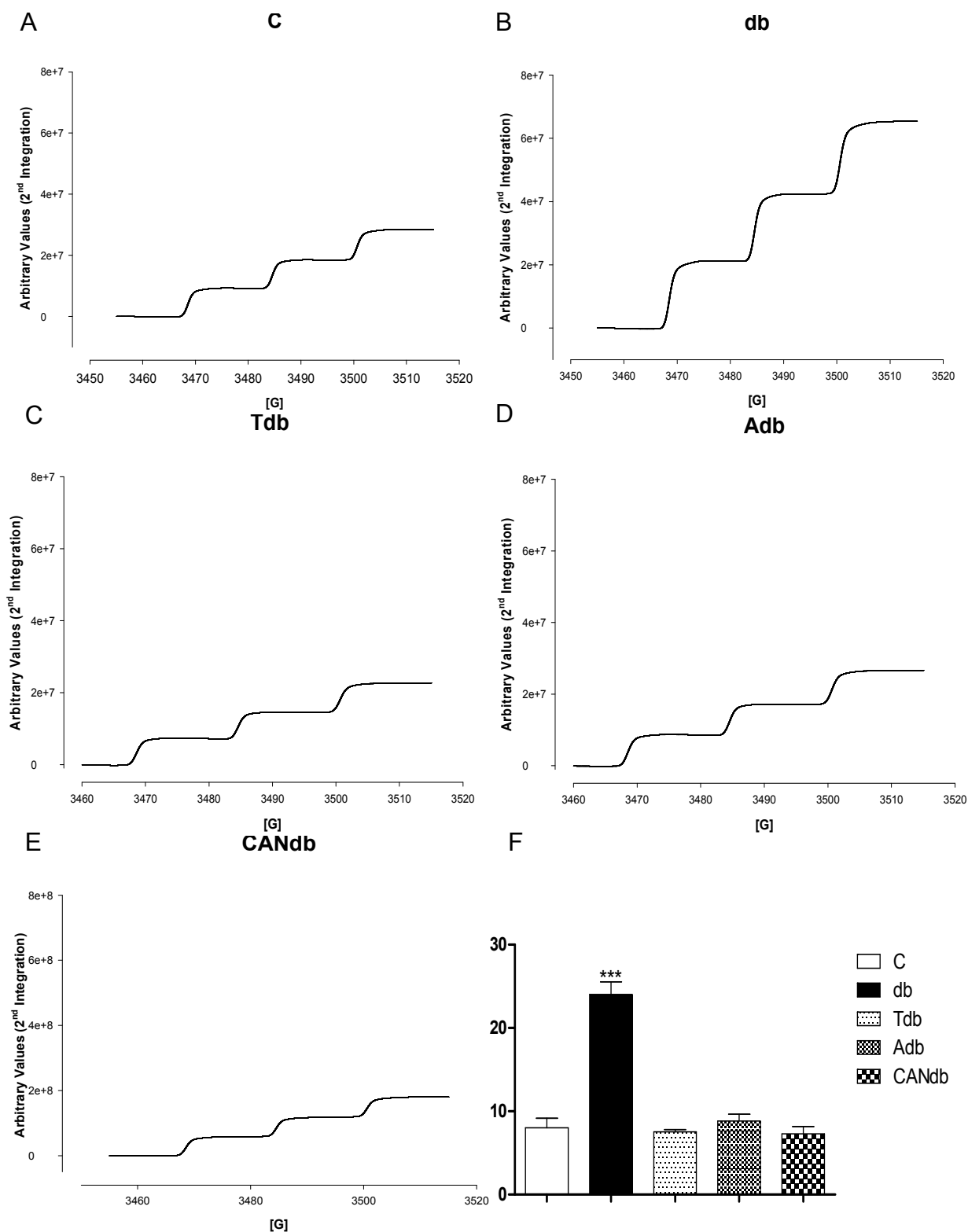


Figura 8: Medidas de estresse oxidativo por EPR através do uso do marcador CMH em tecidos de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles – C (A), diabéticos – db (B), Tempol Diabético– Tdb (C), Apocinina Diabético– Adb (D) e Candesartan Diabético– Adb (E). Em F valores numéricos dos grupos expressos em Média ± EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, *** $p < 0,001$ quando o grupo diabético foi comparado com todos os outros grupos.

4.4.4.2. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o antioxidante Apocinina

4.4.4.2.1. Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmem dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina

Apos 4 semanas de tratamento com o inibidor da NAD(P)H oxidase Apocinina as respostas produzidas pelo grupo Apocinina Controle não foram significativamente diferentes das respostas apresentadas pelo grupo Controle (Tabela 4) e as respostas do grupo Apocinina Diabético foram de mesma magnitude das do grupo Diabético (Tabela 4) para os parâmetros diâmetro interno e externos, espessura de parede e relação média/lúmem em todas as pressões estudadas. Os resultados nos mostraram que a redução do estresse oxidativo com o tratamento com Apocinina não afetou o aumento dos diâmetros internos e externos e a redução da relação média/lúmem apresentados pelo grupo Diabético pois as mesmas respostas produzidas pelos grupos Controle e Diabético foram apresentadas pelo grupo Apocinina Controle e Apocinina Diabético (Tabela 7; Figura 9). Foram utilizados 8 animais por grupo.

Tabela 7: Valores de diâmetros interno e externo (μm), espessura de parede (μm) e relação média lúmen no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Apocinina Controle (AC) e Apocinina Diabético (Adb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Diâmetro Interno		Diâmetro Externo	
	AC	Adb	AC	Adb
25	52,2 \pm 2,6	67,0 \pm 2,6 **	89,2 \pm 2,6	104,0 \pm 3,3 **
50	70,7 \pm 4,4	92,1 \pm 4,2 **	104,2 \pm 4,7	125,6 \pm 4,1 **
75	81,0 \pm 4,6	105,2 \pm 4,6 **	113,0 \pm 4,9	137,5 \pm 4,6 **
100	86,6 \pm 5,3	112,3 \pm 4,6 **	117,5 \pm 5,5	143,6 \pm 4,8 **
125	89,5 \pm 5,4	117,0 \pm 4,8 **	120,2 \pm 5,7	146,5 \pm 4,9 **

Pressão	Espessura de Parede		Relação M/L	
	AC	Adb	AC	Adb
25	18,5 \pm 0,5	18,5 \pm 0,6	36,0 \pm 2,1	27,8 \pm 1,2 **
50	16,7 \pm 0,5	16,7 \pm 0,2	24,2 \pm 1,6	18,4 \pm 0,9 **
75	16,0 \pm 0,5	16,1 \pm 0,3	20,1 \pm 1,0	15,5 \pm 0,7 **
100	15,5 \pm 0,3	15,6 \pm 0,2	18,3 \pm 1,1	14,0 \pm 0,5 **
125	15,3 \pm 0,3	14,7 \pm 0,2	17,5 \pm 0,9	12,7 \pm 0,5 ***

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo Apocinina Diabético foi diferente do grupo Apocinina Controle nas pressões citadas.

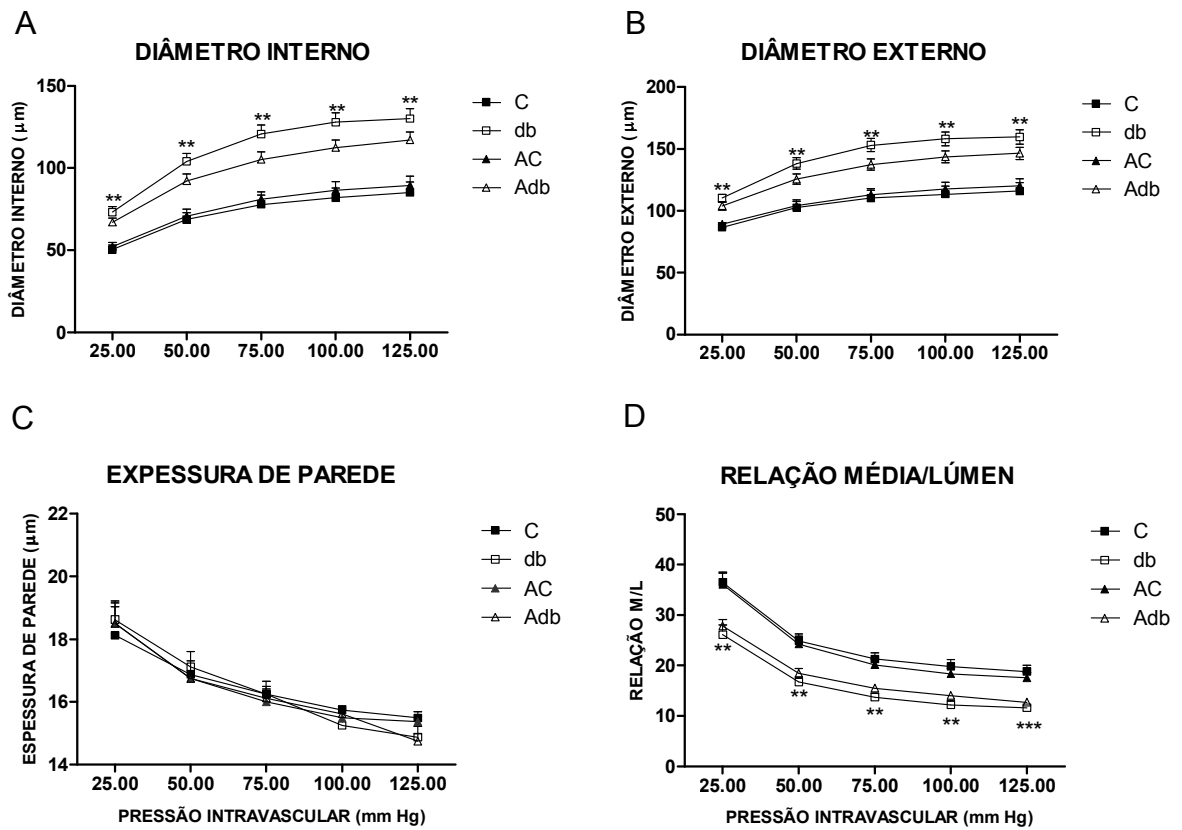


Figura 9: Medidas de diâmetros interno (A) e externo (B) (μm), espessura de parede (C) (μm) e relação média/lúmen (D) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Apocinina Controle (AC - triângulos cheios) e Apocinina Diabético (Adb - triângulos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para as diferenças entre AC e Adb. $N=8$ animais por grupo.

4.4.4.2.2. Medidas de área da camada média, complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina

Para saber se o tratamento com Apocinina estaria afetando o remodelamento hipertrófico externo dos diabéticos a área da camada média das artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos Apocinina Controle e Apocinina Diabético foi avaliada. A área da camada média das artérias do grupo Apocinina Diabético apresentaram significante aumento em todas as pressões estudadas quando comparadas com o grupo Apocinina Controle (Tabela 8; Figura 10A) e esses valores também não diferiram dos grupos Controle e Diabético (Tabela 5). A complacência da artéria mesentérica em função da pressão intravascular se apresentou aumentada no grupo Apocinina Diabético em relação ao grupo Apocinina Controle nas pressões intravasculares de 25, 50, 75 e 125 mm Hg mas não na pressão de 100 mm Hg (Tabela 8; Figura 10B), entretanto não diferenças entre os grupos Apocinina Controle e Controle nem dos grupos Apocinina Diabético e Diabético (Tabela 5). As medidas de distensibilidade não se mostraram diferentes entre os grupos Apocinina Controle e Apocinina Diabético em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 8; Figura 10C) e nem entre esses grupos e os correspondentes Controle e Diabético (Tabela 5).

A redução do estresse oxidativo pela inibição da NAD(P)H oxidase não foi capaz de normalizar a área da camada média e a complacência que estavam aumentadas nos animais diabéticos mas manteve a distensibilidade inalterada entre os grupos.

Tabela 8: Valores da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e distensibilidade (mm Hg^{-1}) no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Apocinina Controle (AC) e Apocinina Diabético (Adb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Área da Camada Média		Complacência	
	AC	Adb	AC	Adb
25	4113,1 ± 198,3	4990,4 ± 303,4 *	87,2 ± 8,7	142,6 ± 11,5 **
50	4620,1 ± 318,5	5725,1 ± 219,2 *	74,3 ± 14,4	127,8 ± 16,2 *
75	4895,7 ± 331,1	6150,8 ± 266,0 *	49,1 ± 9,3	82,1 ± 9,5 *
100	4978,6 ± 312,4	6291,8 ± 276,9 **	30,4 ± 5,5	48,8 ± 10,0
125	5081,5 ± 327,1	6111,1 ± 270,3 *	17,0 ± 3,3	33,7 ± 6,2 *

Pressão	Distensibilidade	
	AC	Adb
25	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0
50	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001
75	0,008 ± 0,001	0,01 ± 0,0
100	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,001
125	0,0 ± 0,0	0,001 ± 0,001

Os valores representam as médias ± EPM. Teste *t* de Student não pareado, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando o grupo Apocinina Diabético foi diferente do grupo Apocinina Controle nas pressões citadas.

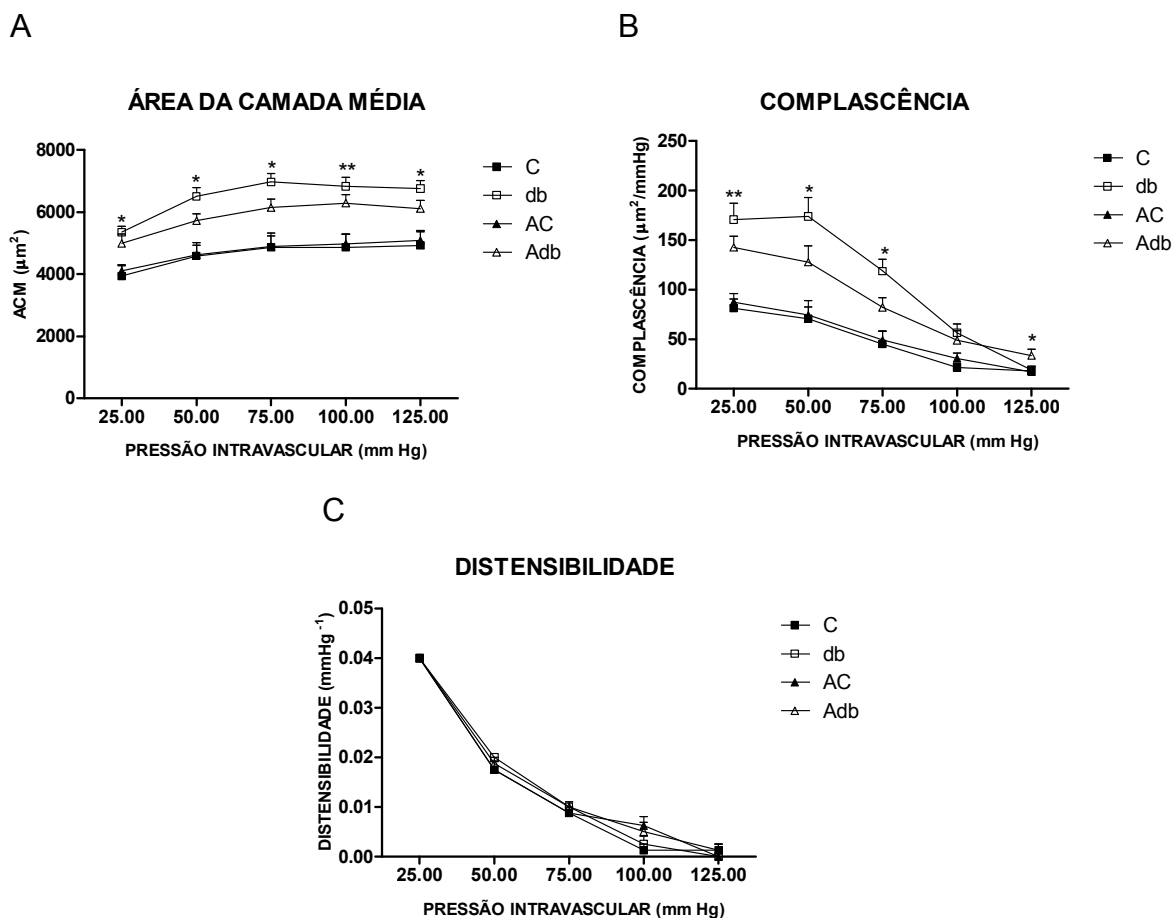


Figura 10: Medidas da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e distensibilidade (mm Hg^{-1}) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Apocinina Controle (AC - triângulos cheios) e Apocinina Diabético (Adb - triângulos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para as diferenças entre AC e Adb. N=8 animais por grupo.

4.4.4.2.3. Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina

A tensão de parede se mostrou significativamente maior nos animais do grupo Apocinina Diabético (Tabela 9; Figura 11A) quando comparados com o grupo Apocinina Controle em todas as pressões estudadas mas esses valores não diferiram dos correspondentes Diabético e Controle (Tabela 6). O mesmo ocorreu com o estresse de parede em todas as pressões estudadas (Tabela 9; Figura 11B) que também não se diferiram dos correspondentes Controle e Diabético (Tabela 6). As curvas de stress/strain dos grupos Apocinina Controle e Apocinina Diabético se encontram exatamente entre as curvas dos grupos Controle e Diabético não demonstrando significativo deslocamento. O tratamento com Apocinina não foi capaz de normalizar a redução da rigidez apresentada pelas artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos bem como de reduzir os valores de tensão e estresses de parede em todas as pressões estudadas.

Tabela 9: Valores de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Apocinina Controle (AC) e Apocinina Diabético (Adb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Tensão de Parede		Estresse de Parede	
	AC	Adb	AC	Adb
25	653,1 \pm 32,9	837,5 \pm 33,7 **	35,5 \pm 2,2	45,5 \pm 1,9 **
50	1768,7 \pm 111,8	2303,1 \pm 105,2 **	106,0 \pm 6,6	137,8 \pm 6,9 **
75	3037,5 \pm 172,8	3946,8 \pm 173,1 **	190,3 \pm 10,7	245,3 \pm 11,4 **
100	4325,0 \pm 265,5	5618,7 \pm 233,5 **	279,5 \pm 17,1	359,4 \pm 13,4 **
125	5593,7 \pm 342,9	7312,5 \pm 303,4 **	363,7 \pm 21,0	496,3 \pm 20,6 ***

Pressão	Relação stress/strain			
	Stress ($\times 10^6$ dinas/cm ²)		Strain ($\Delta D_i/D_0$)	
	AC	Adb	AC	Adb
25	0,049 \pm 0,003	0,06 \pm 0,002	0,224 \pm 0,02	0,298 \pm 0,07
50	0,143 \pm 0,007	0,183 \pm 0,009	0,632 \pm 0,06	0,768 \pm 0,06
75	0,255 \pm 0,012	0,327 \pm 0,015	0,858 \pm 0,06	1,021 \pm 0,07
100	0,374 \pm 0,02	0,479 \pm 0,017	0,972 \pm 0,06	1,168 \pm 0,11
125	0,488 \pm 0,025	0,661 \pm 0,027	1,03 \pm 0,07	1,261 \pm 0,13

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo Apocinina Diabético foi diferente do grupo Apocinina Controle nas pressões citadas.

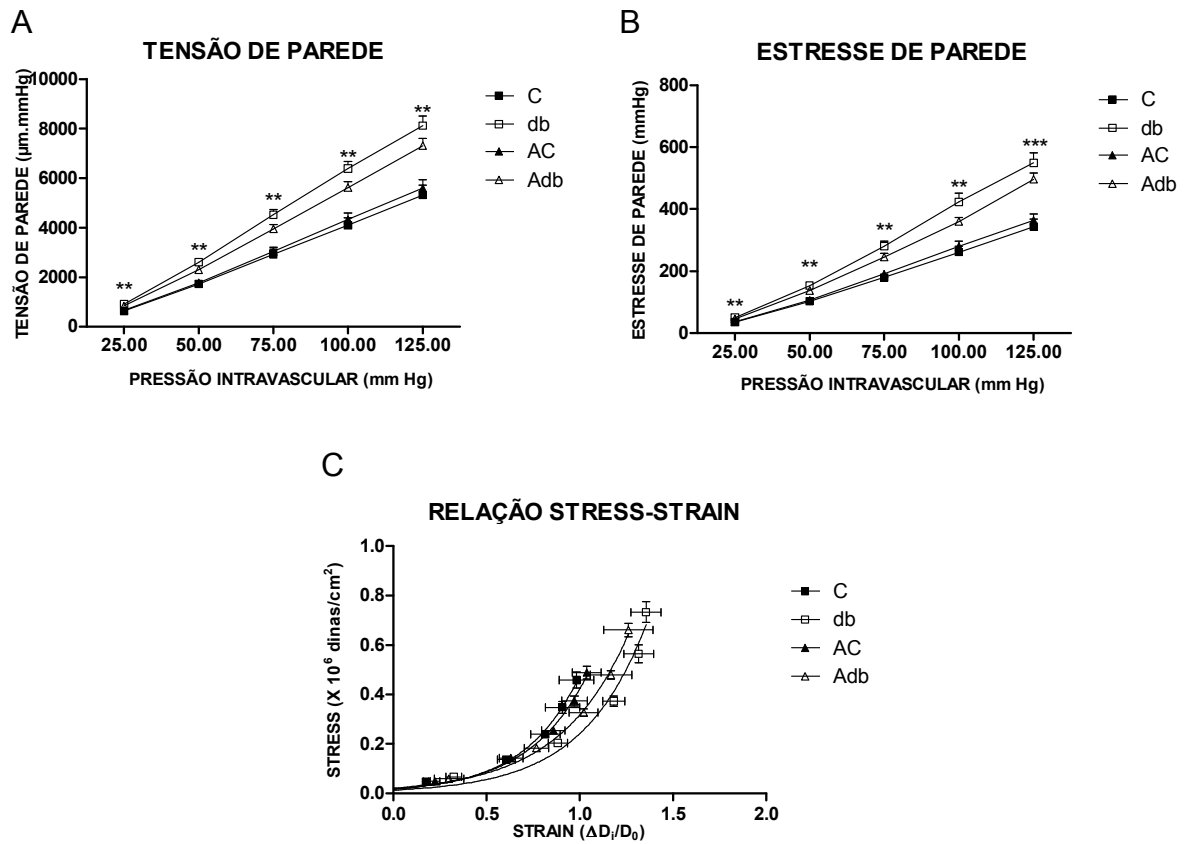


Figura 11: Medidas de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média ($\times 10^6$ dinas/cm²) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Apocinina Controle (AC - triângulos cheios) e Apocinina Diabético (Adb - triângulos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ para as diferenças entre AC e Adb. N=8 animais por grupo

4.4.4.3. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o antioxidante Tempol

4.4.4.3.1. Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmem dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Tempol

A Tabela 10; Figura 12 mostram os resultados após 4 semanas de tratamento com Tempol. As respostas produzidas pelo grupo Tempol Controle não foram significativamente diferentes das respostas apresentadas pelo grupo Controle (Tabela 4) e as respostas do grupo Tempol Diabético foram de mesma magnitude das do grupo Diabético (Tabela 4) para os parâmetros diâmetro interno e externos, espessura de parede e relação média/lúmem em todas as pressões estudadas. Como as respostas foram às mesmas dos grupos Controle e Diabético houveram resultados significantes entre os grupos Tempol Controle e Tempol Diabético, mas esses resultados nos mostram que a redução do estresse oxidativo com o tratamento com Tempol não afetou o aumento dos diâmetros internos e externos e a redução da relação média/lúmem apresentados pelos diabéticos. Foram utilizados 8 animais por grupo.

