

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**FABIANA VIEIRA SIMÕES**

**TRATAMENTO COM ALTA DOSE DE ATORVASTATINA MELHORA  
A FUNÇÃO ENDOTELIAL EM RATOS DIABÉTICOS POR  
DIMINUIÇÃO DE ROS**

VITÓRIA

2016

FABIANA VIEIRA SIMÕES

**TRATAMENTO COM ALTA DOSE DE ATORVASTATINA MELHORA  
A FUNÇÃO ENDOTELIAL EM RATOS DIABÉTICOS POR  
DIMINUIÇÃO DE ROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração de Fisiologia Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Priscila Rossi de Batista

VITÓRIA

2016

FABIANA VIEIRA SIMÕES

**TRATAMENTO COM ALTA DOSE DE ATORVASTATINA MELHORA A  
FUNÇÃO ENDOTELIAL EM RATOS DIABÉTICOS POR DIMINUIÇÃO DE  
ROS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas. Aprovada em 24 de junho de 2016.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo - Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Frizera Vassallo - Examinador Interno - UFES

---

Prof. Dr. Jose Geraldo Mill – Examinador Interno – UFES

---

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira – Examinador Externo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aurélio Araujo Fernandes - Examinador Externo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Simões, Fabiana Vieira

Tratamento com alta dose de atorvastatina reduz lesão vascular em ratos diabéticos / Fabiana Vieira Simões – 2016.

147f

Orientador: Dalton Valentim Vassallo

Co-orientadora: Priscila Rossi de Batista

Tese (doutorado)- Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Atorvastatina. 2. Diabetes Mellitus. 3. Função Vascular I. Vassallo, Dalton Valentim. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

Dedico esta tese de doutorado, primeiramente a Deus, que nunca me abandonou e sempre me deu a paz que eu preciso. Aos meus amados pais Alcary e Regina Simões, que com todo carinho e cuidado, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e acreditando em mim. E ao meu marido José Carlos Rizk Filho, que me acompanhou por essa longa caminhada.

Sem o apoio, cuidados e, acima de tudo, sem o amor de vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por sonhar comigo!

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.  
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;  
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;  
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;  
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;  
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;  
Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;  
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.  
Que proveito tem o trabalhador naquilo em que trabalha?  
Tenho visto o trabalho que Deus deu aos filhos dos homens, para com ele os exercitar.  
Tudo fez formoso em seu tempo; também pôs o mundo no coração do homem, sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim.  
Já tenho entendido que não há coisa melhor para eles do que alegrar-se e fazer bem na sua vida;  
E também que todo o homem coma e beba, e goze do bem de todo o seu trabalho; isto é um dom de Deus.  
Eu sei que tudo quanto Deus faz durará eternamente; nada se lhe deve acrescentar, e nada se lhe deve tirar; e isto faz Deus para que haja temor diante dele.  
O que é, já foi; e o que há de ser, também já foi; e Deus pede conta do que passou.  
Vi mais debaixo do sol que no lugar do juízo havia impiedade, e no lugar da justiça havia iniquidade.  
Eu disse no meu coração: Deus julgará o justo e o ímpio; porque há um tempo para todo o propósito e para toda a obra.”*

**Eclesiastes 3:1-17**

## **AGRADECIMENTOS**

Embarquei nessa aventura há alguns anos, não tinha ideia do que aconteceria em minha vida, mas tinha uma única certeza, que seria um divisor de águas. Uma longa caminhada até chegar o atual momento, com muitas surpresas, porém cheia de motivos para agradecer.

Minha primeira e eterna palavra de gratidão é para aquele que sabe muito mais de mim do que eu mesma, meu amado Deus, dono do meu coração e da minha alma, agradeço por iluminar minha vida e me permitir crescer como pessoa e profissional, a paz que você me proporciona é fundamental para a minha vitória no dia de hoje.

Agradeço ao meu querido orientador Dr. Dalton Valentim Vassallo. Nossa história vem dos tempos da faculdade, onde conquistou minha admiração e respeito. Com carinho sempre me acolheu com suas orientações e apoios, hoje agradeço de modo especial por abrir as portas no LEMC, me dando à honra de fazer o doutorado, sob sua brilhante orientação. Obrigada por me amparar diante das adversidades da vida, por me mostrar o prazer de ser um pesquisador. Serei eternamente grata por tudo que pude aprender com você.

Agradeço, de forma muito especial, à minha querida amiga Priscila Rossi de Batista, que sem dúvidas foi peça chave para toda essa minha jornada, nunca me esquecerei dos experimentos até tarde da noite, nos sábados, domingos, feriados. Foi você quem me recebeu sem receios, que me ensinou as técnicas aplicadas em minha pesquisa, que comprou a ideia e junto comigo assumiu o projeto da diabetes,

que mesmo de longe sempre esteve bem perto, e que me faz encher de orgulho e te desejar toda felicidade sempre! Obrigada pela honra de tê-la como co-orientadora, e por ser essa pessoa com um coração maravilhoso, presente de Deus pra mim!

À querida professora Dra. Alessandra Simão Padilha, que sempre com sua serenidade é capaz de esclarecer nossas dúvidas e incentivar-nos a crescer como pesquisadores, seu conhecimento é algo admirável e nos serve de exemplo. Sou muito grata por todas as suas sugestões, por dedicar seu tempo comigo, e torcer por mim!

À professora Dra. Ivanita Stefanon, pela incrível mulher que representa. Uma professora brilhante, corajosa e um exemplo a ser seguido. Tenho muito orgulho de ter trabalhado com você esses anos no LEMC.

Ao professor Dr. Leonardo dos Santos, meu agradecimento por sua grande contribuição ao LEMC. Obrigada pelas ideias, apoio, questionamentos, sugestões, e acima de tudo, por ser tão presente em nosso LEMC.

À Dra. Paula Frizzera Vassallo, agradeço pela colaboração que nos dá através de um intercâmbio de considerações clínicas sempre aplicadas em nossos estudos experimentais, nos chamando atenção para a relevância de todo ensinamento adquirido no laboratório.

Aos meus companheiros de laboratório, que tornaram esses anos, no mínimo, mais divertidos: Camila, Carol, Dieli, Edna, Elis, Fabizinha, Jonaina, Karol, Lorena, Mirinha, Maylla, Bruna, Cindy, Renatinha, Emily, Samya, Tati, Patrícia, Rogério, Gilson, Marito e Vinícius.



Às minhas queridas amigas que ganhei nesses anos Thereza Cristina Franchischetto Travaglia, Thais de Oliveira Faria, Jhuli Keli Angeli e Paula Lopes Rodrigues pelo acolhimento e pela verdadeira relação de amizade. É impressionante como parece que nos conhecemos a muitos e muitos anos! Obrigada pelo abraço apertado nos momentos de dor e pelas altas gargalhadas nos momentos de alegria, pelo carinho que sempre me ofereceram e por torcerem por mim.

Aos demais professores e funcionários do PPGCF da UFES sobretudo, aos funcionários dos respectivos biotérios, que tanto colaboraram em todas as etapas do presente estudo.

Quero agradecer, com meu coração transbordando de orgulho, ao meu amado pai, Alcary Simões Junior, por toda a atenção e carinho que me deu. Obrigada por ser um exemplo de profissional e pessoa. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, por acreditar e se orgulhar de mim desde as menores coisas. Espero poder continuar sendo um orgulho para você!

À minha amada mãe, Regina Celi Gama Vieira Simões, que durante toda minha vida me fez provar o maior amor do mundo se dedicando a cuidar de mim e de meus irmãos! Durante este doutorado, passamos por momentos inesperados, mas você me serviu de exemplo de coragem e confiança. Mostrou o quanto devemos ser forte e ter fé porque Deus está no comando de tudo. Agradeço-te por tudo que sempre fez por mim!

Agradeço ao meu irmão, Flavio Vieira Simões, que como o primogênito, sempre cuidou e me olhou com carinho e torce por mim. Agradeço pelas sobrinhas

lindas que me presenteou, Luísa e Stella, duas pequenas preciosidades que fazem meus dias muito mais felizes!

À minha querida irmã, Juliana Vieira Simões, agradeço por ser minha melhor amiga e grande companheira. Obrigada por estar presente em todos os momentos de minha vida, por chorar comigo e por comemorar comigo também! Você sempre tão responsável, disciplinada e cuidadosa, me serve de exemplo em todos os âmbitos de minha vida. Agradeço-te também, por me presentear com um sobrinho tão carinhoso, o Benjamim.

Aos meus cunhados Priscila e Giordane, minha gratidão pelo carinho comigo, e por me ajudarem com o que podem, vocês são irmão adquiridos, que torcem e vibram comigo. Muito obrigado por todo apoio.