Tabela 10: Valores de diâmetros interno e externo (μm), espessura de parede (μm) e relação média lúmem no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Tempol Controle (TC) e Tempol Diabético (Tdb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Diâmetro Interno		Diâmetro Externo	
	TC	Tdb	TC	Tdb
25	56,6 \pm 2,9	69,2 \pm 2,9 **	94,3 \pm 4,1	118,0 \pm 2,8 *
50	77,5 \pm 4,8	96,2 \pm 4,2 *	112,5 \pm 5,4	131,2 \pm 3,8 *
75	91,2 \pm 5,6	114,8 \pm 4,1 **	123,2 \pm 6,3	146,3 \pm 3,9 **
100	96,6 \pm 6,2	121,5 \pm 4,2 **	127,6 \pm 6,9	152,7 \pm 4,1 **
125	98,7 \pm 6,3	126,3 \pm 4,3 **	129,7 \pm 7,1	155,8 \pm 4,2 **

Pressão	Espessura de Parede		Relação M/L	
	TC	Tdb	TC	Tdb
25	18,8 \pm 1,1	19,3 \pm 0,3	33,7 \pm 2,1	28,4 \pm 1,6
50	17,5 \pm 1,0	17,5 \pm 0,3	23,1 \pm 1,6	18,5 \pm 1,1 *
75	16,0 \pm 0,8	15,7 \pm 0,3	17,8 \pm 1,1	13,8 \pm 0,7 *
100	15,5 \pm 0,8	15,6 \pm 0,3	16,4 \pm 1,1	13,0 \pm 0,6 *
125	15,5 \pm 0,8	14,7 \pm 0,4	16,0 \pm 1,0	11,8 \pm 0,7 **

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando o grupo Tempol Diabético foi diferente do grupo Tempol Controle nas pressões citadas.

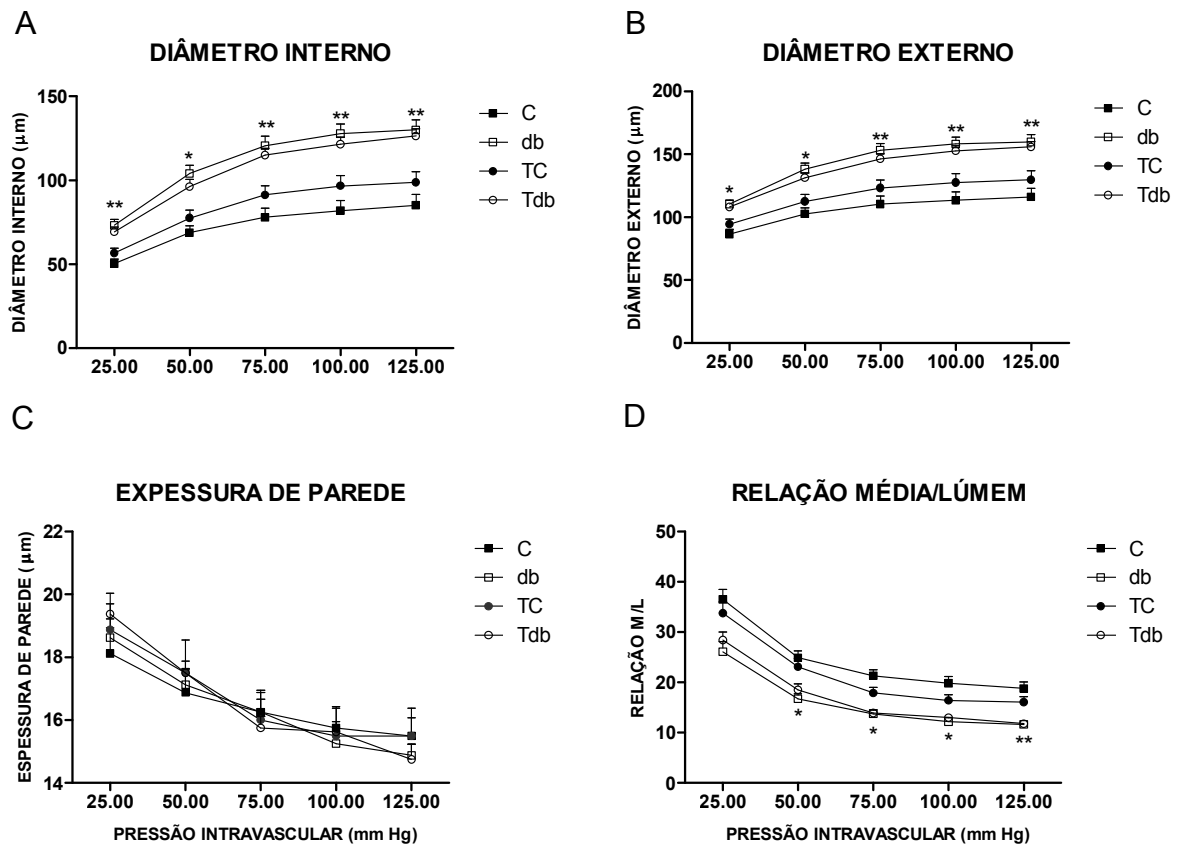


Figura 12: Medidas de diâmetros interno (A) e externo (B) (μm), espessura de parede (C) (μm) e relação média/lúmem (D) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Tempol Controle (TC - círculos cheios) e Tempol Diabético (Tdb - círculos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para as diferenças entre TC e Tdb. N=8 animais por grupo.

4.4.4.3.2. Medidas de área da camada média, complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Tempol

Depois de saber que o tratamento com o inibidor da NAD(P)H oxidase Apocinina não estava alterando o remodelamento apresentado pelo grupo Diabético e a fim de saber se o tratamento com o antioxidante Tempol estava alterando o remodelamento apresentado pelo grupo Diabético a área da camada média das artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos Tempol Controle e Tempol Diabético foi avaliada. A área da camada média das artérias do grupo Tempol Diabético não se mostraram significativamente maior do que no grupo Tempol Controle em todas as pressões estudadas (Tabela 11; Figura 13A) e esses valores também não diferiram dos grupos Controle e Diabético (Tabela 5). A complacência da artéria mesentérica em função da pressão intravascular se apresentou aumentada no grupo Tempol Diabético em relação ao grupo Tempol Controle nas pressões intravasculares de 25, 50, 75 e 125 mm Hg mas não na pressão de 100 mm Hg (Tabela 11; Figura 13B), porém não houveram diferenças entre os grupos Tempol Controle e Controle nem dos grupos Tempol Diabético e Diabético (Tabela 5). As medidas de distensibilidade não se mostraram diferentes entre os grupos Tempol Controle e Tempol Diabético em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 11; Figura 13C) e nem entre esses grupos e os correspondentes Controle e Diabético (Tabela 5).

A redução do estresse oxidativo pelo varredor de radical livre não foi capaz de normalizar a complacência que estava aumentada nos animais diabéticos.

Tabela 11: Valores da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e distensibilidade (mm Hg^{-1}) no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Tempol Controle (TC) e Tempol Diabético (Tdb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Área da Camada Média		Complacência	
	TC	Tdb	TC	Tdb
25	4526,2 ± 445,9	5390,5 ± 180,2	102,6 ± 10,1	152,5 ± 12,3 **
50	5259,8 ± 511,3	6234,8 ± 187,2	91,2 ± 16,1	142,5 ± 15,0 *
75	5435,3 ± 514,3	6456,7 ± 229,5	74,6 ± 13,8	123,2 ± 11,7 *
100	5505,6 ± 536,2	6724,1 ± 226,5	33,4 ± 8,5	49,4 ± 7,7
125	5615,5 ± 559,7	6534,1 ± 278,6	13,3 ± 3,2	38,0 ± 8,4 *

Pressão	Distensibilidade	
	TC	Tdb
25	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0
50	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,0
75	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001
100	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,001
125	0,0 ± 0,0	0,001 ± 0,001

Os valores representam as médias ± EPM. Teste *t* de Student não pareado, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando o grupo Tempol Diabético foi diferente do grupo Tempol Controle nas pressões citadas.

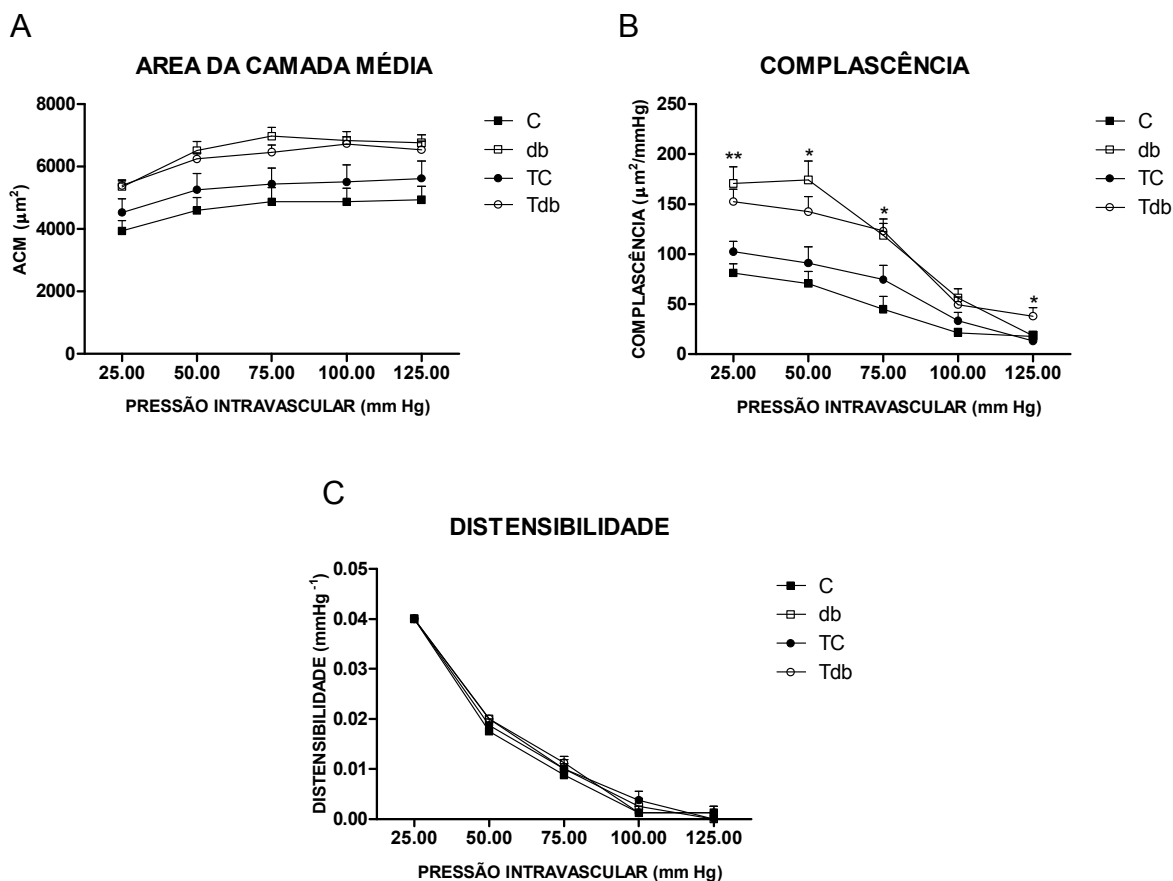


Figura 13: Medidas da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e distensibilidade (mm Hg^{-1}) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Tempol Controle (TC - círculos cheios) e Tempol Diabético (Tdb - círculos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para as diferenças entre TC e Tdb. N=8 animais por grupo.

4.4.4.3.3. Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Tempol

A Tabela 12; Figura 14A mostra que a tensão de parede estava significativamente maior nos animais do grupo Tempol Diabético quando comparados com o grupo Tempol Controle em todas as pressões estudadas mas esses valores não diferiram dos correspondentes Diabético e Controle (Tabela 6). O mesmo ocorreu com o estresse de parede nas pressões 75, 100 e 125 mm Hg (Tabela 12; Figura 14B) que também não se diferiram dos correspondentes Controle e Diabético (Tabela 6). O estresse de parede (dinas / cm²) examinado em função do strain não se mostrou diferente entre os grupos Tempol Controle e Tempol Diabético e a curva stress/strain ainda se mostrou deslocada para a direita nos dois grupos. O tratamento com Tempol normalizou os estresse de parede somente nas pressões 25 e 50 mm Hg mas não foi capaz de normalizar nas outras pressões estudadas. O tratamento também não foi capaz de diminuir o estresse de parede apresentado pelas artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos, bem como de normalizar a curva de stress/strain desse grupo (Tabela 12; Figura 14C).

Tabela 12: Valores de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Tempol Controle (TC) e Tempol Diabético (Tdb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Tensão de Parede		Estresse de Parede	
	TC	Tdb	TC	Tdb
25	707,8 \pm 36,5	865,6 \pm 36,6 **	38,1 \pm 2,5	44,8 \pm 2,1
50	1937,5 \pm 121,0	2406,2 \pm 107,2 **	113,0 \pm 9,6	138,4 \pm 8,1
75	3421,8 \pm 210,9	4307,8 \pm 155,3 **	217,1 \pm 16,7	275,0 \pm 12,9 *
100	4831,2 \pm 314,2	6075,0 \pm 214,4 **	316,3 \pm 24,2	390,5 \pm 17,3 *
125	6171,8 \pm 399,9	7898,4 \pm 271,1 **	403,6 \pm 30,0	540,4 \pm 26,3 **

Pressão	Relação stress/strain			
	Stress ($\times 10^6$ dinas/cm ²)		Strain ($\Delta D_i/D_0$)	
	TC	Tdb	TC	Tdb
25	0,05 \pm 0,002	0,059 \pm 0,002	0,286 \pm 0,06	0,33 \pm 0,03
50	0,145 \pm 0,01	0,184 \pm 0,01	0,709 \pm 0,11	0,84 \pm 0,04
75	0,278 \pm 0,019	0,366 \pm 0,017	1,03 \pm 0,13	1,21 \pm 0,06
100	0,406 \pm 0,028	0,52 \pm 0,023	1,15 \pm 0,13	1,33 \pm 0,07
125	0,518 \pm 0,035	0,72 \pm 0,035	1,19 \pm 0,14	1,43 \pm 0,07

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando o grupo Tempol Diabético foi diferente do grupo Tempol Controle nas pressões citadas.

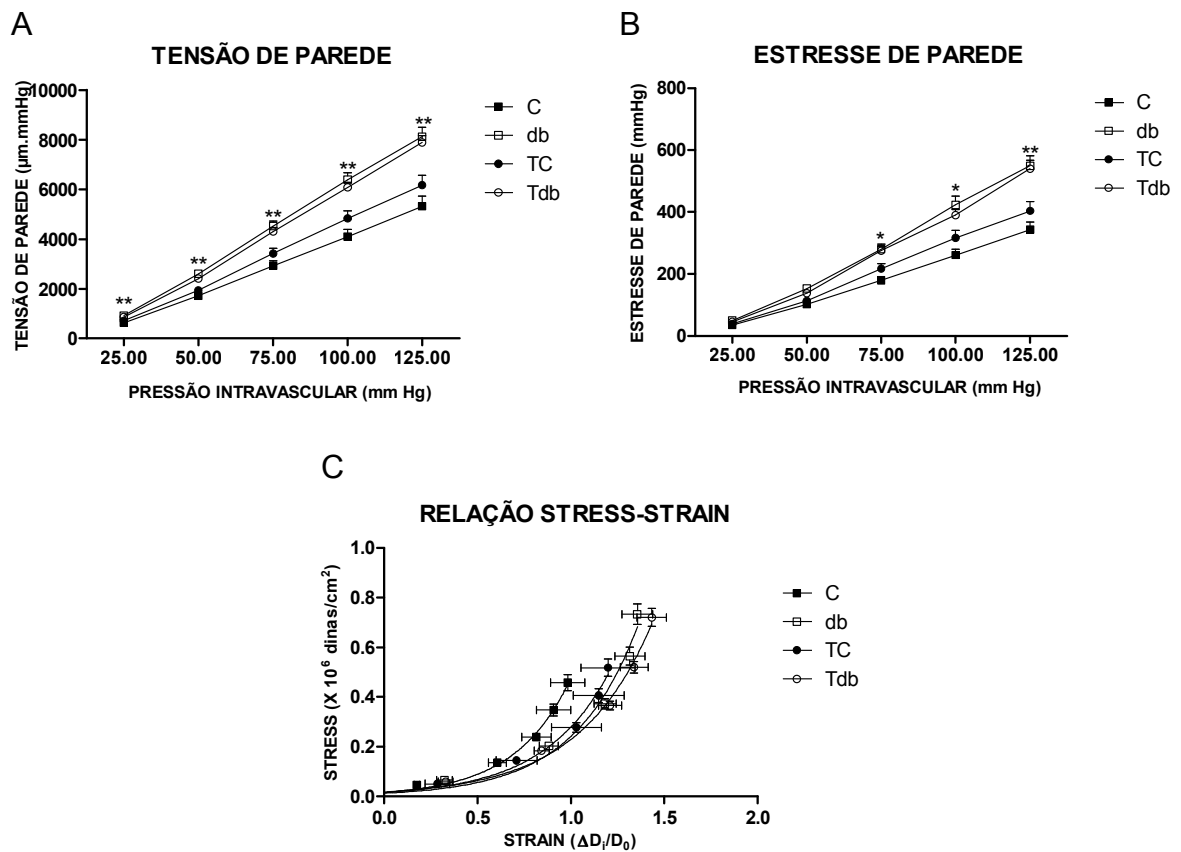


Figura 14: Medidas de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média ($\times 10^6$ dinas/cm²) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Tempol Controle (TC - círculos cheios) e Tempol Diabético (Tdb - círculos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ para as diferenças entre TC e Tdb. N=8 animais por grupo

4.4.4.4. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o bloqueador AT-1 Candesartan

4.4.4.4.1. Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede e relação média/lúmen dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan

A participação da angiotensina II também foi avaliada neste estudo através da utilização de um inibidor do receptor de angiotensina II (receptor AT-1) através do uso de Candesartan na água de beber por 4 semanas. O diâmetro interno do grupo diabético tratado com Candesartan (Tabela 13; Figura 15A) em comparação com o grupo Candesartan Controle aumentou significativamente em todas as pressões estudadas na mesma magnitude do diâmetro interno do grupo Diabético (Tabela 4). Todavia o diâmetro interno do grupo Candesartan Controle aumentou significativamente em comparação ao grupo Controle nas pressões 75, 100 e 125 mm Hg (Figura 15A). O mesmo aconteceu no diâmetro interno ocorreu no diâmetro externo (Tabela 13; Figura 15B) entretanto o diâmetro externo do grupo Candesartan Controle aumentou significativamente em comparação ao grupo Controle em todas as pressões estudadas (Figura 15B). A espessura de parede nos grupos tratados com Candesartan se mostrou um pouco aumentada em relação aos grupos Controle e Diabético porém não produziu nenhuma diferença significativa entre os grupos (Tabela 13; Figura 15C). Devido ao pequeno, mas não significativo, aumento da espessura de parede a relação média/lúmen não se mostrou significativa nas pressões 25 e 50 mm Hg entre os grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético mas estava significativa nas pressões 75, 100 e 125 mm Hg (Tabela 13; Figura 15D). Foram utilizados 8 animais por grupo.

Tabela 13: Valores de diâmetros interno e externo (μm), espessura de parede (μm) e relação média lúmen no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Candesartan Controle (CANC) e Candesartan Diabético (CANdb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Diâmetro Interno		Diâmetro Externo	
	CANC	CANdb	CANC	CANdb
25	63,7 \pm 3,8	75,8 \pm 2,6 *	104,7 \pm 4,0	118,1 \pm 3,4 **
50	88,1 \pm 5,6	107,3 \pm 3,0 **	125,8 \pm 6,0	145,6 \pm 3,4 *
75	102,2 \pm 7,0	128,7 \pm 4,0 **	137,7 \pm 7,8	164,2 \pm 4,0 **
100	109,5 \pm 6,0	134,1 \pm 4,7 **	144,0 \pm 6,9	168,3 \pm 4,6 *
125	112,1 \pm 6,1	138,6 \pm 4,5 **	146,3 \pm 6,9	170,3 \pm 4,6 *

Pressão	Espessura de Parede		Relação M/L	
	CANC	CANdb	CANC	CANdb
25	20,5 \pm 1,1	21,1 \pm 1,3	33,2 \pm 3,1	28,1 \pm 2,2
50	18,8 \pm 0,9	19,1 \pm 1,1	22,0 \pm 1,6	17,9 \pm 1,2
75	17,7 \pm 0,8	17,7 \pm 1,0	17,8 \pm 1,1	13,9 \pm 1,1 *
100	17,2 \pm 0,7	17,1 \pm 1,1	15,9 \pm 0,8	12,9 \pm 1,1 *
125	17,1 \pm 0,7	15,8 \pm 0,7	15,5 \pm 0,8	11,5 \pm 0,7 **

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo Candesartan Diabético foi diferente do grupo Candesartan Controle nas pressões citadas.