À minha querida vovó Jacy, por seu exemplo de mulher, mãe, avó! Agradeço a Deus pela sua vida, e por estar firme e forte para me ver conquistar mais uma vitória!

Às minhas amigas de infância, obrigada por tantas vezes compreenderem minha distância. Obrigada pelas palavras de conforto, pela diversão, pelo apoio nos momentos difíceis e, acima de tudo, por saber que posso sempre contar com vocês: Roberta, Eduarda, Débora, Luana e Sarah.

À Dayane, Ana Paula, Michelle, Tássia,, Daniela Cassini, Juliana Baracho, Vanessa e Igor agradeço minhas amigas de faculdade, com quem compartilho até hoje as lutas e conquistas, obrigada pela torcida e por sempre estarem presentes em minha vida.

Durante minha trajetória acadêmica, tive a oportunidade de estudar em um país diferente, e foi lá na Espanha, no meu mestrado que conheci uma pessoa incrível, que gostaria de agradecer não só pelo seu carinho, mas também por ser tão acolhedora e amiga, Raquel Lopes Diaz, obrigada por ser a espanhola mais brasileira que já conheci e por torcer por mim mesmo de tão longe! Saiba que torço muito por você também!

Ao meu marido José Carlos Rizk Filho que, conheci quando estava iniciando o doutorado, namorei, noivei e casei durante essa trajetória, e em todos os momentos foi companheiro e paciente. Tantas vezes abdicou de feriados, sábados e domingos para me fazer companhia em minhas atividades na UFES. Obrigada por todo carinho, confiança, cuidado e companheirismo imensamente valiosos no momento em que o desânimo e o cansaço se apresentavam a mim. Sou grata a Deus por me presentear com sua vida ao meu lado, e muito feliz por ter em você um homem de honra!

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPES/FUNCITEC.

## RESUMO

Em virtude de estudos anteriores mostrarem resultados conflitantes em relação aos efeitos do tratamento com estatinas na diabetes mellitus (DM), o objetivo da presente pesquisa foi investigar como o tratamento com alta dose de atorvastatina afeta a função vascular de ratos diabéticos. Foram utilizados ratos Wistar, pesando de 220 a 250g, separados em quatro grupos: 1) controle, tratado apenas com o veículo carboximetilcelulose (Ct); 2) controle tratado com atorvastatina 80 mg / kg / dia (Ct + At); 3) diabético induzido por estreptozotocina (STZ), tratado apenas com o veículo carboximetilcelulose (Db); e 4) diabético induzido por STZ, tratado com atorvastatina (Db + At). O tratamento foi realizado durante quatro semanas, diariamente, através de gavagem. Segmentos de aorta foram utilizados para investigar a reatividade vascular, a expressão proteica da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da subunidade NOX1, além de níveis de ânion superóxido. Foi observado que o tratamento com atorvastatina não afetou os níveis da glicemia em nenhum dos grupos. Nos ratos diabéticos, a reatividade vascular à fenilefrina aumentou quando comparada aos grupos controles, sendo que o tratamento com atorvastatina reduziu esta resposta nos ratos diabéticos. A remoção do endotélio aumentou a resposta à fenilefrina nos ratos controle, mas não no grupo diabético; a atorvastatina aumentou a modulação endotelial nestes ratos. O L-NAME (100  $\mu$ M) aumentou a reatividade em todos os grupos, mas este efeito foi maior nos ratos diabéticos tratados com atorvastatina. A Indometacina (10  $\mu$ M) e o NS398 (1  $\mu$ M) reduziram a resposta contrátil em ratos diabéticos e a atorvastatina reverteu estes efeitos, sem alterar a expressão de COX-2. A apocinina (30  $\mu$ M) diminuiu a resposta da fenilefrina em ratos diabéticos, os quais também mostraram aumento da NOX1 e de ânion superóxido; estes efeitos foram prevenidos pelo tratamento com atorvastatina. Os resultados sugerem que o tratamento com dose elevada de atorvastatina, independentemente da glicemia, reduz a lesão vascular, melhorando a função endotelial em aortas de ratos diabéticos através da redução dos prostanóides constritores derivados de COX-2. Ademais, reduz o estresse oxidativo através da NADPH oxidase, bem como um possível aumento da participação de óxido nítrico.

**Palavras-chaves:** atorvastatina; diabetes mellitus; função vascular; ciclooxigenase-2; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Because previous studies have conflicting results regarding the effects of statin treatment in diabetes mellitus (DM), the aim of this research was to investigate how treatment with high-dose atorvastatin affects the vascular function in diabetic rats. Wistar rats weighing 220 to 250g, were divided into four groups: 1) control group treated only with the vehicle carboxymethylcellulose (Ct); 2) control group treated with atorvastatin 80 mg / kg / day (Ct+At); 3) diabetic group induced by streptozotocin (STZ) treated only with the vehicle carboxymethylcellulose (Db); and 4) diabetic group induced by STZ treated with atorvastatin (Db+At). The treatment was done during four weeks, daily, via gavage. Aortic segments were used to investigate the vascular reactivity, the protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and subunit NOX1, and superoxide anions levels. It has been observed that treatment with atorvastatin did not affect glycemia levels in none of the groups. In the diabetic rats, reactivity vascular response to phenylephrine increased when compared to control groups, and treatment with atorvastatin reduced this response in diabetic rats. Removal of the endothelium increased response to phenylephrine in control rats but not in diabetic group; atorvastatin increased endothelial modulation in these rats. The L-NAME (100  $\mu$ M) increased reactivity in all groups, but this effect was greater in diabetic rats treated with atorvastatin. Indomethacin (10  $\mu$ M) and NS398 (1mM) decreased the contractile response in diabetic rats and atorvastatin reversed these effects without affecting COX-2 expression. The apocynin (30mM) decreased the response of phenylephrine in diabetic rats, which also showed increased NOX1 and superoxide anion; these effects were prevented by atorvastatin treatment. The results suggest that treatment with high dose of atorvastatin, regardless of glycemia reduces vascular injury and improves endothelial function in aorta from diabetic rats by reducing prostanoids constrictor 2 derivatives. Furthermore, reduced oxidative stress by HADPH oxidase and a possible increased in nitric oxide contribution.

**Key-words:** atorvastatin; diabetes mellitus; vascular function; cyclooxygenase-2; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo do experimento .....	61
Figura 2 –.Aorta torácica .....	66
Figura 3 – Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgão .....	67
Figura 4 – Esquema de curvas representativas do teste de viabilidade do músculo liso vascular e integridade do endotélio .....	70
Figura 5 – Resultado do controle ponderal.....	87
Figura 6 – Resposta ao KCl dos grupos experimentais.....	91
Figura 7 – Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta.....	92
Figura 8 – Efeito da remoção endotelial dos grupos experimentais .....	94
Figura 9 – Efeito do L-NAME na curva concentração-resposta à fenilefrina.	96
Figura 10 – Efeito da indometacina na curva concentração-resposta à fenilefrina.....	98
Figura 11 – Efeito do NS398 na curva concentração-resposta à fenilefrina .....	100
Figura 12 – Efeito da apocinina na curva concentração-resposta à fenilefrina .....	102
Figura 13 – Produção de ânion superóxido nos grupos experimentais .....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis de glicose sanguínea nos ratos por 4 semanas.....	88
Tabela 2 – Teste de curva glicêmica após 4 semanas de tratamento .....	89
Tabela 3 – Teste de resistência insulínica após 4 semanas de tratamento..	89
Tabela 4 – Valores de pD <sub>2</sub> e R <sub>max</sub> das curvas de concentração-resposta à fenilefrina.....	93
Tabela 5 – Valores de pD <sub>2</sub> e R <sub>max</sub> das curvas de concentração-resposta à fenilefrina na presença ou ausência de endotélio .....	95
Tabela 6 – Valores de pD <sub>2</sub> e R <sub>max</sub> das curvas de concentração-resposta à fenilefrina sob efeito do L-NAME.....	97
Tabela 7 – Valores de pD <sub>2</sub> e R <sub>max</sub> das curvas de concentração-resposta à fenilefrina sob efeito da indometacina .....	99



## LISTA DE ABREVIATURAS

*ADA: América Diabetes Association*

ADP: adenosina difosfato

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA: análise de variância

ATP: adenosina trifosfato

BH4: tetrahidrobiopterina

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: cloreto de cálcio dihidratado

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX: ciclooxigenases

COX-1: ciclooxigenase-1

COX-2: ciclooxigenase-2

DAG: diacilglicerol

DM: diabetes mellitus

DHE: dihidroetídio

ECA: enzima conversora da angiotensina

EDCF: fatores constritores derivados do endotélio

*EDHF: (endothelium-derived hyperpolarizing factor):* fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético

EPM: erro padrão da média

ERO: espécie reativa de oxigênio

FAD: flavina adenina dinucleotídio

FMN: flavina mononucleotídeo

GMPc: 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

HDL: lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA redutase: 3-hidroxi- metilglutaril-CoA redutase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HOCl: ácido hipocloroso

*ICAM (intercellular cell adhesion molecule):* molécula de adesão intercelular

IP<sub>3</sub>: 1,4,5-trifosfato de inositol

KCl: cloreto de potássio

LAM: molécula de adesão leucocitária

LDL: lipoproteína de baixa densidade

L-NAME: dicloridrato de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster

n: número de animais ou unidades experimentais

Na<sub>2</sub> EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético, sal dissódico

NaCl: cloreto de sódio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase

NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato de sódio

NO: óxido nítrico

NOS: oxido nítrico sintase

NOX: nonphagocyte NADPH oxidase

*OCT (Optimum cutting temperature)*: meio de congelamento de tecidos

ONOO<sup>-</sup>: peróxido de nitrito

PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1

PGI<sub>2</sub>: prostaciclina

PG: prostaglandina

PKC: proteína quinase C

PKG: proteína quinase G

PPGCF: Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

SDS: dodecil sulfato sódico

SI: Sistema Internacional

*SOD (superoxide desmutase)*: enzima superóxido desmutase

Temed: tetrametiletilenodiamina

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

Tween 20: polioxietileno sorbitano 20

TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

*VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)*: molécula de adesão celular

vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1	ESTATINA.....	28
1.2	DIABETES MELLITUS.....	36
1.2.1	<b>Doenças vasculares associadas à diabetes mellitus .....</b>	<b>37</b>
1.3	FUNÇÃO ENDOTELIAL.....	39
1.3.1	Fatores reguladores do tônus vascular.....	40
1.3.1.1	Óxido nítrico .....	40
1.3.1.2	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).....	43
1.3.1.3	Prostanóides .....	43
1.3.1.4	Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo .....	46
1.4	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	51
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	56
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	56
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	58
3.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	59

3.2.1	Obtenção do modelo experimental de diabetes.....	59
3.2.2	Concentração de glicose sanguínea.....	60
3.3	MEDIDA DIRETA DO PESO CORPORAL.....	62
3.4.1	Teste de sensibilidade à insulina .....	63
3.4.2	Teste de tolerância à glicose .....	63
3.5	REATIVIDADE VASCULAR.....	65
3.5.1	Avaliação da integridade do músculo liso vascular .....	68
3.5.2	Avaliação da integridade funcional do endotélio.....	69
3.5.3	Avaliação do tratamento com atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	70
3.5.4	Estudo da modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	71
3.5.5	Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos sobre a resposta à fenilefrina na aorta.....	72
3.5.6	Influência do tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos na via do óxido nítrico.....	72

3.5.7	Envolvimento de radicais livres no tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos.....	72
3.5.8	Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos.....	73
3.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDIO (DHE).....	74
3.7	ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA.....	76
3.7.1	Western Blot para detecção da isoforma COX-2 e da isoforma NOX1 da NADPH oxidase em aorta de ratos.....	76
3.7.2	Preparação do tecido e quantificação das proteínas.....	76
3.7.3	Eletroforese e transferência das amostras.....	77
3.7.4	Incubação com anticorpos.....	77
3.7.5	Detecção das proteínas.....	78
3.8	EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
3.9	FÁRMACOS, REAGENTES E ANTICORPOS.....	81
4.	RESULTADOS.....	85
4.1	EXPERIMENTOS REALIZADOS APÓS O TRATAMENTO CRÔNICO COM 80 MG / KG / DIA DE ATORVASTATINA EM RATOS DIABÉTICOS.....	86

4.1.1	Avaliação dos valores do peso corporal dos modelos experimentais.....	86
4.1.2	Avaliação dos índices glicêmicos antes, após a indução com estreptozotocina e durante o tratamento crônico com atorvastatina.....	87
4.1.3	Avaliação da resposta contrátil à fenilefrina entre os grupos estudados.....	90
4.1.4	Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora da fenilefrina.....	94
4.1.5	Efeito do bloqueio com L-NAME sobre as respostas vasoconstritoras à fenilefrina.....	96
4.1.6	Efeito do bloqueio com indometacina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	98
4.1.7	Efeito do bloqueio com NS398 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	100
4.1.8	Efeito do bloqueio com apocinina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	102
4.1.9	Efeitos do tratamento com atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos sobre a produção vascular de ânion superóxido .....	104
4.2	SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS .....	106
5	DISCUSSÃO .....	107