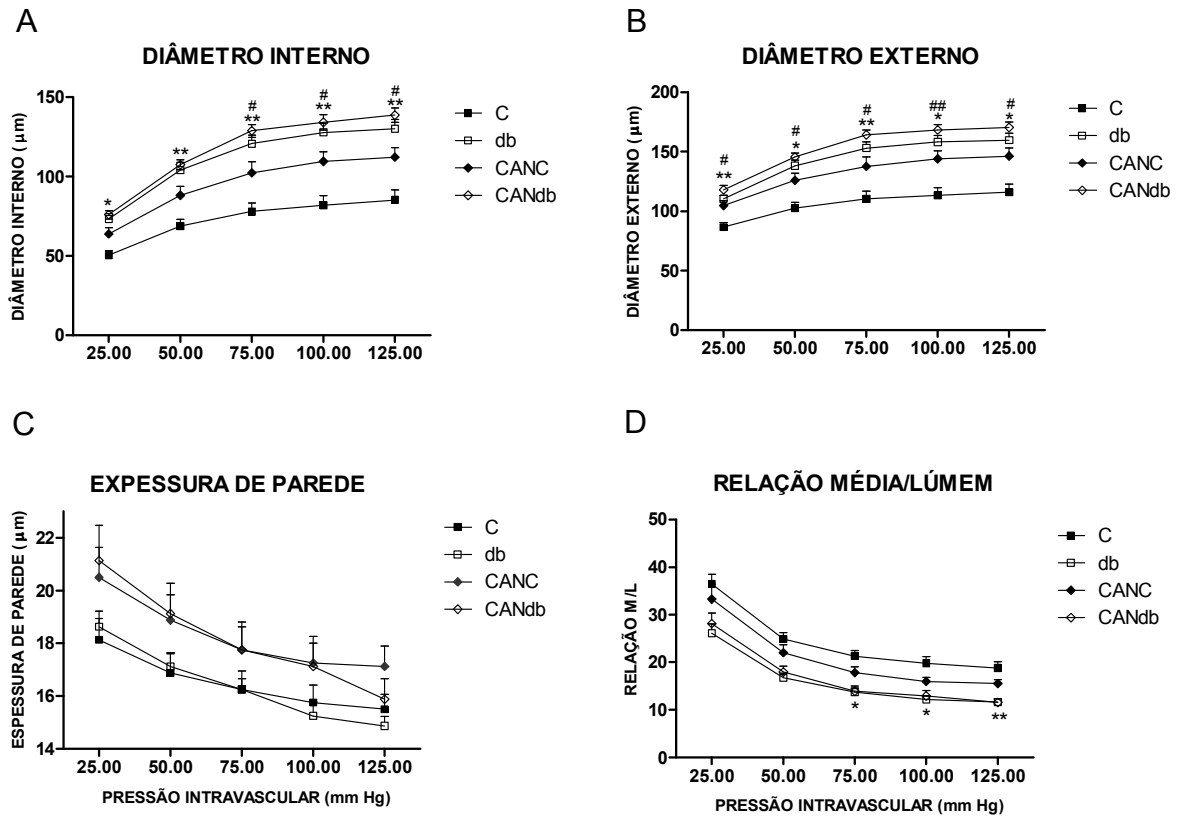


Figura 15: Medidas de diâmetros interno (A) e externo (B) (μm), espessura de parede (C) (μm) e relação média/lúmem (D) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Candesartan Controle (CANC - círculos cheios) e Candesartan Diabético (CANdb - círculos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para as diferenças entre CANC e CANdb; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ para as diferenças entre UC e CANC. N=8 animais por grupo.

4.4.4.4.2. Medidas de área da camada média, complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan

Estudos clínicos indicam que inibidores da ECA e receptores AT-1 possuem mais efeitos benéficos na complacência vascular do que antagonistas de cálcio, β -bloqueadores e diuréticos, fora a redução da pressão arterial causada por essas drogas (Mcfarlane *et al.*, 2003). Para observar a participação da angiotensina II no remodelamento exibido pelos animais do grupo Diabético a área da camada média das artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético foi avaliada. A área da camada média do grupo Candesartan Diabético não se mostrou diferente das do grupo Candesartan Controle em todas as pressões estudadas (Tabela 14; Figura 16A) e nem diferente das do grupo Diabético (Tabela 5). Em compensação a área da camada média do grupo Candesartan Controle se mostrou significativamente maior do que o grupo Controle (Tabela 5) nas pressões 50, 100 e 125 mm Hg (Figura 16A). A complacência da artéria mesentérica em função da pressão intravascular se apresentou aumentada no grupo Candesartan Diabético em relação ao grupo Candesartan Controle nas pressões intravasculares de 25, 50 e 125 mm Hg mas não nas pressões de 75 e 100 mm Hg (Tabela 14; Figura 16B), entretanto não houveram diferenças entre os grupos Candesartan Controle e Controle nem dos grupos Candesartan Diabético e Diabético (Tabela 5). As medidas de distensibilidade não se mostraram diferentes entre os grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 14; Figura 16C) e nem entre esses grupos e os correspondentes Controle e Diabético (Tabela 5).

O bloqueio da Angiotensina II pela inibição do receptor AT-1 não foi capaz de normalizar a área da camada média e a complacência que estavam aumentadas nos animais diabéticos mas manteve a distensibilidade inalterada entre os grupos. Não houveram diferenças entre os valores de área da camada média entre os grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético devido ao fato de que a retirada do fator contrátil angiotensina II aumentou na mesma magnitude a áreas de ambos os grupos.

Tabela 14: Valores da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e distensibilidade (mm Hg^{-1}) no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Candesartan Controle (CANC) e Candesartan Diabético (CANdb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Área da Camada Média		Complacência	
	CANC	CANdb	CANC	CANdb
25	5435,3 ± 414,0	6463,8 ± 491,4	130,9 ± 14,8	182,4 ± 12,9 *
50	6371,1 ± 527,5	7614,0 ± 510,9	120,0 ± 18,5	181,7 ± 9,8 *
75	6763,4 ± 666,2	8167,3 ± 512,3	88,3 ± 18,1	160,1 ± 29,3
100	6934,2 ± 595,9	8132,7 ± 565,2	45,3 ± 9,5	45,7 ± 9,0
125	7010,0 ± 591,4	7711,0 ± 446,8	18,6 ± 4,5	38,1 ± 6,4 *

Pressão	Distensibilidade	
	CANC	CANdb
25	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0
50	0,01 ± 0,002	0,02 ± 0,0
75	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,001
100	0,005 ± 0,002	0,0 ± 0,0
125	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Os valores representam as médias ± EPM. Teste *t* de Student não pareado, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando o grupo Candesartan Diabético foi diferente do grupo Candesartan Controle nas pressões citadas.

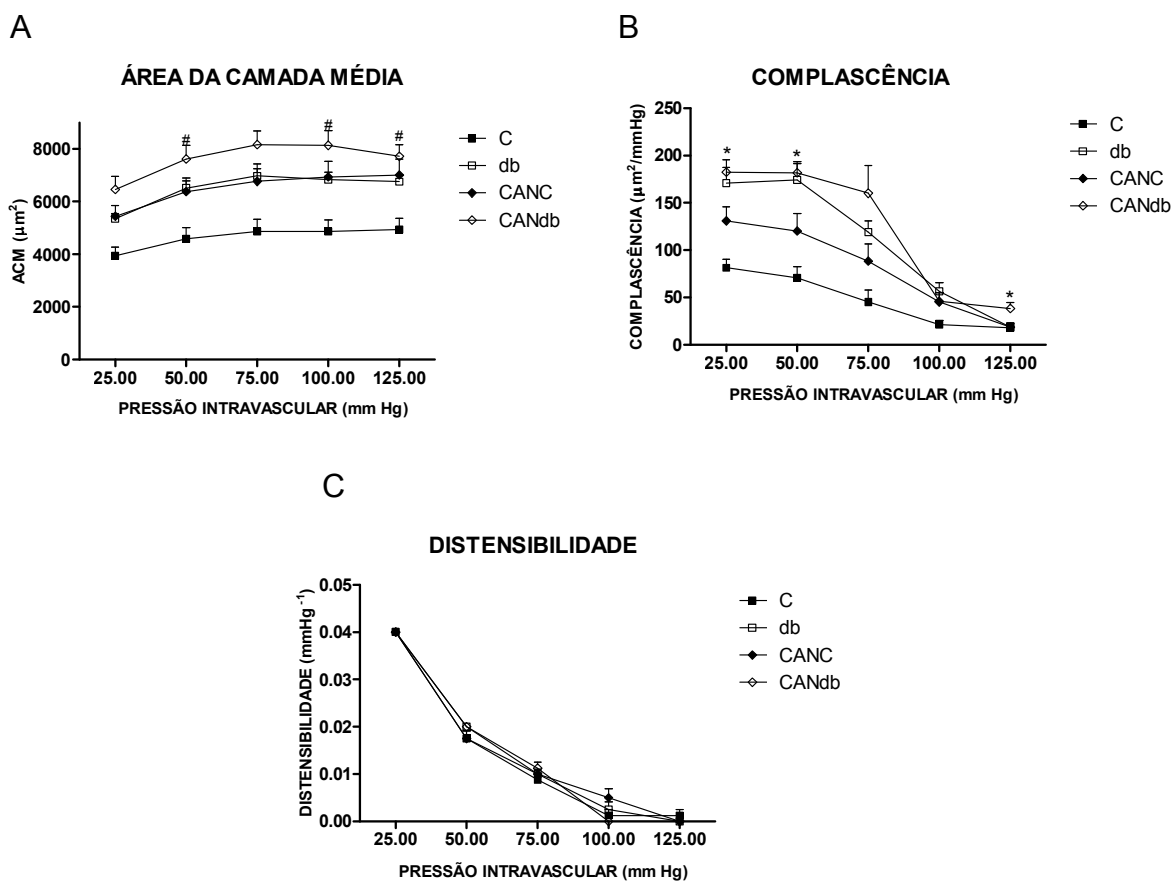


Figura 16: Medidas da área da camada média (μm^2), complacência ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) e distensibilidade (mm Hg^{-1}) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Candesartan Controle (CANC - losangos cheios) e Candesartan Diabético (CANdb - losangos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para as diferenças entre CANC e CANdb; # $p < 0,05$ para as diferenças entre UC e CANC. N=8 animais por grupo.

4.4.4.4.3. Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan

A Tabela 15 e Figura 17A mostram que a tensão de parede se mostrou significativamente maior nos animais do grupo Candesartan Diabético quando comparados com o grupo Candesartan Controle em todas as pressões estudadas e esses valores não diferiram dos correspondentes Diabético e Controle (Tabela 6). O mesmo ocorreu com o estresse de parede nas pressões 75, 100 e 125 mm Hg (Tabela 15; Figura 17B) que também não se diferiram dos correspondentes Controle e Diabético (Tabela 6). As curvas de stress/strain dos grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético se encontram entre as curvas dos grupos Controle e Diabético não demonstrando significativo deslocamento. O tratamento com Candesartan não foi capaz de normalizar o aumento de tensão e estresse de paredes apresentados pelo grupo Diabético e nem de deslocar a curva de stress/strain para a esquerda (Tabela 15; Figura 17C).

Tabela 15: Valores de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média no terceiro ramo da artéria mesentérica dos grupos Candesartan Controle (CANC) e Candesartan Diabético (CANdb) sob diferentes pressões (mm Hg).

Pressão	Tensão de Parede		Estresse de Parede	
	CANC	CANdb	CANC	CANdb
25	796,8 \pm 48,5	948,4 \pm 33,6 *	39,8 \pm 3,4	46,0 \pm 3,0
50	2203,1 \pm 141,2	2684,3 \pm 75,7 **	118,5 \pm 9,7	143,6 \pm 8,7
75	3834,3 \pm 263,3	4828,1 \pm 152,6 **	217,4 \pm 15,1	277,9 \pm 16,1 *
100	5475,0 \pm 300,7	6706,2 \pm 238,9 **	318,6 \pm 16,0	401,7 \pm 25,1 *
125	7007,8 \pm 385,5	8664,0 \pm 285,9 **	411,8 \pm 23,3	553,7 \pm 28,1 **

Pressão	Relação stress/strain			
	Stress ($\times 10^6$ dinas/cm ²)		Strain ($\Delta D_i/D_0$)	
	CANC	CANdb	CANC	CANdb
25	0,053 \pm 0,004	0,06 \pm 0,004	0,253 \pm 0,06	0,305 \pm 0,05
50	0,158 \pm 0,012	0,191 \pm 0,011	0,742 \pm 0,11	0,853 \pm 0,09
75	0,289 \pm 0,02	0,37 \pm 0,021	1,023 \pm 0,14	1,217 \pm 0,10
100	0,424 \pm 0,021	0,535 \pm 0,033	1,176 \pm 0,14	1,307 \pm 0,10
125	0,549 \pm 0,031	0,738 \pm 0,037	1,225 \pm 0,13	1,383 \pm 0,11

Os valores representam as médias \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo Candesartan Diabético foi diferente do grupo Candesartan Controle nas pressões citadas.

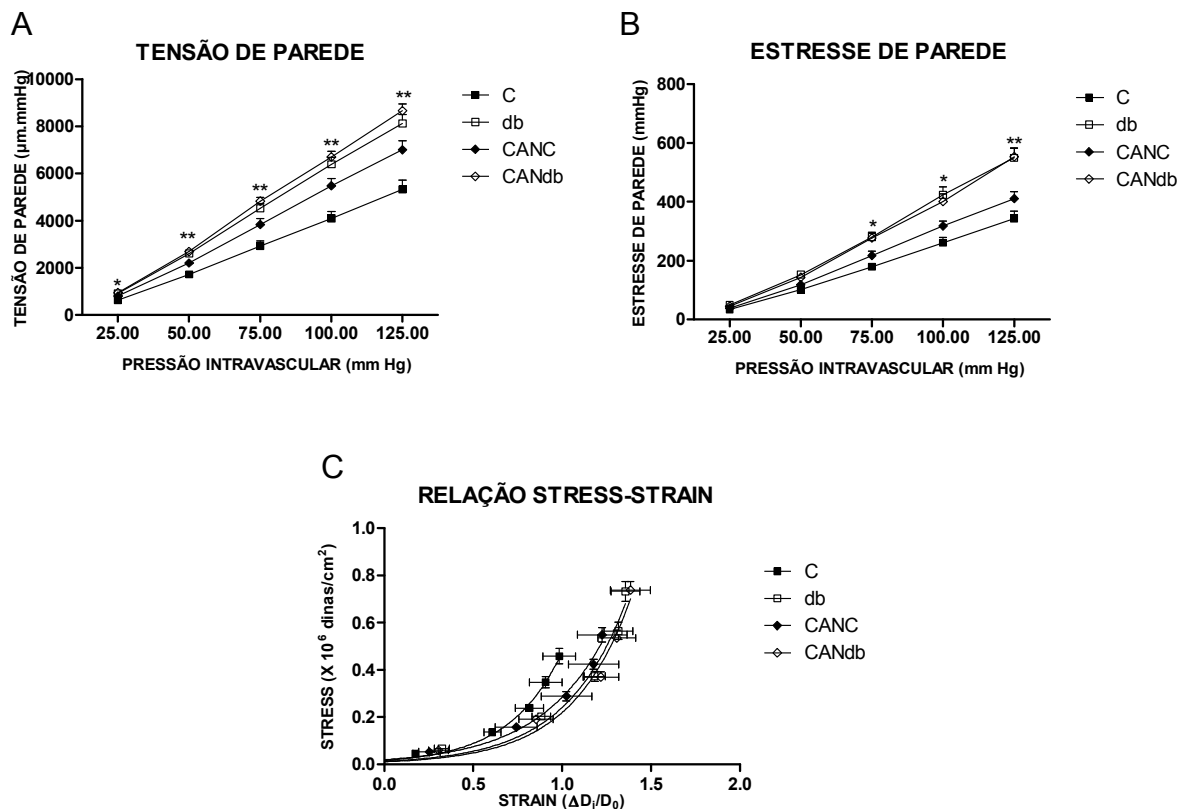


Figura 17: Medidas de tensão de parede ($\mu\text{m mmHg}$), estresse de parede (mm Hg) e relação stress/strain da média ($\times 10^6$ dinas/cm²) induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular (25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg) em artéria mesentérica de resistência de camundongos Controle (C - quadrados cheios), Diabético (db - quadrados vazios) Candesartan Controle (CANC - losangos cheios) e Candesartan Diabético (CANdb - losangos vazios). Valores expressos em Média \pm EPM. ANOVA 1 via post hoc Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ para as diferenças entre CANC e CANdb. N=8 animais por grupo

4.5. Expressão das proteínas regulatórias de matriz extracelular (ECM) em tecidos de artérias mesentéricas de resistência de animais diabéticos e não diabéticos

Em condições fisiológicas como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelamento tecidual as proteínas da família matriz metaloproteínase (MMP) estão envolvidas no acúmulo ou degradação de matriz extracelular, bem como fatores pro-fibróticos como PAI-1 e TGF- β . Para a análise da expressão das proteínas regulatórias de matriz extracelular a técnica de western blot foi utilizada em preparações de artérias mesentéricas de resistência de animais diabéticos e não diabéticos (Controles). Todas as análises densitométricas foram divididas pelos valores de GAPDH correspondentes para cada gel e então divididas pelos valores dos grupos controles (% Controle).

4.5.1. Matriz Metaloproteínase- 2, 9 e 12 (MMP-2, MMP-9 e MMP-12)

A expressão de MMP-2 e MMP-9 parece ser regulada por estresse oxidativo, uma vez que eles são ativados por espécies reativas do oxigênio (ROS) (Rajágopalan, Meng *et al.*, 1996). Usando análise de western blot foi demonstrado que a expressão de MMP-9 estava aumentada em camundongos diabéticos comparados com controles (Figura 18B) o que pode ser em consequência do aumento do estresse oxidativo mostrado pelos diabéticos (Figura 8). Não houve significativa diferença na expressão de MMP-2 entre os grupos Controle e Diabético (Figura 18A).

E sabido que diabetes tipo 2 é uma condição inflamatória (Hoatamisligil *et al.*, 1993). MMP-12 não somente digere elastina mas também degrada membrana basal, o que permite a penetração de macrófagos nos tecidos durante um processo inflamatório (Gronski *et al.*, 1997). No presente estudo MMP-12 estava aumentada no grupo Diabético em comparação ao grupo Controle (Figura 18C), isso deve ter ocorrido devido à condição inflamatória apresentada fisiologicamente pelos animais diabéticos.

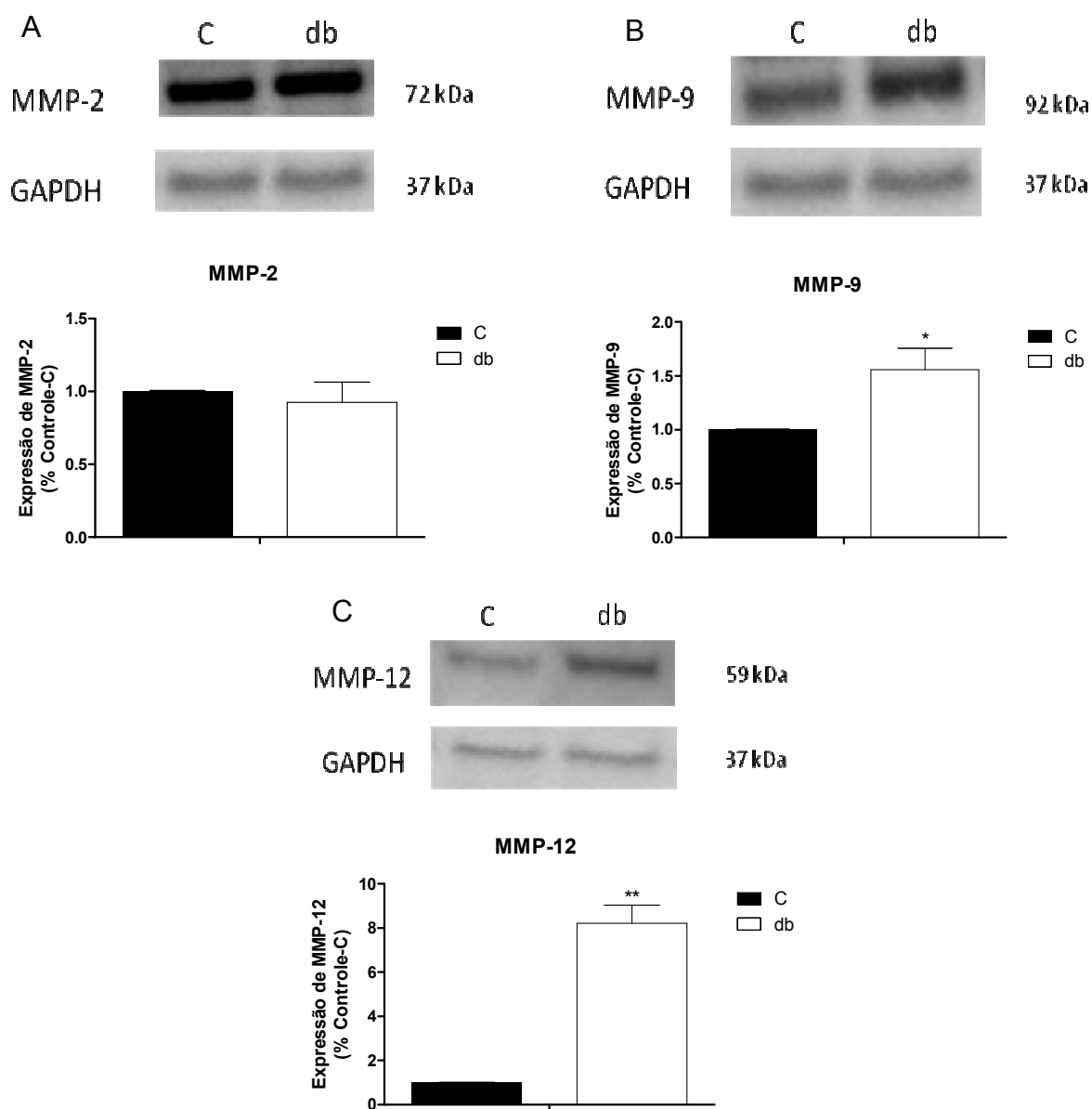


Figura 18: Imuno-deteção por western blot indicando a expressão vascular de MMP-2 (A), MMP-9 (B) e MMP-12 (C) expressos em % Controle (C) em tecido de artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C – barra cheia) e diabéticos (db – barra vazia). Valores expressos em Média \pm EPM. Teste t de Student não pareado, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os painéis no topo de cada gráfico são imunoblots representativos de MMP-2 e GAPDH (A), MMP-9 e GAPDH (B) e MMP-12 e GAPDH (C).

4.5.2. Inibidores de metaloproteínase tecidual- 1 e 2 (TIMP-1 e TIMP-2)

O balanço entre matriz metaloproteínases (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs) possui um importante papel no remodelamento vascular (Nagase et al, 1999). Um distúrbio nesse balanço entre MMPs e TIMPs podem levar ao excesso de acúmulo ou degradação de ECM (Kenichi *et al.*, 2004). Nossos experimentos mostraram que as expressões de TIMPs 1 e 2 aumentaram significativamente nos animais diabéticos quando comparados aos controles (Figura 19).

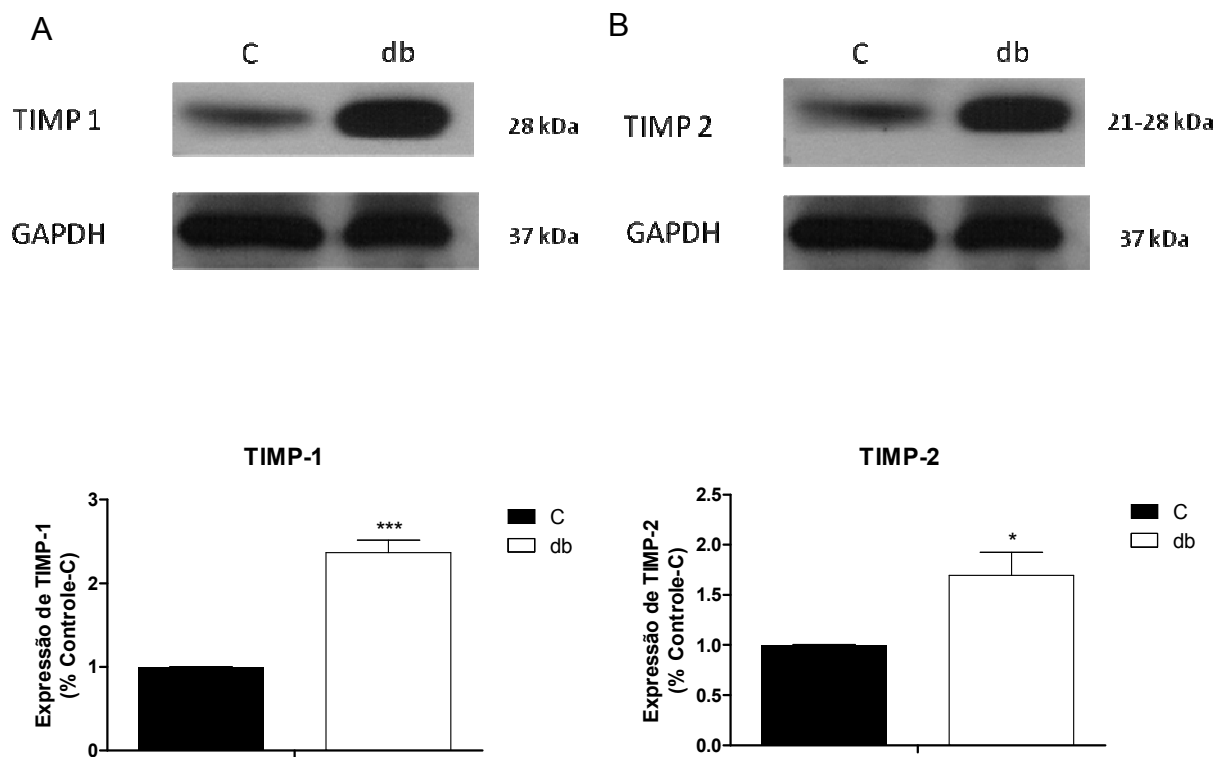


Figura 19: Imuno-deteccção por western blot indicando a expressão vascular de TIMP-1 (A) e TIMP-2 (B) (% Controle – C) em tecido de artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C – barra cheia) e diabéticos (db – barra vazia). Valores expressos em Média \pm EPM. Teste t de Student não pareado, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Os painéis no topo são imunoblots representativos de TIMP-1 e GAPDH (A) e de TIMP-2 e GAPDH (B).

4.5.3. Fator de crescimento transformador- β e Inibidor de ativador de plasminogênio- 1 (TGF- β e PAI-1)

O pro-fibrótico inibidor de ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) está aumentado em diabetes, resistência a insulina e hipertensão (McFarlane *et al.*, 2003). O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) também é um mediador chave do acúmulo de ECM em rins de animais diabéticos e sua síntese é aumentada em situações de alta glicose. TGF- β também estimula a síntese de PAI-1 (Alessi *et al.*, 2000). Nossos experimentos demonstraram aumento da expressão de ambos, TGF- β e PAI-1, pelos animais do grupo diabético quando comparados com os camundongos do grupo Controle (Figura 20)

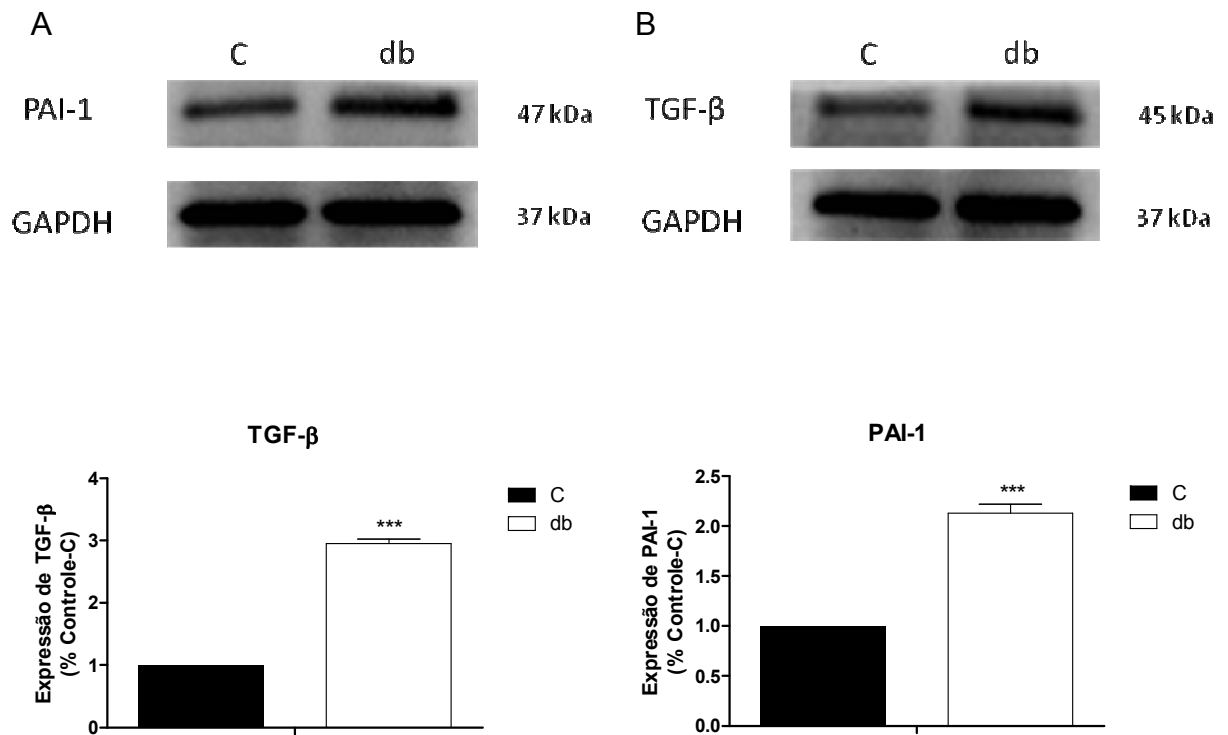


Figura 20: Imuno-deteccção por western blot indicando a expressão vascular de TGF- β (A) e PAI-1 (B) (% Controle – C) em tecido de artéria mesentérica de resistência de camundongos controles (C – barra cheia) e diabéticos (db – barra vazia). Valores expressos em Média \pm EPM. Teste t de Student não pareado, *** $p < 0,001$. Os painéis no topo são imunoblots representativos de TGF- β e GAPDH (A) e PAI-1 e GAPDH (B).

V. Discussão

Alteração estrutural em pequenas artérias é o mais importante previsor de eventos cardiovasculares em populações de alto risco (Rizzoni *et al.*, 2003). Artérias mesentéricas de resistência consistem em pequenas artérias e arteríolas que são usadas no estudo de doenças microvasculares.

Considerando os efeitos do remodelamento em artérias de resistência, hiperglicemia e hiperinsulinemia, características de diabetes do tipo 2, e a ação de antioxidantes e do sistema renina-angiotensina em diabetes este trabalho teve o intuito de examinar a estrutura de artérias mesentéricas de resistência de camundongos transgênicos que apresentam deficiência no receptor leptina (db/db), um modelo hiperglicêmico, com resistência a insulina, hiperlipidêmico e obeso de diabetes do tipo 2. Para isso um sistema de miógrafo de pressão foi utilizado, bem como análises bioquímicas e histológicas das artérias para caracterizar o tipo de remodelamento apresentado pelos animais diabéticos, a influência do estresse oxidativo e do sistema renina-angiotensina no remodelamento produzido, bem como as proteínas regulatórias da matriz extracelular envolvidas nas alterações da parede arterial.

Os resultados mostrados neste trabalho sugerem que as artérias mesentéricas de resistência dos camundongos diabéticos (db) com 16 semanas de idade apresentam: 1) remodelamento hipertrófico externo associado com aumento da complacência e redução da rigidez; 2) aumento do estresse oxidativo; 3) redução do estresse oxidativo quando tratados com antioxidantes e com o bloqueador do receptor AT-1; 4) inalteração do estado de remodelamento quando tratados com antioxidantes (Tempol e Apocinina) e com o bloqueador do receptor AT-1 (Candesartan) por 4 semanas fazendo-nos crer que o estresse oxidativo e o sistema renina-angiotensina não estão envolvidos neste tipo de remodelamento apresentado pelos animais diabéticos e 5) o remodelamento hipertrófico externo apresentado pelos animais diabéticos envolve turnover da matriz extracelular com alteração na regulação MMPs/TIMPs e fatores de crescimento.

5.1. Resposta vasoconstritora à fenilefrina e resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina

Sob pressão de 50 mm Hg à fenilefrina diminuiu o diâmetro interno do terceiro ramo da artéria mesentérica em todos os grupos estudados, porém, não houve diferenças na porcentagem de contração entre os grupos.

A integridade endotelial do vaso foi avaliada através do relaxamento induzido pela acetilcolina. Na artéria mesentérica de resistência de todos os grupos, a acetilcolina foi capaz de reduzir a contração induzida pela fenilefrina, apresentando mais de 70% de relaxamento. No entanto, não se observou alteração estatisticamente significativa dessa resposta de relaxamento entre as artérias dos animais dos grupos Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Candesartan Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético e Candesartan Diabético (Tabela 1).

5.2. Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca

Usando um probe de telemetria a pressão arterial e frequência cardíaca foram monitoradas em camundongos conscientes e em movimento livre. As medidas de pressão arterial média e frequência estão representadas na Tabela 2. Os grupos foram divididos em Controle, Tempol Controle, Apocinina Controle, Diabético, Tempol Diabético, Apocinina Diabético Controles, Diabéticos, Tempol Diabéticos e Apocinina Diabéticos. Após 7 dias de monitoramento a pressão arterial média não diferiu entre os grupos. Koya e colaboradores em 2000 foram os primeiros a medirem a pressão arterial em camundongos db/db e através do método tail cuff não observaram diferença na pressão arterial entre os grupos controle e db/db (Koya *et al.*, 2000). Outro grupo usando este mesmo método observaram aumento da pressão arterial nos db/dbs (Bagi *et al.*, 2005). Corroborando com os nossos dados Belmadani e colaboradores usaram telemetria em db/dbs e também não acharam diferenças entre os grupos (Belmadani *et al.*, 2008). Já outro estudo recente, também utilizando o método de telemetria, observaram aumento da pressão arterial nos animais diabéticos mas esse grupo fez a medida da pressão em uma média de 3 dias enquanto que nosso estudo observou a pressão arterial por 5 dias, e

necessário lembrar que o ambiente onde se fazem as medidas deve ser 100% livre de barulho porque qualquer interrupção externa pode alterar os registros, por isso fomos muito conscientes a respeito deste fato (Su *et al.*, 2008). Acredita-se que esses animais venham a ficar hipertensos com a idade portanto a inserção de probes de telemetria e medida de pressão arterial se faz necessária em animais mais velhos do que 16 semanas de idade.

A frequência cardíaca por sua vez estava reduzida nos animais diabéticos em comparação com o grupo controle. Os animais tratados com tempol e apocinina não diferiram significativamente dos outros grupos. Nós acreditamos que os animais diabéticos apresentam frequência cardíaca reduzida devido ao fato de serem obesos e se movimentarem menos que os animais controles. Su e colaboradores não encontraram diferenças significativas entre controle e db/db para frequência cardíaca (Su *et al.*, 2008). Redução da frequência cardíaca foi encontrada em camundongos db/db conscientes com 3 meses de idade (Semeniuk *et al.*, 2002). O grupo do Panagia também observou redução da frequência cardíaca nos animais db/db e concluíram que essa redução ocorreu em consequência de alteração do sistema nervoso autônomo, comumente observada em pacientes diabéticos, e que a bradicardia leva a uma redução do débito cardíaco e redução da fração de ejeção cardíaca nos animais diabéticos (Panagia *et al.*, 2007).

5.3. Medidas de glicose sanguínea e peso corporal

Com 16 semanas de idade todos os animais diabéticos (tratados e não tratados) apresentaram significativo aumento do peso corporal e glicose sanguínea em jejum, o que é esperado que ocorra nesses animais desde 4 semanas de idade. O tratamento com os antioxidantes Tempol e Apocinina e com o bloqueador do receptor AT-1 Candesartan não foram capazes de reduzir o peso corporal e níveis de glicose dos animais diabéticos (Tabela 3).

Os animais diabéticos se tornam obesos em torno de 3 a 4 semanas de idade. Elevações de insulina no plasma começam de 10 a 14 dias e glicose sanguínea de 4 a 8 semanas de idade. Eles são poliúricos, polidípsicos e polifágicos e possuem grande redução na produção de insulina pelas células beta do pâncreas (Herberg e Coleman, 1977; Garris *et al.*, 2005). Devido a esses fatos, é mais que

esperado o aumento significativo de glicose sanguínea e peso corporal com 16 semanas de idade, como foi mostrado em nossos achados.

5.4. Medidas na artéria mesentérica de resistência através do uso do miógrafo de pressão

5.4.1. Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede, relação média/lúmen e área da camada média dos animais diabéticos e não diabéticos

Sob condições passivas da artéria mesentérica de resistência o diâmetro interno dos animais diabéticos se mostrou significativamente maior, nas pressões impostas, do que dos animais controles (Tabela 4; Figura 5A). O mesmo ocorreu com o diâmetro externo (Tabela 4; Figura 5B). O aumento do diâmetro externo nos animais diabéticos ocorreu em consequência do aumento do diâmetro interno pois a espessura de parede não foi alterada entre os grupos em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 4; Figura 5C). Em consequência de um maior diâmetro interno apresentado pelos animais diabéticos e inalteração na espessura de parede a relação média / lúmen se mostrou reduzida nos animais diabéticos em comparação com os animais do grupo controle em todas as pressões estudadas. O aumento do diâmetro interno em diabetes pode ser causado por vários fatores. Korthuis e colaboradores acreditam que, em diabetes, hiperglicemia, hiperosmolaridade e altos níveis de glucagon no plasma induzem vasodilatação no leito vascular intestinal (Korthuis *et al.*, 1987).

Para avaliar se as artérias mesentéricas de resistência dos animais do grupo diabético possuíam algum tipo de remodelamento, a área da camada média foi calculada. A área da camada média das artérias dos animais diabéticos se mostraram significativamente maior do que no grupo controle (Tabela 5; Figura 6A) mesmo sem nenhuma diferença da espessura de parede. Juntamente com o aumento do diâmetro interno, o aumento da área da camada média caracteriza remodelamento hipertrófico externo do vaso (Mulvany *et al.*, 1996). Cooper e colaboradores mostraram que artérias mesentéricas apresentam hipertrofia depois de 3 semanas de diabetes experimental tipo 1 induzida pelo tratamento com streptozotocina (STZ) (Cooper *et al.*, 1994). Hipertrofia de parede sem mudança de

diâmetro interno também foi achado em pequenas artérias de pacientes com DMT2 (Schofield *et al.*, 2002), bem como em idade fisiológica avançada de ratas fêmeas expostas a alta pressão de pulso (Moreau *et al.*, 1998). Em mesentéricas de ratos tratados com STZ, Crijns e colaboradores observaram remodelamento eutrófico externo (Crijns *et al.*, 1999). Remodelamento hipertrófico externo associado com hiperplasia de célula arterial em artérias de resistência foi encontrado em ratos idosos (Laurant *et al.*, 2004; Briones *et al.*, 2007). Resultados similares foram encontrados depois de 4 semanas de exposição crônica a alto fluxo sanguíneo seguidos de aumento de espessura de parede (Pourageaud e De Mey, 1997) e sem mudanças na espessura de parede depois de 7 dias de exposição (Unthank *et al.*, 1996). Endemann 2004 observou um persistente remodelamento hipertrófico externo em artérias de resistência de pacientes com DMT2 mesmo após tratamento com anti-hipertensivos, ou seja, pressão arterial média normal, como em nossos resultados (Endemann *et al.*, 2004). As razões para esses resultados contraditórios obtidos em diabetes do tipo 1 e 2 não são claras mas devem refletir diferenças de leitos vasculares e a presença ou ausência de obesidade. Outra possibilidade seria o aumento do estresse oxidativo, em consequência da hiperglicemia, apresentados por esses animais e a participação da interação do sistema renina-angiotensina com as AGEs, também resultando em um aumento do estresse oxidativo. Em camundongos db/db a expressão e atividade da eNOS é regulada através da produção mitocondrial de estresse oxidativo, mediada pela glicose, mostrando a importância do estresse oxidativo na disfunção endotelial (redução da produção de NO) e consequentemente nas complicações vasculares (Srinivasan *et al.*, 2004). As vias químicas que levam à formação de AGEs interagem junto ao sistema renina-angiotensina estimulando a geração de radicais livres e consequentemente estresse oxidativo, induzidos por ambos, glicose (hiperglicemia) e angiotensina II (Jerums *et al.*, 2003). E uma última explicação para o remodelamento hipertrófico externo encontrado por nós seria o comportamento alimentar dos camundongos db/db, que comem constantemente enquanto estão acordados, podendo estar associado ao aumento do fluxo sanguíneo no leito mesentérico.

5.4.2. Medidas de complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos

As alterações crônicas da estrutura vascular são coletivamente referidas como remodelamento e devem ter efeitos importantes nas propriedades mecânicas dos vasos, como complacência e distensibilidade (Levy *et al.*, 1989).