5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA SOBRE OS PARÂMETROS DE PESO E GLICÊMICOS NOS RATOS DIABÉTICOS.....	109
5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA NA REATIVIDADE VASCULAR EM RATOS DIABÉTICOS.....	112
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>122</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>145</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

As estatinas constituem uma classe de droga que têm demonstrado um efeito significativo na redução dos níveis de colesterol, importante para redução da morbidade e mortalidade cardiovascular. Por muito tempo foi referenciada unicamente com sua capacidade de redução de lipídios, porém, ao longo dos últimos anos, tem sido reconhecido que as estatinas podem adicionalmente atuar através de outros mecanismos independentes da diminuição do colesterol para promover uma redução em 30% do risco de eventos coronários (PANAYOTIS *et al.*, 2004).

A incidência de diabetes alcançou proporções epidêmicas em todo o mundo. Além do mais, a mortalidade dos pacientes diabéticos após um evento cardíaco é significativamente aumentada em comparação com pacientes não diabéticos (ALI RAZA & MOVAHED, 2003). Portanto, a prevenção primária tem desempenhado um papel importante na redução da incidência de doenças arteriais coronarianas em pacientes diabéticos.

Diabetes mellitus (DM) é um conhecido fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e suas complicações posteriores. A hiperglicemia, a inflamação sistêmica e o aumento do estresse oxidativo determinam o dano endotelial observado no DM (VERSARI *et al.*, 2009).

Como mencionado acima, o DM aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), e esses radicais livres desempenham um papel na patogênese das complicações vasculares (SPITALER & GRAIER, 2002). O aumento das EROs em DM pode resultar de uma atividade reduzida de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (KAMATA & KOBAYASHI, 1996) e catalase (SHY *et al.*, 2007), ou atividade aumentada da NADPH oxidase (COHEN & TONG, 2010;

SAN *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2007). Por conseguinte, o aumento do estresse oxidativo observado no DM pode conduzir a uma redução na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e acelerar a aterosclerose em vasos de condutância (LEMOS *et al.*, 2012).

Drogas redutoras de colesterol, tais como os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) –coenzima A (CoA) redutase (estatinas), têm ação vasoprotetora no DM. O mecanismo pelo qual as estatinas são vasoprotetora pode envolver a regulação positiva da expressão e produção da eNOS (ENDRES *et al.*, 1998), e a redução de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e da geração de ânion superóxido (ROSENSON & TANGNEY, 1998; WASSMANN *et al.*, 2001).

Estudos têm mostrado resultados conflitantes sobre o efeito real do tratamento com estatinas sobre a função vascular de ratos diabéticos (BELLIA *et al.*, 2012; TEHRANI *et al.*, 2013; PANAYIOTIS *et al.*, 2004; MASON *et al.*, 2015). Portanto, testou-se a hipótese de que uma dose elevada de atorvastatina (80 mg / kg) promove efeitos benéficos adicionais na função vascular de vasos de condutância em ratos diabéticos.

## 1.1 ESTATINA

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, principalmente nos países desenvolvidos. Um grande conjunto de evidências descritos em ensaios clínicos, assim como em estudos *in vitro*, justifica como um dos principais causadores, os elevados índices no plasma de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) (ROBERT *et al.*, 1998). A aterosclerose, por sua vez, é a principal doença cardiovascular, e há evidências de que a redução da

concentração plasmática de colesterol seja importante para a prevenção primária e secundária da doença arterial coronariana (STAMLER, WENTWORTH *et al.*, 1986).

Assim sendo, esta relação positiva entre a diminuição do colesterol com a prevenção cardíaca iniciou em 1984, quando um estudo multicêntrico conhecido como Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial (LRC-CPPT) (1984), testou a eficácia da colestiramina, um medicamento com efeito de diminuir o colesterol por ação de um sequestrante do ácido biliar, e sua relação com a diminuição na taxa de infarto do miocárdio.

Em 1971, o microbiologista Akira Endo, pesquisando um novo antibiótico, observou que certos fungos produziam um potente inibidor da produção do colesterol. O isolamento e análise desse composto inibidor foi realizado, e posteriormente foi sintetizada em laboratório a molécula que daria origem à matriz das estatinas, sendo a primeira da família (lovastatina) lançada em 1987 (ENDO, 2010).