A complacência é uma função de proteção do vaso e depende do tamanho do diâmetro interno e das propriedades elásticas da parede vascular (Van Bortel *et al.*, 1995). Nossos resultados mostram que a complacência da artéria mesentérica em função da pressão intravascular (Tabela 5; Figura 6B) estava significativamente aumentada no grupo diabético e os valores de complacência foram diminuindo gradativamente à medida que altas pressões foram aplicadas. O aumento da complacência mostrado neste trabalho deve ocorrer em consequência do maior diâmetro interno apresentado pelos camundongos db/db em comparação com os controles. Distensibilidade é a complacência corrigida pelo tamanho do diâmetro interno e depende da massa e das propriedades intrínsecas da parede vascular (Yin e Ting, 1992). Também é reconhecida como um determinante do estresse de parede (Van Bortel *et al.*, 1995). Uma menor complacência e distensibilidade foi observada por vários autores que estudaram propriedades mecânicas de artérias e arteríolas em diabetes (Kastrup *et al.*, 1987; Oxlund *et al.*, 1989; Hill e Ege, 1994; Kool *et al.*, 1995), porém todos esses achados foram em diabetes do tipo 1 e nenhum desses estudos foi realizado em artéria mesentérica. Nós acreditamos que o aumento da complacência mostrado em nossos resultados ocorre em consequência de um maior diâmetro interno. As medidas de distensibilidade por sua vez, não se mostraram diferentes entre os grupos controle e diabético em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 5; Figura 6C). Este fato deve ter ocorrido porque mesmo com um aumento do diâmetro interno e do estresse de parede (dado discutido mais adiante), que pode ser determinado pela distensibilidade, nos não observamos alteração na espessura de parede nos animais diabéticos. Nós acreditamos que ocorra uma adaptação entre as forças que agem na artéria mesentérica o que deve estar ajudando a determinar distensibilidade nesses vasos. Nossos resultados estão de acordo com os achados do Crijns e colaboradores que mostraram aumento da complacência e redução da distensibilidade em artérias mesentéricas de animais diabéticos (Crijns *et al.*, 1999). O grupo do Adrian também não encontrou diferenças

em distensibilidade em artérias mesentéricas de ratos em idade avançada (Adrian *et al.*, 2004). Van Bortel e colaboradores também acreditam que o aumento da complacência não implica automaticamente no aumento da distensibilidade arterial (Van Bortel *et al.*, 1995). Em compensação outros grupos discordam dos nossos resultados, como redução da distensibilidade em artérias mesentéricas de ratos hipertensos SHR (Briones *et al.*, 2003), indiferença em complacência e distensibilidade em artérias mesentéricas de ratos SHR comparados com controles (Qiu *et al.*, 1995) e redução da distensibilidade em arteríolas de ratos com diabetes do tipo 1 tratados com STZ (Hill e Ege, 1994). Mais uma vez nenhum desses resultados foi em DMT2.

5.4.3. Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos

A tensão de parede estava significativamente maior nos animais diabéticos quando comparados com os controles em todas as pressões estudadas (Tabela 6; Figura 7A). O mesmo ocorreu com o estresse de parede nas pressões 25, 50, 75, 100 e 125 mm Hg que foi aumentado à medida que as pressões foram aumentadas (Tabela 6; Figura 7B). Quando o estresse de parede (dinas / cm²) foi examinado em função do strain a curva stress/strain se mostrou deslocada para a direita nas artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos, indicando menos rigidez apresentada pelos animais diabéticos quando comparados com os animais controles (Tabela 6; Figura 7C).

A tensão e estresse de parede são baseados na lei de Laplace. Esta lei é de fundamental importância para o sistema cardiovascular e principalmente na fisiologia do processo de remodelamento na parede vascular (Lehoux *et al.*, 2006). A lei de Laplace descreve a relação entre a diferença de pressão transmural, o raio e a espessura da parede do vaso como uma força tensora. Com isso, a tensão e estresse de parede dependem da pressão transmural, do raio e da espessura de parede nos túbulos vasculares (Glagov *et al.*, 1992). Tensão de parede é igual à pressão imposta multiplicada pelo raio (diâmetro interno dividido por 2), portanto é diretamente proporcional ao diâmetro interno. Como, em nossos resultados, o diâmetro interno dos animais diabéticos é significativamente maior do que dos animais controles o mesmo ocorreu com a tensão de parede, o que significa que um

maior diâmetro interno nos animais diabéticos leva a um aumento de tensão na parede do vaso. De acordo com os nossos achados aumento da tensão de parede foi encontrada em animais hipertensos (Qiu *et al.*, 1995) e diabéticos (Crijns *et al.*, 1999). Estresse de parede também reflete diferenças do diâmetro interno (Wigg *et al.*, 2004). Nossos resultados mostraram aumento do estresse de parede, nas pressões adotadas, dos animais diabéticos em comparação com os controles, o que ocorre em consequência de um maior diâmetro interno que leva ao desenvolvimento de hipertrofia nesses animais. Schofield e colaboradores acreditam que o aumento do estresse de parede na vasculatura de resistência de diabéticos ocorre devido a um tônus miogênico danificado o que deve ser um estímulo para a hipertrofia vascular (Schofield *et al.*, 2002). Já Pourageaud e De Mey acreditam que, fora o remodelamento externo, o aumento do fluxo sanguíneo e acompanhado de hipertrofia no intuito de normalizar o estresse de parede durante a expansão do vaso (Pourageaud e De Mey, 1997). Redução ou não alteração do estresse de parede esta relacionado com um balanço geométrico devido a uma maior espessura de parede em SHR (Qiu *et al.*, 1995; Intengan *et al.*, 1999; Briones *et al.*, 2003) e em ratos com alta idade (Briones *et al.*, 2007). Vale à pena notar que os grupos que observaram redução ou inalteração do estresse de parede também apresentaram aumento da espessura de parede o que não foi observado em nossos achados. Nós acreditamos que a tensão e estresse de parede estão aumentados nos animais diabéticos db/db em consequência de um maior diâmetro interno e isso é uma adaptação geométrica da vasculatura devido à inalteração da espessura de parede e contribui para a hipertrofia vascular.

A relação stress/strain é uma medida que depende da geometria do vaso e da complacência vascular e descreve a adaptação entre as forças que agem na parede da artéria mesentérica. Em geral, desvios para a esquerda na relação stress/strain funcionalmente descrevem um vaso rígido e menos complacente. Nossos resultados mostraram um desvio para a direita nas artérias dos animais diabéticos, indicando uma redução da rigidez e maior complacência dos vasos comparados com os controles. Esse resultado esta de acordo com o aumento da complacência das artérias de diabéticos apresentados por nos (Figura 6B). Esses achados são a primeira demonstração de aumento de complacência e redução da rigidez dos vasos de resistência de animais diabéticos desde que a maioria dos estudos tem mostrado ou um desvio para a esquerda (Kizu *et al.*, 2003; Briones *et al.*, 2007) ou inalteração

da relação stress/strain (Wigg *et al.*, 2004). Nós acreditamos que a redução da rigidez das artérias mesentéricas dos animais diabéticos seja em consequência de uma maior complacência dessas artérias. Esses achados podem estar relacionados a um desequilíbrio causado pelo aumento do estresse oxidativo em diabetes, em consequência da hiperglicemia, ou a um provável aumento do fluxo sanguíneo intestinal em consequência da obesidade.

5.4.4. Efeito da ação do estresse oxidativo e angiotensina II sobre as propriedades estruturais e mecânicas do terceiro ramo das artérias mesentéricas de camundongos diabéticos e não diabéticos

Uma vasculatura normal é caracterizada por fluxo laminar com uma liberação endotelial de óxido nítrico resultando em vasodilatação, inibição da adesão de plaquetas, menor mobilização de matriz e a não ativação de células musculares lisas vasculares. Em contraste, a doença vascular é caracterizada por uma resposta danosa que envolve mediadores, como a angiotensina, a induzir a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) celular que, em parte, vão mediar vasoconstrição, mobilização de matriz e um estado proliferativo das células musculares lisas vasculares. Hiperglicemia e aumento de ácidos graxos livres no plasma sanguíneo, características de DM2, levam a um escape de ânions superóxido pelo processo respiratório mitocondrial e ativação da NAD(P)H oxidase (Evans *et al.*, 2002). Este paradigma propõe que a doença vascular representa a desregulação da resposta a injúria vascular (Keaney, 2005). Devido ao fato da geração celular de ROS ser uma parte crítica dessa resposta o entendimento dos mecanismos responsáveis pela geração de ROS relacionados à injúria e consequente remodelamento vascular torna-se de considerável interesse.

Para identificar a ação do estresse oxidativo sobre o remodelamento nas artérias mesentéricas de resistência dos animais diabéticos e não diabéticos os animais foram tratados com dois tipos de antioxidantes. Primeiramente os animais foram tratados com um inibidor da NAD(P)H oxidase (Apocinina, 5 mM) para estabelecer se as espécies reativas do oxigênio eram produtos da formação de um dos maiores meios de produção de ânions superóxidos nos vasos (Gorlach *et al.*, 2000; Griending *et al.*, 2000; Lassegue e Clempus, 2003). Posteriormente os camundongos foram tratados com um mimético da superóxido dismutase, ou seja,

um varredor de radical livre permeável a membrana (Tempol, 1 mM) para avaliar a retirada direta dos ânions superóxidos celulares. Para analisar a ação da angiotensina II nas artérias mesentéricas de resistência os animais diabéticos e não diabéticos foram tratados com um inibidor do receptor AT-1 (Candesartan Cilexetil, 1 mg / kg / dia) durante 4 semanas na água de beber. Todos os experimentos foram realizados quando os animais estavam com 16 semanas de vida.

5.4.4.1 Medidas dos níveis de estresse oxidativo nos animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com antioxidantes

Antes de medir as ações dos antioxidantes nos animais diabéticos e não diabéticos os tecidos das artérias mesentéricas de resistência foram submetidos à ressonância eletroparamagnética (EPR) para que as espécies reativas de oxigênio fossem medidas através do marcador CMH. Uma reação rápida do ânion superóxido com o marcador CMH permite a detecção de ânion superóxido celular. CMH produz um estável nitróxido de CM que pode ser quantificado por EPR (Dikalov *et al.*, 2007)

As medidas foram realizadas nas artérias mesentéricas de resistência do animais dos grupos Controle (C), Diabético (db), Tempol Diabético (Tdb), Apocinina Diabético (Adb) e Candesartan Diabético (CANdb). Como mostra a Figura 8 os animais do grupo Diabético (8B) apresentaram aumento das espécies reativas de oxigênio quando comparados com o grupo Controle (8A). O aumento de estresse oxidativo apresentados pelos animais diabéticos foi reduzido pelos os tratamentos com Tempol (8C), Apocinina (8D) e Candesartan (8E). Resultados similares em camundongos db/db foram encontrados com os tratamentos com Tempol (San Martin *et al.*, 2007), Apocinina (Gao *et al.*, 2007) e Candesartan (Shao *et al.*, 2006).

Existem vários estudos demonstrando que pacientes diabéticos não possuem somente aumento dos níveis de marcadores circulantes para radicais livres mas também possuem menor defesa antioxidante (Seghrouchni *et al.*, 2002; Martin-Gallan *et al.*, 2003). Hiperglicemia causa varias mudanças bioquímicas, como aumento da atividade da via poliol, formação de AGEs a ativação da via PKC. Todas essas mudanças, incluindo a hiperglicemia por si só, podem resultar em produção de ROS e estresse oxidativo (He e King, 2004). Outros fatores circulantes que estão elevados em diabetes, como ácidos graxos livres e leptina, também contribuem para o aumento da geração das espécies reativas do oxigênio (Jay *et al.*, 2006).

A produção de ROS vascular tem sido associada a vários sistemas incluindo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, lipoxigenases, ciclooxigenase, xantina e glicose oxidase, NADPH oxidases, sintases do óxido nítrico, o citocromo P450, peroxidases e varias hemoproteínas (Wolin *et al.*, 2005). Entretanto, NADPH oxidases catalisam um elétron do oxigênio usando NADH ou NADPH como doador de elétron resultando na formação do radical ânion superóxido. Este processo tem sido bem reconhecido como o meio mais freqüente de geração de ROS em células vasculares (Gorlach *et al.*, 2000; Griendling *et al.*, 2000; Lassegue e Clempus, 2003).

Em camundongos geneticamente diabéticos (db/db) a expressão e atividade da eNOS é regulada através da produção mitocondrial, mediada pela glicose, de estresse oxidativo, mais uma vez mostrando a importância do estresse oxidativo na disfunção endotelial (redução da produção de NO) e conseqüentemente nas complicações vasculares (Srinivasan *et al.*, 2004).

Doença vascular é caracterizada por disfunção endotelial, remodelamento vascular, e, em muitos casos, desenvolvimento de placas e oclusão. Uma profunda resposta inflamatória local ocorre na vasculatura de animais diabéticos (db/db) e essa resposta inflamatória é em conseqüência de ambos, mecanismos dependentes e independentes das espécies reativas do oxigênio (Martin-Gallan *et al.*, 2003). Remodelamento induzido por alto fluxo em ratos Zucker obesos esta associado com excessiva produção de ânions superóxidos (Bouvet *et al.*, 2007). Em diabetes do tipo 1 um acelerado remodelamento vascular foi observado em conseqüência do aumento do estresse oxidativo (Sasaki *et al.*, 2008). Nós acreditamos que essas respostas inflamatórias, bem como o aumento do estresse oxidativo, em diabetes podem ser grande contribui dores do remodelamento da microvasculatura.

5.4.4.2 Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com Apocinina ou Tempol

5.4.4.2.1. Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede, relação média/lúmem e área da camada média dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina ou Tempol

A maioria dos estudos com antioxidantes em diabetes, tendo como alvo o sistema vascular, tem envolvido disfunção endotelial. Hiperglicemia está intimamente associada com disfunção endotelial in vivo e as espécies reativas do oxigênio parecem estarem envolvidas na mediação desta disfunção (Giugliano *et al.*, 1995; Nassar *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2007). Retinopatia, uma das complicações de DMT2, é acompanhada pelo aumento do estresse oxidativo, o tratamento com tempol e apocinina foi capaz de reduzir as complicações da retinopatia em DMT2 (Chen *et al.*, 2007). A administração de tempol e apocinina restaurou a dilatação dependente do endotélio em camundongos db/db (Gao *et al.*, 2007) e apenas tempol fez o mesmo em ratos tratados com STZ (Nassar *et al.*, 2002). Liu e colaboradores 2007 acreditam que a NADP(H) oxidase possui um papel importante nas doenças vasculares em diabetes mellitus (Liu *et al.*, 2007).

Embora as conseqüências da disfunção endotelial vascular e do estresse oxidativo em DMT2 já foram elucidadas pouco se sabe sobre a magnitude da influência do estresse oxidativo no remodelamento estrutural microvascular induzido por DMT2.

Apos 4 semanas de tratamento com Apocinina ou Tempol as respostas produzidas pelos grupos Apocinina Controle (Tabela 7; Figura 9) e Tempol Controle (Tabela 10; Figura 1) não foram significativamente diferentes das respostas apresentadas pelo grupo Controle (Tabela 4) e as respostas do grupo Apocinina Diabético e Tempol Diabético foram de mesma magnitude das do grupo Diabético (Tabela 4) para os parâmetros diâmetro interno e externos, espessura de parede e relação média/lúmem em todas as pressões estudadas. Os resultados nos mostraram que a redução do estresse oxidativo com o tratamento com Apocinina ou Tempol não afetaram o aumento dos diâmetros internos e externos e a redução da relação média/lúmem apresentados pelo grupo Diabético pois as mesmas respostas produzidas pelos grupos Controle e Diabético foram apresentadas pelos grupos tratados com Apocinina ou Tempol. A fim de saber se o tratamento com Apocinina ou com o antioxidante Tempol estavam alterando o remodelamento apresentado pelo grupo Diabético a área da camada média das artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos Apocinina e Tempol Controles e Apocinina e Tempol Diabéticos foi avaliada. A área da camada média das artérias do grupo Apocinina Diabético apresentaram significante aumento em todas as pressões estudadas quando comparadas com o grupo Apocinina Controle (Tabela 8; Figura

10A) e esses valores também não diferiram dos grupos Controle e Diabético (Tabela 5). Já a área da camada média das artérias do grupo Tempol Diabético não se mostraram significativamente maior do que no grupo Tempol Controle em todas as pressões estudadas (Tabela 11; Figura 13A) e esses valores também não diferiram dos grupos Controle e Diabético (Tabela 5). Provavelmente não houveram diferenças entre os grupos tratados com Tempol devido ao fato dos valores do grupo Tempol Controle estarem um pouco, mas não significativamente, maiores que o grupo Controle.

E bem sabido que a inibição da NAD(P)H oxidase com apocinina incrementa a dilatação dependente do endotélio em DMT2 o que previne disfunção endotelial (Gao *et al.*, 2007; San Martin *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008), mas a participação deste inibidor no remodelamento vascular em diabetes não é bem conhecida. Tempol reduziu a produção de ânion superóxido, induzido pela angiotensina II, em artérias aortas e em consequência reverteu parcialmente às respostas hipertróficas do músculo liso vascular de camundongos (Dikalova *et al.*, 2005). Tempol também preveniu a progressão da hipertensão através da redução do remodelamento vascular e da concentração de ânion superóxido (Park *et al.*, 2002).

Em nossos estudos a redução do estresse oxidativo não foi capaz de reduzir o diâmetro interno e a área da camada média que estavam aumentados nos animais diabéticos. Como o aumento desses dois parâmetros são indicativos de remodelamento hipertrófico externo em vasos, o tratamento com Apocinina ou Tempol não foram capazes de reverter o remodelamento apresentado pelos camundongos diabéticos. Isso indica que o estresse oxidativo não está envolvido no remodelamento hipertrófico externo produzido no terceiro ramo das artérias mesentéricas de resistência de camundongos diabéticos com 16 semanas de idade, tratados com os antioxidantes por 4 semanas.

5.4.4.2.2. Medidas de complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina ou Tempol

A complacência da artéria mesentérica em função da pressão intravascular se apresentou aumentada nos grupos Apocinina e Tempol Diabético em respectiva relação aos grupos Apocinina e Tempol Controle nas pressões intravasculares de 25, 50, 75 e 125 mm Hg mas não na pressão de 100 mm Hg (Tabela 8; Figura 10B e

Tabela 11; Figura 13B), entretanto não houveram diferenças entre os grupos Apocinina e Tempol Controle e Controle nem dos grupos Apocinina e Tempol Diabético e Diabético (Tabela 5). As medidas de distensibilidade não se mostraram diferentes entre os grupos Apocinina e Tempol Controle e Apocinina e Tempol Diabético, respectivamente, em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 8; Figura 10C e Tabela 11; Figura 13C) e nem entre esses grupos e os correspondentes Controle e Diabético (Tabela 5).

Na artéria braquial de paciente com DMT2 o tratamento com o antioxidante Vitamina E também não foi capaz de alterar a complacência e distensibilidades encontrados inicialmente (Paolisso *et al.*, 2000). Em pacientes dislipidêmicos a redução do colesterol foi capaz de reduzir o estresse oxidativo o que promoveu uma melhora na distensibilidade das artérias de condutância (Pirro *et al.*, 2007). O tratamento com Tempol em ratos expostos a hipóxia não melhorou a reduzida distensibilidade das artérias femorais (Phillips *et al.*, 2006).

Em nossos achados a redução do estresse oxidativo pela inibição da NAD(P)H oxidase ou pelo varredor de radical livre, Tempol não foi capaz de normalizar a complacência que estava aumentada nos animais diabéticos. Nenhum estudo comparável ao nosso foi encontrado na literatura, é a primeira vez que esses parâmetros estão sendo analisados nas artérias mesentéricas de camundongos db/db tratados com o antioxidante Tempol. O aumento da complacência apresentado pelos animais diabéticos provavelmente não está relacionado com o aumento do estresse oxidativo que acompanha esses animais.

A complacência e distensibilidade vasculares refletem propriedades elásticas e função de proteção dos vasos e são determinadas pelo lúmen vascular e massa, respectivamente (Yin e Ting, 1992; Van Bortel *et al.*, 1995). Como o tratamento com antioxidantes não foi capaz de reduzir o diâmetro interno aumentado dos animais diabéticos e nem de alterar a espessura de parede (massa) nós não esperávamos que os tratamentos com apocinina e tempol fossem também capazes de reduzir a complacência vascular.

5.4.4.2.3. Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Apocinina ou Tempol

A tensão de parede se mostrou significativamente maior nos animais do grupo Apocinina Diabético (Tabela 9; Figura 11A) e Tempol Diabético (Tabela 12; Figura 14A) quando respectivamente comparados com o grupo Apocinina e Tempol Controles em todas as pressões estudadas e esses valores não diferiram dos correspondentes Diabético e Controle (Tabela 6). O mesmo ocorreu com o estresse de parede em todas as pressões estudadas para Apocinina (Tabela 9; Figura 11B) que também não se diferiram dos correspondentes Controle e Diabético (Tabela 6). O tratamento com Tempol normalizou o estresse de parede somente nas pressões 25 e 50 mm Hg mas não foi capaz de normalizar nas outras pressões estudadas (Tabela 12 Figura 14B). O tratamento com Tempol também não foi capaz de diminuir o estresse de parede apresentado pelas artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos nas pressões 50, 75 e 100 mmHg.

O aumento do estresse de parede em diabetes deve ser um estímulo para hipertrofia vascular, ou a hipertrofia é produzida na tentativa de reduzir o estresse de parede (Pourageaud e De Mey, 1997; Schofield *et al.*, 2002). Em hipertensão, o aumento da tensão de parede tem um papel importante no remodelamento vascular devido a efeitos bioquímicos do estresse oxidativo e do aumento da expressão do fator de crescimento transformador (TGF- β) (Prado e Rossi, 2006). O grupo do Tahvanainen 2006 acredita que o aumento da tensão de parede em artérias mesentéricas de animais hipertensos ocorreu em consequência de hipertrofia vascular (Tahvanainen *et al.*, 2006).

Os tratamentos com Apocinina ou Tempol não foram capazes de reduzir o estresse e tensão de parede das artérias mesentéricas de resistência de camundongos diabéticos, muito menos de reduzir a hipertrofia nesses vasos. Infelizmente a maioria das pesquisas envolvendo estresse e tensão de parede são em hipertensão e as pesquisas encontradas em diabetes não estão relacionadas com tratamentos com antioxidantes, o que leva a uma limitação na discussão desses parâmetros com os nossos dados.

A relação stress/strain é uma medida que depende da geometria da complacência vascular e descreve a adaptação entre as forças que agem na parede

da artéria mesentérica. Em artérias mesentéricas de resistência de ratos STZ (diabetes tipo 1) o tratamento com o antioxidante vitamina E não alterou a relação stress/strain (Wigg *et al.*, 2004). O tratamento com tempol também não foi capaz de alterar a relação stress/strain em artérias de animais expostos a hipóxia (Phillips *et al.*, 2006).

As curvas de stress/strain dos grupos Apocinina e Tempol Controles e Apocinina e Tempol Diabéticos se encontram exatamente entre as curvas dos grupos Controle e Diabético não demonstrando significativo deslocamento. Nós acreditamos que o tratamento com Apocinina ou Tempol não foram capazes de normalizar a redução da rigidez apresentada pelas artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos pois também não reduziram a alta complacência nesses vasos.