Estudos angiográficos, como o REGRESS (2000), demonstraram que utilizando medicamentos para baixar o colesterol juntamente com mudança no estilo de vida, seriam capazes de reduzir a incidência de aterosclerose e eventos cardíacos coronarianos (BLUM, SIMSOLO *et al.*, 2004). Finalmente, a partir dos anos 90, estudos clínicos com estatinas mostraram, de forma inequívoca uma redução no risco relativo de infarto do miocárdio e / ou doenças coronarianas como prevenção primária, bem como a prevenção secundária. Vários estudos clínicos multicêntricos demonstraram esses benefícios do tratamento com estatinas. Dentre eles estão: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), Cholesterol And

Recurrent Events (CARE), Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID), West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) e Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS) (RAY, CANNON *et al.*, 2006).

Inibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, provaram ser os principais agentes redutores de LDL, de maior eficiência, se tornando o hipolipemiante mais utilizado na prática clínica (MOZAFFARIAN, NYE *et al.*, 2004; CALABRO, YEH, 2005).

São fármacos potentes que atuam através da inibição competitiva da enzima-chave da síntese de colesterol, promovendo a conversão deste em mevalonato (ENDO, 1992). Ao inibir a biossíntese de colesterol, o resultado obtido é um aumento na síntese e atividade de receptores de LDL, o que contribui para uma maior captação de partículas de LDL circulantes e dessa forma diminuindo sua concentração plasmática (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

As estatinas não só reduzem o colesterol LDL, como também aumentam o colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), efeito este que pode variar entre os diferentes tipos de estatinas. O HDL exerce seu efeito atero-protetor, principalmente, através da redução do colesterol depositado nos tecidos periféricos. Neste processo, o excesso de colesterol nos tecidos periféricos é transportado para a apolipoproteína que vai gerar uma molécula de HDL menor e mais densa podendo ser interiorizada no fígado, para sua excreção (LEWIS & RADER, 2005). Além do mais, o HDL tem diversos efeitos benéficos como função antiinflamatória, anti-oxidante, anti-trombótica e participa também de reparos do endotélio vascular (YAMASHITA *et al.*,

2010). Dessa forma, as estatinas não só aumentam a quantidade de HDL no plasma, mas também melhoram na sua funcionalidade (YAMASHITA *et al.*, 2010).

A terapia com estatinas apresenta uma redução no risco de eventos cardiovasculares em 20% a 30%, um efeito fortemente relacionado com a magnitude da redução do colesterol, proporcionando uma redução expressiva da morbidade e mortalidade cardiovascular (BAIGENT *et al.*, 2005). Entretanto, sua resposta clínica tem-se demonstrado altamente variável, embora as doses sejam individualmente ajustadas, grande parte dos pacientes não consegue atingir as metas de redução das taxas de colesterol esperadas (MANGRAVITE, THORN *et al.*, 2006).

O mevalonato que é convertido é um precursor dos compostos isoprenóides que estão envolvidos na sinalização e proliferação celular (LAROSA, 2001). Dessa forma, a inibição da HMG-CoA redutase não só traz benefícios referentes a síntese de colesterol como também na ação antiinflamatória e antiproliferativa, que hoje caracterizam os principais efeitos pleiotrópicos que lhes são atribuídos (LAROSA, 2001). Como resultados desses efeitos, podemos destacar: a melhora da função endotelial, a redução da inflamação vascular e o aumento da estabilidade da placa aterosclerótica (LIAO, 2002).

Dentre as funções das estatinas, muito se destaca a alta capacidade de melhora da disfunção endotelial. Esses benefícios estão evidentes e são independentes do seu principal efeito que é a redução de lipídeos. Estudos como o MIRACL (1998) compararam o tratamento precoce e tardio com atorvastatina, e observaram uma redução da mortalidade, do infarto não fatal e da isquemia do miocárdio para os que receberam tratamento precoce (DAVIGNON, 2004).

Entretanto, quando se trata de pacientes diabéticos, existem resultados contraditórios. Enquanto alguns não demonstram melhoria da dilatação dependente do endotélio (TEHRANI *et al.*, 2013), outros estudos mais recentes demonstram que a atorvastatina melhorou a função vasodilatadora dependente do endotélio, além de reduzir níveis de marcadores de ativação endotelial e inflamação (TAN *et al.*, 2002; MARCHESI, LUPATTELLI, *et al.*, 2000; WASSMANN *et al.*, 2001).