5.4.4.3. Respostas estruturais e mecânicas das artérias mesentéricas de resistência ao tratamento com o bloqueador AT-1 Candesartan

5.4.4.3.1. Medidas de diâmetros interno e externo, espessura de parede, relação média/lúmen e área da camada média dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan

A participação da angiotensina II também foi avaliada neste estudo através da utilização de um inibidor do receptor de angiotensina II (receptor AT-1) através do uso de Candesartan na água de beber por 4 semanas. O diâmetro interno do grupo diabético tratado com Candesartan (Tabela 13; Figura 15A) em comparação com o grupo Candesartan Controle aumentou significativamente em todas as pressões estudadas na mesma magnitude do diâmetro interno do grupo Diabético (Tabela 4). Todavia o diâmetro interno do grupo Candesartan Controle aumentou significativamente em comparação ao grupo Controle nas pressões 75, 100 e 125 mm Hg (Figura 15A). O mesmo ocorrido no diâmetro interno ocorreu no diâmetro externo (Tabela 13; Figura 15B) entretanto o diâmetro externo do grupo Candesartan Controle aumentou significativamente em comparação ao grupo Controle em todas as pressões estudadas (Figura 15B). Nós acreditamos que este aumento do diâmetro interno em altas pressões apresentado pelo grupo Candesartan Controle ocorreu devido ao fato da retirada do vasoconstrictor

angiotensina II e isso não ocorreu com o grupo Candesartan Diabético porque as artérias mesentéricas dos animais diabéticos devem estar no seu aumento máximo de diâmetro interno devido ao remodelamento hipertrófico externo apresentado por esses animais. O aumento do diâmetro externo em todas as pressões apresentado pelo grupo Candesartan Controle ocorreu não só devido ao fato da retirada do vasoconstrictor angiotensina II mas também porque a parede dos grupos tratados com Candesartan se apresentaram um pouco aumentadas em relação aos grupos Controle e Diabético, mesmo que não significantes (Tabela 13; Figura 15C). Devido ao pequeno, mas não significativo, aumento da espessura de parede a relação média/lúmen não se mostrou significativa nas pressões 25 e 50 mm Hg entre os grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético mas estava significativa nas pressões 75, 100 e 125 mm Hg (Tabela 13; Figura 15D).

Para observar a participação da angiotensina II no remodelamento exibido pelos animais do grupo Diabético a área da camada média das artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético foi avaliada. A área da camada média do grupo Candesartan Diabético não se mostrou diferente das do grupo Candesartan Controle em todas as pressões estudadas (Tabela 14; Figura 16A) e nem diferente das do grupo Diabético (Tabela 5). Não houveram diferenças entre a área da camada média entre os grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético porque a retirada da angiotensina também proporcionou uma maior área da média nos animais Candesartan Controle em comparação com o grupo Controle (Tabela 5) nas pressões 50, 100 e 125 mm Hg (Figura 16A).

Uma explicação para as respostas de maior diâmetro interno, maior diâmetro externo e maior área da camada média apresentadas pelos animais controles tratados com candesartan seria devido ao fato de que o sistema renina-angiotensina sofre uma upregulation nos camundongos db/db (Chu e Leung, 2007). Portanto quando o fator contrátil angiotensina II foi retirado um aumento dos diâmetros e área da camada média foram apresentados, na mesma magnitude, em ambos os grupos (Candesartan Controle e Candesartan Diabético) mas esse aumento só se mostrou significativo entre os grupos Controle e Candesartan Controle. Eto e colaboradores (2003) observaram que o tratamento por 8 semanas com candesartan reduziu significativamente o acúmulo de colágeno e elastina (Eto *et al.*, 2003). Por isso, outra explicação plausível seria devido ao fato do tratamento com candesartan reduzir o

acúmulo de colágeno e com isso permitir com que o vaso sofra uma maior expansão. O presente trabalho não realizou medidas de colágeno.

O tratamento com candesartan por 24 semanas reduziu a hipertrofia arterial em pacientes com hipertensão (Spratt *et al.*, 2001). O tratamento com o bloqueador AT-1, TCV-116, reduziu não só a hipertrofia vascular mas também a hipertrofia do ventrículo esquerdo e o mais interessante e que a dose de TCV-116 requerida para a redução da hipertrofia vascular foi significativamente maior do que a dose para a hipertrofia cardíaca levando o autor a concluir que a hipertrofia vascular deve ser menos dependente de pressão do que hipertrofia cardíaca (Obayashi *et al.*, 1999). Este fato é de tremenda importância para o nosso estudo porque talvez se em nossos experimentos nos tivéssemos administrado uma maior dose de candesartan ou por um período de tempo prolongado poderíamos eventualmente ter achado redução da hipertrofia vascular nos camundongos diabéticos. Apesar de algumas respostas estarem aumentadas no grupo Candesartan Controle nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos Candesartan Diabético e Diabético, mostrando que o tratamento com candesartan não foi capaz de reduzir o remodelamento apresentado pelos camundongos diabéticos. Provavelmente o remodelamento hipertrófico externo nas artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos também não está relacionado com as vias da angiotensina II agindo nos receptores AT-1.

5.4.4.3.2. Medidas de complacência e distensibilidade dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan

Estudos clínicos indicam que inibidores da ECA e dos receptores AT-1 possuem mais efeitos benéficos na complacência vascular do que antagonistas de cálcio, β - bloqueadores e diuréticos, fora a redução da pressão arterial causada por essas drogas (Mcfarlane *et al.*, 2003).

A complacência da artéria mesentérica em função da pressão intravascular se apresentou aumentada no grupo Candesartan Diabético em relação ao grupo Candesartan Controle nas pressões intravasculares de 25, 50 e 125 mm Hg mas não nas pressões de 75 e 100 mm Hg (Tabela 14; Figura 16B), entretanto não houveram diferenças entre os grupos Candesartan Controle e Controle nem dos grupos Candesartan Diabético e Diabético (Tabela 5). As medidas de distensibilidade não se mostraram diferentes entre os grupos Candesartan Controle

e Candesartan Diabético em nenhuma das pressões estudadas (Tabela 14; Figura 16C) e nem entre esses grupos e os correspondentes Controle e Diabético (Tabela 5).

O bloqueio do receptor AT-1 pelo tratamento com losartan aumentou a complacência arterial durante o exercício em pacientes com síndrome metabólica (Nashar *et al.*, 2004). Ito e colaboradores (2002) afirmaram que o tratamento com candesartan em ratos espontaneamente hipertensos não está diretamente relacionado com a redução da pressão arterial mas com uma normalização da espessura de parede arterial levando a um aumento da complacência (Ito *et al.*, 2002). O bloqueio da angiotensina II pela inibição do receptor AT-1 não foi capaz de normalizar a complacência que estava aumentada nos animais diabéticos mas manteve a distensibilidade inalterada entre os grupos. Em nosso caso como a complacência das artérias mesentéricas dos animais diabéticos já está significativamente aumentada nos acreditamos que a matriz extracelular esteja limitando uma maior dilatação e complacência nesses vasos.

5.4.4.3.3. Medidas de tensão de parede, estresse de parede e relação stress/strain nos animais diabéticos e não diabéticos tratados com Candesartan

A Tabela 15 e Figura 17A mostram que a tensão de parede se mostrou significativamente maior nos animais do grupo Candesartan Diabético quando comparados com o grupo Candesartan Controle em todas as pressões estudadas e esses valores não diferiram dos correspondentes Diabético e Controle (Tabela 6). O mesmo ocorreu com o estresse de parede nas pressões 75, 100 e 125 mm Hg (Tabela 15; Figura 17B) que também não se diferiram dos correspondentes Controle e Diabético (Tabela 6). Já que a tensão e estresse de parede dependem da pressão transmural, do raio e da espessura de parede nos túbulos vasculares (Glagov *et al.*, 1992) e como a pressão transmural é sempre a mesma estipulada por nós (25 – 125 mm Hg) e a espessura de parede não foi significativamente diferente entre nenhum dos grupos estudados, tanto a tensão como o estresse de parede estão diretamente relacionados com o raio, ou seja, relacionados com o diâmetro interno. O tratamento com candesartan não foi capaz de reduzir o maior diâmetro interno dos

camundongos diabéticos e conseqüentemente não normalizou o aumento de tensão e estresse de paredes apresentados pelo grupo Diabético.

As curvas de stress/strain dos grupos Candesartan Controle e Candesartan Diabético se encontram entre as curvas dos grupos Controle e Diabético não demonstrando significativo deslocamento (Tabela 15; Figura 17C). O tratamento com candesartan e outros anti-hipertensivos reduziram substancialmente e na mesma magnitude a rigidez arterial (Spoelstra-De Man *et al.*, 2006). Esses resultados estão de acordo com outro grupo que mostrou somente uma melhora na rigidez arterial quando utilizou altas doses de candesartan (Shargorodsky *et al.*, 2008). Em nossos resultados a redução da rigidez na artéria mesentérica de camundongos diabéticos esta em acordo com uma maior complacência apresentada por esses animais. O tratamento com candesartan por 4 semanas na água de beber não foi capaz de alterar a complacência das artérias mesentéricas dos camundongos diabéticos e conseqüentemente também não alterou a relação stress/strain apresentada por esses animais.

O tratamento com candesartan parece ser bem efetivo em hipertensão e diabetes não só pela redução da pressão arterial mas também devido à alteração estrutural de parede vascular e redução do acúmulo de colágeno com conseqüente diminuição do acúmulo de matriz extracelular. Em nossos estudos a dose de 1 mg/kg/ dia de candesartan na água de beber por 4 semanas não produziu alterações significantes no remodelamento vascular de artérias mesentéricas de camundongos diabéticos nem nas propriedades mecânicas passivas dessas artérias. As mesmas respostas foram produzidas apos o tratamento com o inibidor da NAD(P)H oxidase Apocinina (5 mM) e com o antioxidante Tempol (1 mM) nas mesmas condições. O remodelamento hipertrófico externo nas artérias mesentéricas de camundongos com DMT2 não ocorre em conseqüência do estresse oxidativo e também não está relacionado com as vias da angiotensina II agindo nos receptores AT-1 quando estes animais estavam com 16 semanas de idade e tratados por 4 semanas.

5.5. Expressão das proteínas regulatórias de matriz extracelular (ECM) e de fatores de crescimento em tecidos de artérias mesentéricas de resistência de animais diabéticos e não diabéticos

DMT2 é uma condição que está associada com várias toxicidades metabólicas e crônico estímulo a injúria. O desequilíbrio desses fatores leva a diversos processos tóxicos e ao desequilíbrio da resposta da matriz extracelular (ECM) resultando em remodelamento vascular (Hayden *et al.*, 2005). Para determinar se o desequilíbrio das proteínas regulatórias da matriz estava envolvido nas alterações da parede dos camundongos diabéticos db/db nós realizamos análise de western blot para verificar a expressão de algumas dessas proteínas.

Os mecanismos moleculares que levam ao acúmulo e turnover de ECM em artérias de resistência de diabéticos não foram extensivamente estudados. O remodelamento da ECM é influenciado por ambos, forças hemodinâmicas e fatores extrínsecos, bem como hiperglicemia, citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e fatores de crescimento (Zieman *et al.*, 2005). No presente estudo, o remodelamento da parede vascular de artérias mesentéricas foi acompanhado de mudanças nas proteínas regulatórias de matriz resultando em provável acúmulo da ECM e aumento da complacência vascular. Isto foi de certa forma surpreendedor, desde que o acúmulo de matriz é postulado ser associado à rigidez vascular e remodelamento eutrófico (Arribas *et al.*, 2006). Nós não medimos colágeno, mas acreditamos que exista um maior acúmulo de colágeno do tipo 3 que é mais elástico do que de colágeno do tipo 1 que é mais rígido. Além disso, o concomitante aumento de ambas, moléculas pro-fibróticas e anti-fibróticas é indicativo de dinâmico turnover de matriz e remodelamento levando a um desequilíbrio que favorece a deposição de ECM. Amostras de plasma e urina de pacientes diabéticos mostra um importante aumento de MMPs e TIMPs, refletindo um anormal metabolismo de ECM (Derosa *et al.*, 2007; Thraillkill *et al.*, 2007).

A expressão de MMP-2 e MMP-9 parece ser regulada por estresse oxidativo, uma vez que eles são ativados por espécies reativas do oxigênio (ROS) (Rajágopalan, Meng *et al.*, 1996). Foi demonstrado em nossos resultados que a expressão de MMP-9 estava aumentada em camundongos diabéticos comparados com controles (Figura 18B) o que pode ser em consequência do aumento do estresse oxidativo mostrado pelos diabéticos (Figura 8). Não houve significante

diferença na expressão de MMP-2 entre os grupos Controle e Diabético (Figura 18A).

É sabido que diabetes tipo 2 é uma condição inflamatória (Hoatamisligil et al, 1993). MMP-12 não somente digere elastina mas também degrada membrana basal, o que permite a penetração de macrófagos nos tecidos durante um processo inflamatório (Gronski *et al.*, 1997). Uemura e colaboradores (2001) demonstraram um aumento da atividade e expressão de MMP-9 em células endoteliais durante hiperglicemia (Uemura *et al.*, 2001). MMP-9 e MMP-12 podem hidrolisar elastina, o que deve facilitar a resposta pro-inflamatória na parede do vaso (Hayden *et al.*, 2005). No presente estudo MMP-12 estava aumentada no grupo Diabético em comparação ao grupo Controle (Figura 18C), isso deve ter ocorrido devido à condição inflamatória apresentada fisiologicamente pelos animais diabéticos. Outra consideração importante é que MMP-2 é considerada uma enzima constitutiva e MMP-9 uma enzima induzível em diferentes tipos de células. Essa consideração pode explicar o fato de que em nossos resultados MMP-9 estava altamente expressada pelos tecidos vasculares dos animais diabéticos e MMP-2 não estava. Por ser uma enzima constitutiva e estar sempre presente no tecido vascular talvez medidas tardias da expressão de MMP-2, ou seja, além de 16 semanas de idade, possam se mostrar altamente expressivas no tecido vascular dos animais diabéticos, uma vez que a ECM está em processo de rearranjo. Death e colaboradores (2003) demonstraram alta expressão e atividade de MMP-2 e MMP-9 em células endoteliais e monócitos derivados de macrófagos sob influência de altos níveis de glicose em relevantes concentrações diabéticas (Death *et al.*, 2003). A alta expressão de MMPs indica uma tendência a uma maior degradação da ECM.

O balanço entre matriz metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs) possui um importante papel no remodelamento vascular (Nagase et al, 1999). Um distúrbio nesse balanço entre MMPs e TIMPs podem levar ao excesso de acúmulo ou degradação de ECM (Kenichi *et al.*, 2004). Mudanças na atividade e expressão de MMPs ou no balanço com os seus inibidores naturais (TIMPs) deve contribuir para o remodelamento de artérias de resistência através da modulação da composição da ECM (Brassard *et al.*, 2005). Nossos experimentos mostraram que as expressões de TIMPs 1 e 2 aumentaram significativamente nos animais diabéticos quando comparados aos controles (Figura 19). O aumento da expressão de TIMPs representa a sua ação pro-fibrótica o que leva a uma maior tendência ao

acúmulo de ECM, provavelmente na tentativa de balancear a degradação da ECM pelo aumento da expressão de MMPs.

O pro-fibrótico inibidor de ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) está aumentado em diabetes, resistência a insulina e hipertensão (McFarlane *et al.*, 2003). O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) também é um mediador chave do acúmulo de ECM em rins de animais diabéticos e sua síntese é aumentada em situações de alta glicose. TGF- β também estimula a síntese de PAI-1 (Peters *et al.*, 1998; Alessi *et al.*, 2000). Nossos experimentos demonstraram aumento da expressão de ambos, TGF- β e PAI-1, pelos animais do grupo diabético quando comparados com os camundongos do grupo Controle (Figura 20). De acordo com os nossos resultados Samad e colaboradores (1997) observaram níveis elevados na expressão de TGF- β em tecido adiposo de camundongos obesos e sugeriram que esse aumento ocorreu em consequência do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) o que levou a um aumento dos níveis de PAI-1 (Samad *et al.*, 1997). Camundongos obesos apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 associado com aumento da expressão de PAI-1 em tecido adiposo o que sugere uma contribuição específica desse tecido no aumento dos níveis plasmático de PAI-1 (Samad e Loskutoff, 1996). Um grande suporte para a presença de PAI-1 em tecido adiposo é que a perda de peso secundária a restrição calórica ou procedimento cirúrgico é associada com redução da atividade de PAI-1 (Primrose *et al.*, 1992). Outra importante consideração para os nossos estudos é que os níveis de PAI-1 circulantes tem sido mostrados ser um alvo induzível controlado por resistência a insulina associada à obesidade (Juhan-Vague *et al.*, 1991). O aumento da expressão de TGF- β e PAI-1 no tecido vascular de camundongos diabéticos leva a um aumento do acúmulo de ECM juntamente com o aumento dos outros fatores pro-fibróticos TIMP-1 e TIMP-2 que vão contra a ação anti-fibrótica em consequência do aumento das MMPs tendenciando a degradação da ECM.

O aumento da expressão de PAI-1 e TGF- β em nossos estudos deve ter ocorrido em consequência de hiperinsulinemia, resistência a insulina e obesidade levando a um acúmulo de matriz extracelular e desequilíbrio do balanço MMPs/TIMPs. Futuros estudos se fazem necessários para determinar a relação entre o remodelamento da matriz e as propriedades mecânicas das artérias mesentéricas de resistência no modelo db/db.

5.6. Associação do fluxo sanguíneo com o remodelamento hipertrófico externo das artérias mesentéricas de resistência de camundongos diabéticos db/db

Em resumo, constatamos que as artérias mesentéricas de resistência de camundongos diabéticos apresentam remodelamento hipertrófico externo e que o estresse oxidativo e as vias da angiotensina II não estão envolvidas neste processo de remodelamento. É tentador especular que nesse leito vascular existe a influência de um aumento do fluxo sanguíneo secundário a uma polifagia apresentada por esses camundongos db/db obesos. Este alto fluxo sanguíneo deve estar compensando a influência da inflamação, estresse oxidativo e hiperglicemia que, como já foi discutido anteriormente, governam o remodelamento vascular em diabetes.

Alterações estruturais na parede de pequenas artérias são um dos maiores preceptores de evento cardiovascular em populações de alto risco (Rizzoni *et al.*, 2003). Artérias mesentéricas de resistência consistem em pequenas artérias e arteríolas que são usadas para o estudo de doenças microvasculares. Cooper e colaboradores (2004) mostraram que a árvore vascular mesentérica apresenta hipertrofia após 3 semanas de diabetes experimental induzida pelo tratamento com streptozotocina (STZ) (Cooper *et al.*, 1994). Hipertrofia de parede sem alteração de diâmetro interno também foi encontrada em pequenas artérias de pacientes com DMT2 (Schofield *et al.*, 2002) bem como em ratas em idade fisiológica avançada (Moreau *et al.*, 1998). O remodelamento vascular se apresenta diferente dependendo do modelo animal e do leito vascular estudado. Um exemplo é que o remodelamento eutrófico externo foi observado em ratos STZ (Crijns *et al.*, 1999). Já ratos com idade fisiológica avançada apresentaram remodelamento hipertrófico externo seguido de hiperplasia celular (Laurant *et al.*, 2004; Briones *et al.*, 2007). Este último tipo de remodelamento também foi observado depois de 7 dias de exposição crônica a um alto fluxo sanguíneo sem alterações de espessura de parede (Tulis *et al.*, 1998) ou seguido de um aumento da espessura de parede após 4 semanas de exposição a alto fluxo (Pourageaud e De Mey, 1997). De acordo com os últimos exemplos nossos resultados também demonstraram remodelamento hipertrófico externo sem alterações de espessura de parede em artérias mesentéricas de camundongos diabéticos com 16 semanas de idade.

Espessura, composição e arquitetura da parede arterial, incluindo espessura e composição da íntima, são normalmente determinados por estresses impostos por pressão e fluxo (Glagov *et al.*, 1992). Devido ao fato de que não encontramos diferenças na pressão arterial nós assumimos que o fluxo sanguíneo deve estar aumentado no leito mesentérico o que deve estar causando nossos parâmetros arquiteturais vasculares. Dando ainda mais suporte para os nossos dados 2 grupos mostraram que o fluxo sanguíneo para o intestino estava aumentado em diabetes mellitus experimental (Korthuis *et al.*, 1987; Hill e Larkins, 1989). Friedman e Ramirez (1994) acreditam que o fluxo sanguíneo está aumentado para a área mesentérica devido a uma marcada hiperfagia presente em animais diabéticos (Friedman e Ramirez, 1994). Todos esses fatos são estímulos bem aceitáveis para o remodelamento hipertrófico externo.

Vários grupos têm mostrado remodelamento hipertrófico externo em artérias de resistência como resultado de um aumento crônico do fluxo sanguíneo (Zarins *et al.*, 1987; Unthank *et al.*, 1996; Pourageaud e De Mey, 1997; Tulis *et al.*, 1998; Tuttle *et al.*, 2001). Devido ao fato dos camundongos diabéticos db/db's serem obesos desde 4 semanas de idade e apresentarem polifagia nós acreditamos que o remodelamento hipertrófico externo pode ser primeiramente causado por um aumento do fluxo sanguíneo e shear stress para o leito mesentérico. A explicação para o remodelamento induzido por alto fluxo sanguíneo deve ser pela presença de um alto shear stress com conseqüente liberação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio. Tronc e colaboradores (1996) observaram que a inibição de NO por L-NAME reduziu os efeitos do alto fluxo em artéria carótida comum (Tronc *et al.*, 1996). Já o Koller (2006) especulou em sua pesquisa que a liberação de NO induzida por um alto shear stress inibiu transglutaminases teciduais (tTG), resultando em remodelamento hipertrófico por permitir a quebra do cross-linking proteína-proteína da ECM (Koller, 2006). Algumas possibilidades para o remodelamento hipertrófico externo devem ser consideradas: 1) Quando a vasodilatação é cronicamente mantida a alta concentração dos fatores vasodilatadores derivados do endotélio leva a um remodelamento externo; 2) O remodelamento externo pode ser em conseqüência da hipertrofia arterial resultante de um elevado estresse de parede; 3) Respostas endoteliais induzidas por shear stress incluem liberação de vasodilatadores bem como liberação de moduladores da ECM, como por exemplo o TGF- β e 4) A

vasodilatação pode não ser suficiente e um alternativo e lento processo estrutural é ativado com o intuito de normalizar shear stress (De Mey *et al.*, 2005).

Contudo mesmo não tendo feito medidas do fluxo sanguíneo intestinal dos camundongos Diabéticos e Controles o remodelamento hipertrófico externo parece refletir uma resposta integrada da combinação de hemodinâmica regional, resistência a insulina, hiperglicemia, inflamação e obesidade.

VI. Conclusão

As artérias mesentéricas de resistência de camundongos diabéticos db/db apresentam remodelamento hipertrófico externo que é acompanhado de alta complacência e estresse de parede.

O estresse oxidativo não está envolvido no remodelamento das artérias mesentéricas de camundongos db/db com 16 semanas de idade tratados por 4 semanas com antioxidantes.

O remodelamento hipertrófico externo parece refletir uma resposta integrada da combinação de hemodinâmica regional, inflamação e obesidade.

Mudanças no balanço entre fatores anti e pro-fibróticos resultaram no acúmulo da matriz extracelular provavelmente na tentativa de limitar o remodelamento hipertrófico externo.

VII. Referências bibliográficas

Adrian, M., Laurant, P. e Berthelot, A. Effect of magnesium on mechanical properties of pressurized mesenteric small arteries from old and adult rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.31, n.5-6, May-Jun, p.306-13. 2004.

Alessi, M. C., Bastelica, D., Morange, P., Berthet, B., Leduc, I., Verdier, M., Geel, O. e Juhan-Vague, I. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. **Diabetes**, v.49, n.8, Aug, p.1374-80. 2000.

Ammarguella, F. Z., Gannon, P. O., Amiri, F. e Schiffrin, E. L. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. **Hypertension**, v.39, n.2 Pt 2, Feb, p.679-84. 2002.

Arribas, S. M., Hinek, A. e Gonzalez, M. C. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. **Pharmacol Ther**, v.111, n.3, Sep, p.771-91. 2006.

Aruoma, O. I. e Halliwell, B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? **Biochem J**, v.241, n.1, Jan 1, p.273-8. 1987.

Astrup, A. e Finer, N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? **Obes Rev**, v.1, n.2, Oct, p.57-9. 2000.

Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K. e Timpl, R. Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. **Eur J Biochem**, v.184, n.1, Sep 1, p.241-8. 1989.

Bagi, Z., Erdei, N., Toth, A., Li, W., Hintze, T. H., Koller, A. e Kaley, G. Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-derived constrictor prostaglandins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.8, Aug, p.1610-6. 2005.

Bagi, Z., Koller, A. e Kaley, G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.286, n.2, Feb, p.H742-8. 2004.

Baumbach, G. L. e Heistad, D. D. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. **Hypertension**, v.13, n.6 Pt 2, Jun, p.968-72. 1989.

Beck-Nielsen, H., Vaag, A., Poulsen, P. e Gaster, M. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects--experiences from relatives and twin studies. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.17, n.3, Sep, p.445-67. 2003.

Belmadani, S., Palen, D. I., Gonzalez-Villalobos, R. A., Boulares, H. A. e Matrougui, K. Elevated epidermal growth factor receptor phosphorylation induces resistance artery dysfunction in diabetic db/db mice. **Diabetes**, v.57, n.6, Jun, p.1629-37. 2008.

Biegelsen, E. S. e Loscalzo, J. Endothelial function and atherosclerosis. **Coron Artery Dis**, v.10, n.4, Jun, p.241-56. 1999.

Bohlen, H. G. e Nase, G. P. Arteriolar nitric oxide concentration is decreased during hyperglycemia-induced beta1 PKC activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.280, n.2, Feb, p.H621-7. 2001.

Border, W. A. e Noble, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **N Engl J Med**, v.331, n.19, Nov 10, p.1286-92. 1994.

Bosman, F. T. e Stamenkovic, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J Pathol**, v.200, n.4, Jul, p.423-8. 2003.

Bouvet, C., Belin De Chantemele, E., Guihot, A. L., Vessieres, E., Bocquet, A., Dumont, O., Járdel, A., Loufrani, L., Moreau, P. e Henrion, D. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. **Hypertension**, v.50, n.1, Jul, p.248-54. 2007.

Brassard, P., Amiri, F. e Schiffrin, E. L. Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. **Hypertension**, v.46, n.3, Sep, p.598-606. 2005.

Briones, A. M., Gonzalez, J. M., Somoza, B., Giraldo, J., Daly, C. J., Vila, E., Gonzalez, M. C., Mcgrath, J. C. e Arribas, S. M. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. **J Physiol**, v.552, n.Pt 1, Oct 1, p.185-95. 2003.

Briones, A. M., Salaices, M. e Vila, E. Mechanisms underlying hypertrophic remodeling and increased stiffness of mesenteric resistance arteries from aged rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.62, n.7, Jul, p.696-706. 2007.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.813-20. 2001.

Bund, S. J. e Lee, R. M. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. **J Vasc Res**, v.40, n.6, Nov-Dec, p.547-57. 2003.

Buus, C. L., Pourageaud, F., Fazzi, G. E., Jánssen, G., Mulvany, M. J. e De Mey, J. G. Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. **Circ Res**, v.89, n.2, Jul 20, p.180-6. 2001.

Calkin, A. C., Giunti, S., Sheehy, K. J., Chew, C., Boolell, V., Rajáram, Y. S., Cooper, M. E. e Jándeleit-Dahm, K. A. The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein E-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced

glycation, oxidativo stress and inflammation. **Diabetologia**, v.51, n.9, Sep, p.1731-40. 2008.

Cangemi, C., Lombardo, G. e Sinagra, D. [Insulin resistance: related clinical syndromes]. **Recenti Prog Med**, v.84, n.7-8, Jul-Aug, p.541-50. 1993.

Cardillo, C., Nambi, S. S., Kilcoyne, C. M., Choucair, W. K., Katz, A., Quon, M. J. e Panza, J. A. Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm. **Circulation**, v.100, n.8, Aug 24, p.820-5. 1999.

Ceiler, D. L. e De Mey, J. G. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester treatment does not prevent flow-induced remodeling in mesenteric feed arteries and arcading arterioles. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, n.9, Sep, p.2057-63. 2000.

Chance, B., Sies, H. e Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, v.59, n.3, Jul, p.527-605. 1979.

Chen, P., Guo, A. M., Edwards, P. A., Trick, G. e Scicli, A. G. Role of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.293, n.4, Oct, p.R1619-29. 2007.

Chou, E., Suzuma, I., Way, K. J., Opland, D., Clermont, A. C., Naruse, K., Suzuma, K., Bowling, N. L., Vlahos, C. J., Aiello, L. P. e King, G. L. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. **Circulation**, v.105, n.3, Jan 22, p.373-9. 2002.

Chu, K. Y. e Leung, P. S. Angiotensin II Type 1 receptor antagonism mediates uncoupling protein 2-driven oxidativo stress and ameliorates pancreatic islet beta-cell function in young Type 2 diabetic mice. **Antioxid Redox Signal**, v.9, n.7, Jul, p.869-78. 2007.

Coleman, D. L. e Hummel, K. P. Symposium IV: Diabetic syndrome in animals. Influence of genetic background on the expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. II. Studies on background modifiers. **Isr J Med Sci**, v.11, n.7, Jul, p.708-13. 1975.

Cooper, M. E. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. **Am J Hypertens**, v.17, n.11 Pt 2, Nov, p.16S-20S; quiz A2-4. 2004.

Cooper, M. E., Rumble, J., Komers, R., Du, H. C., Jándeleit, K. e Chou, S. T. Diabetes-associated mesenteric vascular hypertrophy is attenuated by angiotensin-converting enzyme inhibition. **Diabetes**, v.43, n.10, Oct, p.1221-8. 1994.

Crijns, F. R., Wolffenbuttel, B. H., De Mey, J. G. e Struijker Boudier, H. A. Mechanical properties of mesenteric arteries in diabetic rats: consequences of outward remodeling. **Am J Physiol**, v.276, n.5 Pt 2, May, p.H1672-7. 1999.

Daousi, C., Casson, I. F., Gill, G. V., Macfarlane, I. A., Wilding, J. P. e Pinkney, J. H. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. **Postgrad Med J**, v.82, n.966, Apr, p.280-4. 2006.

De Mey, J. G., Schiffers, P. M., Hilgers, R. H. e Sanders, M. M. Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.288, n.3, Mar, p.H1022-7. 2005.

Death, A. K., Fisher, E. J., Mcgrath, K. C. e Yue, D. K. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. **Atherosclerosis**, v.168, n.2, Jun, p.263-9. 2003.

Dekkers, J. C., Van Doornen, L. J. e Kemper, H. C. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. **Sports Med**, v.21, n.3, Mar, p.213-38. 1996.

Del Prato, S., Leonetti, F., Simonson, D. C., Sheehan, P., Matsuda, M. e DeFronzo, R. A. Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. **Diabetologia**, v.37, n.10, Oct, p.1025-35. 1994.

Derosa, G., D'angelo, A., Tinelli, C., Devangelio, E., Consoli, A., Miccoli, R., Penno, G., Del Prato, S., Paniga, S. e Cicero, A. F. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. **Diabetes Metab**, v.33, n.2, Apr, p.129-34. 2007.

Dhalla, N. S., Liu, X., Panagia, V. e Takeda, N. Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. **Cardiovasc Res**, v.40, n.2, Nov, p.239-47. 1998.

Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.29 Suppl 1, Jan, p.S43-8. 2006.

Dikalov, S. I., Li, W., Mehranpour, P., Wang, S. S. e Zafari, A. M. Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. **Biochem Pharmacol**, v.73, n.7, Apr 1, p.972-80. 2007.

Dikalova, A., Clempus, R., Lassegue, B., Cheng, G., McCoy, J., Dikalov, S., San Martin, A., Lyle, A., Weber, D. S., Weiss, D., Taylor, W. R., Schmidt, H. H., Owens, G. K., Lambeth, J. D. e Griendling, K. K. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. **Circulation**, v.112, n.17, Oct 25, p.2668-76. 2005.

Eckert, R. e Randall, D. Animal Physiology - Mechanisms and Adaptations. **Freeman and Company**. 1983.

Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. **Diabetes Care**, v.31, n.3, Mar, p.596-615. 2008.

Elmarakby, A. A., Loomis, E. D., Pollock, J. S. e Pollock, D. M. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. **Hypertension**, v.45, n.2, Feb, p.283-7. 2005.

Endemann, D. H., Pu, Q., De Ciuceis, C., Savoia, C., Viridis, A., Neves, M. F., Touyz, R. M. e Schiffrin, E. L. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. **Hypertension**, v.43, n.2, Feb, p.399-404. 2004.

Ergul, A., Portik-Dobos, V., Giulumian, A. D., Molero, M. M. e Fuchs, L. C. Stress upregulates arterial matrix metalloproteinase expression and activity via endothelin A receptor activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.285, n.5, Nov, p.H2225-32. 2003.

Eto, H., Biro, S., Miyata, M., Kaieda, H., Obata, H., Kihara, T., Orihara, K. e Tei, C. Angiotensin II type 1 receptor participates in extracellular matrix production in the late stage of remodeling after vascular injury. **Cardiovasc Res**, v.59, n.1, Jul 1, p.200-11. 2003.

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. e Grodsky, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v.23, n.5, Oct, p.599-622. 2002.

Ferrannini, E., Barrett, E. J., Bevilacqua, S. e DeFronzo, R. A. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. **J Clin Invest**, v.72, n.5, Nov, p.1737-47. 1983.

Forbes, J. M., Coughlan, M. T. e Cooper, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v.57, n.6, Jun, p.1446-54. 2008.

Fridman, R., Toth, M., Chvyrkova, I., Meroueh, S. O. e Mobashery, S. Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). **Cancer Metastasis Rev**, v.22, n.2-3, Jun-Sep, p.153-66. 2003.

Friedman, M. I. e Ramirez, I. Food intake in diabetic rats: relationship to metabolic effects of insulin treatment. **Physiol Behav**, v.56, n.2, Aug, p.373-8. 1994.

Fuller, J. H., Stevens, L. K. e Wang, S. L. Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. **Diabetologia**, v.44 Suppl 2, Sep, p.S54-64. 2001.

Gao, X., Belmadani, S., Picchi, A., Xu, X., Potter, B. J., Tewari-Singh, N., Capobianco, S., Chilian, W. M. e Zhang, C. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice. **Circulation**, v.115, n.2, Jan 16, p.245-54. 2007.

Garris, D. R., Garris, B. L., Novikova, L. e Lau, Y. S. Structural, metabolic and endocrine analysis of the diabetes (db/db) hypogonadal syndrome: relationship to hypophyseal hypercytopenia. **Cell Tissue Res**, v.319, n.3, Mar, p.501-12. 2005.

Giugliano, D., Ceriello, A. e Paolisso, G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? **Metabolism**, v.44, n.3, Mar, p.363-8. 1995.

Glagov, S., Vito, R., Giddens, D. P. e Zarins, C. K. Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. **J Hypertens Suppl**, v.10, n.6, Aug, p.S101-4. 1992.

Gorlach, A., Brandes, R. P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F. e Busse, R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. **Circ Res**, v.87, n.1, Jul 7, p.26-32. 2000.

Griendling, K. K. e Harrison, D. G. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. **Circ Res**, v.85, n.6, Sep 17, p.562-3. 1999.

Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D. e Alexander, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v.74, n.6, Jun, p.1141-8. 1994.

Griendling, K. K., Sorescu, D. e Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v.86, n.5, Mar 17, p.494-501. 2000.

Gronski, T. J., Jr., Martin, R. L., Kobayashi, D. K., Walsh, B. C., Holman, M. C., Huber, M., Van Wart, H. E. e Shapiro, S. D. Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. **J Biol Chem**, v.272, n.18, May 2, p.12189-94. 1997.

Gross, J. e Lapiere, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.48, Jun 15, p.1014-22. 1962.

Haas, T. L., Doyle, J. L., Distasi, M. R., Norton, L. E., Sheridan, K. M. e Unthank, J. L. Involvement of MMPs in the outward remodeling of collateral mesenteric arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.4, Oct, p.H2429-37. 2007.

Haitoglou, C. S., Tsilibary, E. C., Brownlee, M. e Charonis, A. S. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. **J Biol Chem**, v.267, n.18, Jun 25, p.12404-7. 1992.

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Mol Aspects Med**, v.8, n.2, p.89-193. 1985.

Halpern, W., Mulvany, M. J. e Warshaw, D. M. Mechanical properties of smooth muscle cells in the walls of arterial resistance vessels. **J Physiol**, v.275, Feb, p.85-101. 1978.

Harris, A. K., Hutchinson, J. R., Sachidanandam, K., Johnson, M. H., Dorrance, A. M., Stepp, D. W., Fagan, S. C. e Ergul, A. Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. **Diabetes**, v.54, n.9, Sep, p.2638-44. 2005.

Hayden, M. R., Sowers, J. R. e Tyagi, S. C. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. **Cardiovasc Diabetol**, v.4, n.1, p.9. 2005.

He, Z. e King, G. L. Microvascular complications of diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.33, n.1, Mar, p.215-38, xi-xii. 2004.

He, Z., Rask-Madsen, C. e King, G. L. Managing heart disease. Mechanisms of cardiovascular complications in diabetes and potential new pharmacological therapies. **European Heart Journal Supplements** v.5 n.(Supplement B), 2003, p.B51–B57. 2003.

Heagerty, A. M., Aalkjær, C., Bund, S. J., Korsgaard, N. e Mulvany, M. J. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. **Hypertension**, v.21, n.4, Apr, p.391-7. 1993.

Herberg, L. e Coleman, D. L. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. **Metabolism**, v.26, n.1, Jan, p.59-99. 1977.

Hill, M. A. e Ege, E. A. Active and passiva mechanical properties of isolated arterioles from STZ-induced diabetic rats. Effect of aminoguanidine treatment. **Diabetes**, v.43, n.12, Dec, p.1450-6. 1994.

Hill, M. A. e Larkins, R. G. Alterations in distribution of cardiac output in experimental diabetes in rats. **Am J Physiol**, v.257, n.2 Pt 2, Aug, p.H571-80. 1989.

Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D. e Schmidt, A. M. RAGE médiates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**, v.97, n.7, Jun 25, p.889-901. 1999.

Huang, A., Wu, Y., Sun, D., Koller, A. e Kaley, G. Effect of estrogen on flow-induced dilation in NO deficiency: role of prostaglandins and EDHF. **J Appl Physiol**, v.91, n.6, Dec, p.2561-6. 2001.

Inoguchi, T. e Nawata, H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. **Curr Drug Targets**, v.6, n.4, Jun, p.495-501. 2005.

Intengan, H. D., Thibault, G., Li, J. S. e Schiffrin, E. L. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v.100, n.22, Nov 30, p.2267-75. 1999.

Ishii, H., Koya, D. e King, G. L. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. **J Mol Med**, v.76, n.1, Jan, p.21-31. 1998.

Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terron, J. A., Falcon-Neri, A. e Saavedra, J. M. Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT-1 antagonist. **Stroke**, v.33, n.9, Sep, p.2297-303. 2002.

Jámes, J. F., Hewett, T. E. e Robbins, J. Cardiac physiology in transgenic mice. **Circ Res**, v.82, n.4, Mar 9, p.407-15. 1998.

Jáy, D., Hitomi, H. e Griending, K. K. Oxidativo stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radic Biol Med**, v.40, n.2, Ján 15, p.183-92. 2006.

Jerums, G., Panagiotopoulos, S., Forbes, J., Osicka, T. e Cooper, M. Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. **Arch Biochem Biophys**, v.419, n.1, Nov 1, p.55-62. 2003.

Juhan-Vague, I., Alessi, M. C. e Vague, P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. **Diabetologia**, v.34, n.7, Jul, p.457-62. 1991.

Kastrup, J., Norgaard, T., Parving, H. H. e Lassen, N. A. Decreased distensibility of resistance vessels of the skin in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microangiopathy. **Clin Sci (Lond)**, v.72, n.1, Ján, p.123-30. 1987.

Kawai, J., Ando, K., Tojo, A., Shimosawa, T., Takahashi, K., Onozato, M. L., Yamasaki, M., Ogita, T., Nakaoka, T. e Fujita, T. Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury in mice. **Circulation**, v.109, n.9, Mar 9, p.1147-53. 2004.

Keaney, J. F., Jr. Oxidativo stress and the vascular wall: NADPH oxidases take center stage. **Circulation**, v.112, n.17, Oct 25, p.2585-8. 2005.

Kenichi, M., Masanobu, M., Takehiko, K., Shoko, T., Akira, F., Katsushige, A., Takashi, H., Yoshiyuki, O. e Shigeru, K. Renal synthesis of urokinase type-plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 in diabetic nephropathy in rats: modulation by angiotensin-converting-enzyme inhibitor. **J Lab Clin Med**, v.144, p.69-77. 2004.

King, G. L., Kunisaki, M., Nishio, Y., Inoguchi, T., Shiba, T. e Xia, P. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. **Diabetes**, v.45 Suppl 3, Jul, p.S105-8. 1996.

Kinlay, S., Behrendt, D., Wainstein, M., Beltrame, J., Fang, J. C., Creager, M. A., Selwyn, A. P. e Ganz, P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. **Circulation**, v.104, n.10, Sep 4, p.1114-8. 2001.

Kizu, A., Koyama, H., Tanaka, S., Maeno, T., Komatsu, M., Fukumoto, S., Emoto, M., Shoji, T., Inaba, M., Shioi, A., Miki, T. e Nishizawa, Y. Arterial wall stiffness is associated with peripheral circulation in patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v.170, n.1, Sep, p.87-91. 2003.

Koller, A. Flow-dependent remodeling of small arteries: the stimuli and the sensors are (still) in question. **Circ Res**, v.99, n.1, Jul 7, p.6-9. 2006.

Kool, M. J., Lambert, J., Stehouwer, C. D., Hoeks, A. P., Struijker Boudier, H. A. e Van Bortel, L. M. Vessel wall properties of large arteries in uncomplicated IDDM. **Diabetes Care**, v.18, n.5, May, p.618-24. 1995.

Korshunov, V. A., Schwartz, S. M. e Berk, B. C. Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.27, n.8, Aug, p.1722-8. 2007.

Korthuis, R. J., Benoit, J. N., Kvietys, P. R., Laughlin, M. H., Taylor, A. E. e Granger, D. N. Intestinal hyperemia in experimental diabetes mellitus. **Am J Physiol**, v.253, n.1 Pt 1, Jul, p.G26-32. 1987.

Koya, D., Haneda, M., Nakagawa, H., Isshiki, K., Sato, H., Maeda, S., Sugimoto, T., Yasuda, H., Kashiwagi, A., Wada, D. K., King, G. L. e Kikkawa, R. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. **FASEB J**, v.14, n.3, Mar, p.439-47. 2000.

Kramer, K., Van Acker, S. A., Voss, H. P., Grimbergen, J. A., Van Der Vijgh, W. J. e Bast, A. Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.30, n.4, Dec, p.209-15. 1993.

Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J. e King, G. L. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. **Circulation**, v.101, n.6, Feb 15, p.676-81. 2000.

Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D. G. e Dikalov, S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, v.278, n.25, Jun 20, p.22546-54. 2003.

Laakso, M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, n.5, May, p.937-42. 1999.

Lassegue, B. e Clempus, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.285, n.2, Aug, p.R277-97. 2003.

Laurant, P., Adrian, M. e Berthelot, A. Effect of age on mechanical properties of rat mesenteric small arteries. **Can J Physiol Pharmacol**, v.82, n.4, Apr, p.269-75. 2004.

Leahy, J. L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Arch Med Res**, v.36, n.3, May-Jun, p.197-209. 2005.

Lehoux, S., Castier, Y. e Tedgui, A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. **J Intern Med**, v.259, n.4, Apr, p.381-92. 2006.

Leiter, L. A. e Lewanczuk, R. Z. Of the renin-angiotensin system and reactive oxygen species Type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. **Am J Hypertens**, v.18, n.1, Jan, p.121-8. 2005.

Levy, B. I., Curmi, P., Poitevin, P. e Safar, M. E. Modifications of the arterial mechanical properties of normotensive and hypertensive rats without arterial pressure changes. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.14, n.2, Aug, p.253-9. 1989.

Li, J. H., Huang, X. R., Zhu, H. J., Oldfield, M., Cooper, M., Truong, L. D., Johnson, R. J. e Lan, H. Y. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. **FASEB J**, v.18, n.1, Jan, p.176-8. 2004.

Li, J. M. e Shah, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.287, n.5, Nov, p.R1014-30. 2004.

Liu, S., Ma, X., Gong, M., Shi, L., Lincoln, T. e Wang, S. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v.42, n.6, Mar 15, p.852-63. 2007.

Malek, A. M., Alper, S. L. e Izumo, S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. **JAMA**, v.282, n.21, Dec 1, p.2035-42. 1999.

Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinye, M. e Dominguez, C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radic Biol Med**, v.34, n.12, Jun 15, p.1563-74. 2003.

Mccord, J. M. e Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v.244, n.22, Nov 25, p.6049-55. 1969.

Mcfarlane, S. I., Kumar, A. e Sowers, J. R. Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. **Am J Cardiol**, v.91, p.30H-37H. 2003.

Mcgarra, J. D. e Dobbins, R. L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. **Diabetologia**, v.42, n.2, Feb, p.128-38. 1999.

Miura, J. e Uchigata, Y. [Latest overview of type 1 diabetes mellitus]. **Nippon Rinsho**, v.66, n.7, Jul, p.1397-404. 2008.

Moreau, P., D'uscio, L. V. e Luscher, T. F. Structure and reactivity of small arteries in aging. **Cardiovasc Res**, v.37, n.1, Jan, p.247-53. 1998.

Mulvany, M. J. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. **J Vasc Res**, v.40, n.6, Nov-Dec, p.558-60. 2003.

Mulvany, M. J., Baumbach, G. L., Aalkjaer, C., Heagerty, A. M., Korsgaard, N., Schiffrin, E. L. e Heistad, D. D. Vascular remodeling. **Hypertension**, v.28, n.3, Sep, p.505-6. 1996.

Nagase, H. e Woessner, J. F., Jr. Matrix metalloproteínases. **J Biol Chem**, v.274, n.31, Jul 30, p.21491-4. 1999.

Nagpala, P. G., Malik, A. B., Vuong, P. T. e Lum, H. Protein kinase C beta 1 overexpression augments phorbol ester-induced increase in endothelial permeability. **J Cell Physiol**, v.166, n.2, Feb, p.249-55. 1996.

Narayan, K. M., Boyle, J. P., Thompson, T. J., Sorensen, S. W. e Williamson, D. F. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. **JAMA**, v.290, n.14, Oct 8, p.1884-90. 2003.

Nashar, K., Nguyen, J. P., Jesri, A., Morrow, J. D. e Egan, B. M. Angiotensin receptor blockade improves arterial distensibility and reduces exercise-induced pressor responses in obese hypertensive patients with the metabolic syndrome. **Am J Hypertens**, v.17, n.6, Jun, p.477-82. 2004.

Nassar, T., Kadery, B., Lotan, C., Da'as, N., Kleinman, Y. e Haj-Yehia, A. Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v.436, n.1-2, Feb 1, p.111-8. 2002.

Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D. e Shaw, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem**, v.267, n.21, Jul 25, p.14998-5004. 1992.

Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I. e Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v.404, n.6779, Apr 13, p.787-90. 2000.

Obayashi, M., Yano, M., Kohno, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ohkusa, T., Konishi, M. e Matsuzaki, M. Effect of angiotensin II receptor antagonism on vascular hypertrophy and aortic impedance in abdominal aortic-banded rat. **Am J Hypertens**, v.12, n.4 Pt 1, Apr, p.381-7. 1999.

Oxlund, H., Rasmussen, L. M., Andreassen, T. T. e Heickendorff, L. Increased aortic stiffness in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.32, n.10, Oct, p.748-52. 1989.

Panagia, M., Schneider, J. E., Brown, B., Cole, M. A. e Clarke, K. Abnormal function and glucose metabolism in the type-2 diabetic db/db mouse heart. **Can J Physiol Pharmacol**, v.85, n.3-4, Mar-Apr, p.289-94. 2007.

Paolisso, G., Tagliamonte, M. R., Barbieri, M., Zito, G. A., Gambardella, A., Varricchio, G., Ragno, E. e Varricchio, M. Chronic vitamin E administration improves

brachial reactivity and increases intracellular magnesium concentration in type II diabetic patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.1, Jan, p.109-15. 2000.

Pappenheimer, J. R., Renkin, E. M. e Borrero, L. M. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. **Am J Physiol**, v.167, n.1, Oct, p.13-46. 1951.

Park, J. B., Touyz, R. M., Chen, X. e Schiffrin, E. L. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v.15, n.1 Pt 1, Jan, p.78-84. 2002.

Peters, H., Border, W. A. e Noble, N. A. Targeting TGF-beta overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. **Kidney Int**, v.54, n.5, Nov, p.1570-80. 1998.

Phillips, S. A., Olson, E. B., Lombard, J. H. e Morgan, B. J. Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries. **J Appl Physiol**, v.100, n.4, Apr, p.1117-23. 2006.

Pirro, M., Schillaci, G., Mannarino, M. R., Savarese, G., Vaudo, G., Siepi, D., Paltriccia, R. e Mannarino, E. Effects of rosuvastatin on 3-nitrotyrosine and aortic stiffness in hypercholesterolemia. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.17, n.6, Jul, p.436-41. 2007.

Poitout, V. e Robertson, R. P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v.143, n.2, Feb, p.339-42. 2002.

Pourageaud, F. e De Mey, J. G. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. **Am J Physiol**, v.273, n.4 Pt 2, Oct, p.H1699-706. 1997.

Prado, C. M. e Rossi, M. A. Circumferential wall tension due to hypertension plays a pivotal role in aorta remodelling. **Int J Exp Pathol**, v.87, n.6, Dec, p.425-36. 2006.

Primrose, J. N., Davies, J. A., Prentice, C. R., Hughes, R. e Johnston, D. Reduction in factor VII, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1 activity after surgical treatment of morbid obesity. **Thromb Haemost**, v.68, n.4, Oct 5, p.396-9. 1992.

Puyo, A. M., Mayer, M. A., Cavallero, S., Donoso, A. S. e Peredo, H. A. Fructose overload modifies vascular morphology and prostaglandin production in rats. **Auton Autacoid Pharmacol**, v.24, n.2, Apr, p.29-35. 2004.

Qiu, H. Y., Valtier, B., Struyker-Boudier, H. A. e Levy, B. I. Mechanical and contractile properties of in situ localized mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.33, n.3, Jun, p.159-70. 1995.

Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griending, K. K. e Harrison, D. G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular

superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest**, v.97, n.8, Apr 15, p.1916-23. 1996.

Rajágopalan, S., Meng, X. P., Ramasamy, S., Harrison, D. G. e Galis, Z. S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **J Clin Invest**, v.98, n.11, Dec 1, p.2572-9. 1996.

Ridderstrale, M., Gudbjornsdottir, S., Eliasson, B., Nilsson, P. M. e Cederholm, J. Obesity and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: results from the Swedish National Diabetes Register. **J Intern Med**, v.259, n.3, Mar, p.314-22. 2006.

Rizzoni, D., Porteri, E., Boari, G. E., De Ciuceis, C., Sleiman, I., Muiesan, M. L., Castellano, M., Miclini, M. e Agabiti-Rosei, E. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. **Circulation**, v.108, n.18, Nov 4, p.2230-5. 2003.

Rizzoni, D., Porteri, E., Guelfi, D., Muiesan, M. L., Piccoli, A., Valentini, U., Cimino, A., Girelli, A., Salvetti, M., De Ciuceis, C., Tiberio, G. A., Giulini, S. M., Sleiman, I., Monteduro, C. e Rosei, E. A. Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Hypertens**, v.19, n.5, May, p.913-9. 2001.

Rizzoni, D., Porteri, E., Guelfi, D., Muiesan, M. L., Valentini, U., Cimino, A., Girelli, A., Rodella, L., Bianchi, R., Sleiman, I. e Rosei, E. A. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation**, v.103, n.9, Mar 6, p.1238-44. 2001.

Rumble, J. R., Cooper, M. E., Soulis, T., Cox, A., Wu, L., Youssef, S., Jásik, M., Jerums, G. e Gilbert, R. E. Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. **J Clin Invest**, v.99, n.5, Mar 1, p.1016-27. 1997.

Rumble, J. R., Gilbert, R. E., Cox, A., Wu, L. e Cooper, M. E. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces the expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in diabetic vasculopathy. **J Hypertens**, v.16, n.11, Nov, p.1603-9. 1998.

Samad, F. e Loskutoff, D. J. Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. **Mol Med**, v.2, n.5, Sep, p.568-82. 1996.

Samad, F., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Pandey, M., Hotamisligil, G. S. e Loskutoff, D. J. Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.12, Jun 8, p.6902-7. 1999.

Samad, F., Yamamoto, K., Pandey, M. e Loskutoff, D. J. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. **Mol Med**, v.3, n.1, Jan, p.37-48. 1997.

San Martin, A., Du, P., Dikalova, A., Lassegue, B., Aleman, M., Gongora, M. C., Brown, K., Joseph, G., Harrison, D. G., Taylor, W. R., Jo, H. e Griendling, K. K.

Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.292, n.5, May, p.H2073-82. 2007.

Sasaki, N., Yamashita, T., Takaya, T., Shinohara, M., Shiraki, R., Takeda, M., Emoto, N., Fukatsu, A., Hayashi, T., Ikemoto, K., Nomura, T., Yokoyama, M., Hirata, K. e Kawashima, S. Augmentation of vascular remodeling by uncoupled endothelial nitric oxide synthase in a mouse model of diabetes mellitus. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.28, n.6, Jun, p.1068-76. 2008.

Schiffirin, E. L. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. **Hypertension**, v.19, n.2 Suppl, Feb, p.II1-9. 1992.

Schofield, I., Malik, R., Izzard, A., Austin, C. e Heagerty, A. Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia. **Circulation**, v.106, n.24, Dec 10, p.3037-43. 2002.

Seghrouchni, I., Draï, J., Bannier, E., Riviere, J., Calmard, P., Garcia, I., Orgiazzi, J. e Revol, A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. **Clin Chim Acta**, v.321, n.1-2, Jul, p.89-96. 2002.

Sellers, A. e Woessner, J. F., Jr. The extraction of a neutral metalloproteinase from the involuting rat uterus, and its action on cartilage proteoglycan. **Biochem J**, v.189, n.3, Sep 1, p.521-31. 1980.

Semeniuk, L. M., Kryski, A. J. e Severson, D. L. Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.283, n.3, Sep, p.H976-82. 2002.

Shao, J., Iwashita, N., Ikeda, F., Ogihara, T., Uchida, T., Shimizu, T., Uchino, H., Hirose, T., Kawamori, R. e Watada, H. Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v.344, n.4, Jun 16, p.1224-33. 2006.

Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K. e Ley, T. J. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. **J Biol Chem**, v.268, n.32, Nov 15, p.23824-9. 1993.

Shargorodsky, M., Hass, E., Boaz, M., Gavish, D. e Zimlichman, R. High dose treatment with angiotensin II receptor blocker in patients with hypertension: differential effect of tissue protection versus blood pressure lowering. **Atherosclerosis**, v.197, n.1, Mar, p.303-10. 2008.

Shiba, T., Inoguchi, T., Sportsman, J. R., Heath, W. F., Bursell, S. e King, G. L. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. **Am J Physiol**, v.265, n.5 Pt 1, Nov, p.E783-93. 1993.

Shibley, J. M., Doyle, G. A., Fliszar, C. J., Ye, Q. Z., Johnson, L. L., Shapiro, S. D., Welgus, H. G. e Senior, R. M. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. **J Biol Chem**, v.271, n.8, Feb 23, p.4335-41. 1996.

Shibley, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J. e Shapiro, S. D. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.9, Apr 30, p.3942-6. 1996.

Singleton, J. R., Smith, A. G., Russell, J. W. e Feldman, E. L. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. **Diabetes**, v.52, n.12, Dec, p.2867-73. 2003.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J. e Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v.150, n.1, Oct, p.76-85. 1985.

Song, R. H., Kocharyan, H. K., Fortunato, J. E., Glagov, S. e Bassiouny, H. S. Increased flow and shear stress enhance in vivo transforming growth factor-beta1 after experimental arterial injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, n.4, Apr, p.923-30. 2000.

Song, W. e Ergul, A. Type-2 diabetes-induced changes in vascular extracellular matrix gene expression: relation to vessel size. **Cardiovasc Diabetol**, v.5, p.3. 2006.

Spector, K. S. Diabetic cardiomyopathy. **Clin Cardiol**, v.21, n.12, Dec, p.885-7. 1998.

Spoelstra-De Man, A. M., Van Ittersum, F. J., Schram, M. T., Kamp, O., Van Dijk, R. A., Ijzerman, R. G., Twisk, J. W., Brouwer, C. B. e Stehouwer, C. D. Aggressive antihypertensive strategies based on hydrochlorothiazide, candesartan or lisinopril decrease left ventricular mass and improve arterial compliance in patients with type II diabetes mellitus and hypertension. **J Hum Hypertens**, v.20, n.8, Aug, p.599-611. 2006.

Spratt, J. C., Webb, D. J., Shiels, A. e Williams, B. Effects of candesartan on cardiac and arterial structure and function in hypertensive subjects. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.2, n.4, Dec, p.227-32. 2001.

Srinivasan, S., Hatley, M. E., Bolick, D. T., Palmer, L. A., Edelstein, D., Brownlee, M. e Hedrick, C. C. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. **Diabetologia**, v.47, n.10, Oct, p.1727-34. 2004.

Stouffer, G. A. e Owens, G. K. TGF-beta promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms. **J Clin Invest**, v.93, n.5, May, p.2048-55. 1994.

Su, W., Guo, Z., Randall, D. C., Cassis, L., Brown, D. R. e Gong, M. C. Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in Type 2 diabetic db/db mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.295, n.4, Oct, p.H1634-41. 2008.

Tahvanainen, A., Taurio, J., Maki-Jouppi, J., Koobi, P., Mustonen, J., Kahonen, M., Sand, J., Nordback, I. e Porsti, I. Increased wall tension in response to vasoconstrictors in isolated mesenteric arterial rings from patients with high blood pressure. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.99, n.6, Dec, p.440-9. 2006.

Tanaka, S., Avigad, G., Brodsky, B. e Eikenberry, E. F. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. **J Mol Biol**, v.203, n.2, Sep 20, p.495-505. 1988.

Thraillkill, K. M., Bunn, R. C., Moreau, C. S., Cockrell, G. E., Simpson, P. M., Coleman, H. N., Frindik, J. P., Kemp, S. F. e Fowlkes, J. L. Matrix metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v.30, n.9, Sep, p.2321-6. 2007.

Throckmorton, D. C., Brogden, A. P., Min, B., Rasmussen, H. e Kashgarian, M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. **Kidney Int**, v.48, n.1, Jul, p.111-7. 1995.

Timpl, R. e Brown, J. C. Supramolecular assembly of basement membranes. **Bioessays**, v.18, n.2, Feb, p.123-32. 1996.

Tronc, F., Wassef, M., Esposito, B., Henrion, D., Glagov, S. e Tedgui, A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.16, n.10, Oct, p.1256-62. 1996.

Tsilibary, E. C., Charonis, A. S., Reger, L. A., Wohlhueter, R. M. e Furcht, L. T. The effect of nonenzymatic glucosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. **J Biol Chem**, v.263, n.9, Mar 25, p.4302-8. 1988.

Tulis, D. A., Unthank, J. L. e Prewitt, R. L. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. **Am J Physiol**, v.274, n.3 Pt 2, Mar, p.H874-82. 1998.

Tuttle, J. L., Nachreiner, R. D., Bhuller, A. S., Condict, K. W., Connors, B. A., Herring, B. P., Dalsing, M. C. e Unthank, J. L. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.281, n.3, Sep, p.H1380-9. 2001.

Uemura, S., Matsushita, H., Li, W., Glassford, A. J., Asagami, T., Lee, K. H., Harrison, D. G. e Tsão, P. S. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. **Circ Res**, v.88, n.12, Jun 22, p.1291-8. 2001.

Unthank, J. L., Fath, S. W., Burkhart, H. M., Miller, S. C. e Dalsing, M. C. Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. **Circ Res**, v.79, n.5, Nov, p.1015-23. 1996.

Van Bortel, L. M., Kool, M. J., Boudier, H. A. e Struijker Boudier, H. A. Effects of antihypertensive agents on local arterial distensibility and compliance. **Hypertension**, v.26, n.3, Sep, p.531-4. 1995.

Vincenti, M. P. The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. **Methods Mol Biol**, v.151, p.121-48. 2001.

Visse, R. e Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v.92, n.8, May 2, p.827-39. 2003.

Wang, W., Koka, V. e Lan, H. Y. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. **Nephrology (Carlton)**, v.10, n.1, p.48-56. 2005.

Wautier, M. P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M. e Wautier, J. L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.280, n.5, May, p.E685-94. 2001.

Wei, Y., Whaley-Connell, A. T., Chen, K., Habibi, J., Uptergrove, G. M., Clark, S. E., Stump, C. S., Ferrario, C. M. e Sowers, J. R. NADPH oxidase contributes to vascular inflammation, insulin resistance, and remodeling in the transgenic (mRen2) rat. **Hypertension**, v.50, n.2, Aug, p.384-91. 2007.

Wigg, S. J., Tare, M., Forbes, J., Cooper, M. E., Thomas, M. C., Coleman, H. A., Parkington, H. C. e O'brien, R. C. Early vitamin E supplementation attenuates diabetes-associated vascular dysfunction and the rise in protein kinase C-beta in mesenteric artery and ameliorates wall stiffness in femoral artery of Wistar rats. **Diabetologia**, v.47, n.6, Jun, p.1038-46. 2004.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. e King, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, n.5, May, p.1047-53. 2004.

Withers, P. Comparative Animal Physiology. . **Saunders College Publishing**. 1992.

Wolf, Y. G., Rasmussen, L. M. e Ruoslahti, E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. **J Clin Invest**, v.93, n.3, Mar, p.1172-8. 1994.

Wolin, M. S., Ahmad, M. e Gupte, S. A. The sources of oxidativo stress in the vessel wall. **Kidney Int**, v.67, n.5, May, p.1659-61. 2005.

Yang, C. W., Vlassara, H., Peten, E. P., He, C. J., Striker, G. E. e Striker, L. J. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.20, Sep 27, p.9436-40. 1994.

Yin, F. C. e Ting, C. T. Compliance changes in physiological and pathological states. **J Hypertens Suppl**, v.10, n.6, Aug, p.S31-3. 1992.

Yki-Järvinen, H. Glucose toxicity. **Endocr Rev**, v.13, n.3, Aug, p.415-31. 1992.

Zachary, I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.280, n.6, Jun, p.C1375-86. 2001.

Zarins, C. K., Zatina, M. A., Giddens, D. P., Ku, D. N. e Glagov, S. Shear stress regulation of artery lúmem diameter in experimental atherogenesis. **J Vasc Surg**, v.5, n.3, Mar, p.413-20. 1987.

Zhang, C., Park, Y., Picchi, A. e Potter, B. J. Maturation-induces endothelial dysfunction via vascular inflammation in diabetic mice. **Basic Res Cardiol**, v.103, n.5, Sep, p.407-16. 2008.

Zhang, H., Joseph, J., Vasquez-Vivar, J., Karoui, H., Nsanzumuhire, C., Martasek, P., Tordo, P. e Kalyanaraman, B. Detection of superoxide ânion using an isotopically labeled nitron spin trap: potential biological applications. **FEBS Lett**, v.473, n.1, May 4, p.58-62. 2000.

Zhang, Y., Bloem, L. J., Yu, L., Estridge, T. B., Iversen, P. W., Mcdonald, C. E., Schrementi, J. P., Wang, X., Vlahos, C. J. e Wang, J. Protein kinase C betall activation induces angiotensin converting enzyme expression in neonatal rat cardiomyocytes. **Cardiovasc Res**, v.57, n.1, Ján, p.139-46. 2003.

Zheng, F., Zeng, Y. J., Plati, A. R., Elliot, S. J., Berho, M., Potier, M., Striker, L. J. e Striker, G. E. Combined AGE inhibition and ACEi decreases the progression of established diabetic nephropathy in B6 db/db mice. **Kidney Int**, v.70, p.507-514. 2006.

Zieman, S. J., Melenovsky, V. e Kass, D. A. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.5, May, p.932-43. 2005.

Zimmet, P., Alberti, K. G. e Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.782-7. 2001.

Zimmet, P. Z. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. **Diabetologia**, v.42, n.5, May, p.499-518. 1999.

Ziyadeh, F. N., Sharma, K., Ericksen, M. e Wolf, G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. **J Clin Invest**, v.93, n.2, Feb, p.536-42. 1994.

Zou, M. H., Cohen, R. e Ullrich, V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Endothelium**, v.11, n.2, Mar-Apr, p.89-97. 2004.