Um potencial mecanismo pelo qual as estatinas podem melhorar a função endotelial é através de seus efeitos antioxidantes. Por exemplo, as estatinas aumentam o relaxamento dependente do endotélio através da inibição da produção de EROs, tais como os radicais hidroxila e ânion superóxido (TAKEMOTO & LIAO, 2001). Embora reduzir os lipídios, por si só, possa diminuir o estresse oxidativo vascular (CAI & HARISSON, 2000), alguns destes efeitos antioxidantes de estatinas parecem ser independentes de colesterol. Além disso, em pacientes diabéticos o aumento da expressão da subunidade p22phox, um componente importante da NADPH oxidase, que leva a uma maior geração de ânion superóxido, foram suprimidos pelo tratamento com atorvastatina (CHRIST *et al.*, 2002).

Outra ação importante das estatinas referente ainda à função vascular, foi descrito por Ichiki *et al.* (2001), ao demonstrar que elas aumentam o número de células circulantes precursoras do endotélio, com isso promovem sua mobilização para áreas isquêmicas, possibilitando a reendotelização em regiões lesionadas, sem estimularem o espessamento da camada íntima.

Ademais, as estatinas possuem ação antioxidante. Seu metabólito hidroxil, que faz parte de praticamente 70% da molécula da atorvastatina no plasma, é capaz



de inibir a oxidação do LDL e HDL, podendo agir também de forma indireta nos mecanismos oxidativos normais, através da inibição da ação oxidante dos macrófagos (DAVIGNON 2004).

Outro efeito pertinente às estatinas é a ação anti-inflamatória principalmente relacionada aos eventos cardiovasculares. Um estudo a longo prazo chamado CARE (1992), foi capaz de mostrar que pacientes pós infarto agudo do miocárdio apresentaram uma redução nos níveis de proteína C-reativa (MASON, 2003). Uma outra revisão, mais recente foi capaz de demonstrar o efeito das estatinas nos marcadores séricos de doenças cardiovasculares, e o resultado foi que todas as estatinas foram capazes de reduzir os níveis de proteína C-reativa (MARCHESI *et al.*, 2000).

E por fim, porém não menos importante, tem sido descrito um papel imunomodulador para as estatinas. Assim, quando elas inibem a conversão da HMG-Coa redutase em mevalonato, esta envolvido a isoprenilação da geranyl-geranyl pirofostato e sistema Rho, que são proteínas participantes na maturação e divisão celular, diminuindo dessa forma a expressão de fatores teciduais e de proliferação celular (DAVIGNON 2004; MASATO *et al.*, 2002). Nas células endoteliais, observou-se a inibição da transcrição de diversos genes induzidos por NF-KB e diminuição da expressão de antígenos leucocitários humanos (HLA) induzidos por interferon-g, com inativação das células Th1 (tipo 1 helper). Na prática, estudos mostraram um menor índice de rejeição em órgãos transplantados em pacientes que receberam estatinas juntamente com os imunossupressores (DAVIGNON 2004; WALTER *et al.*, 2002).

O princípio farmacodinâmico de todas as estatinas é a inibição da biossíntese da molécula de colesterol através do bloqueio da enzima HMG-CoA redutase. Essa inibição da biossíntese do colesterol ocorre no fígado e resulta em uma *up-regulation* da expressão do receptor de LDL e aumenta a depuração de LDL da circulação.

O metabolismo de primeira passagem é expressivo e limita a disponibilidade sistêmica dos inibidores da HMG-CoA redutase, mas isto não se correlaciona com a sua atividade biológica, devido ao fígado ser seu principal local de ação, resultando na formação de metabólitos ativos, que contribuem de forma específica para cada indivíduo sobre o efeito na redução de lipídios (LIAO *et al.*, 2005).

De uma forma geral, as estatinas sofrem absorção intestinal; a metabolização se processa no fígado e a excreção é por via intestinal (a maior parte) e por via renal. Diferentemente das demais, a lovastatina e a simvastatina são apresentadas na forma de lactonas e são ativadas por hidrólise enzimática no fígado e, por isso, são consideradas pró-fármacos. Enquanto as demais estatinas são fármacos ativos apresentados na forma hidroxiácida e não necessitam de biotransformação (CORSINI *et al.*, 1999; SHITARA & SUGIYAMA, 2006).

A base estrutural para a inibição de HMG-CoA-redutase é uma porção formada pelo ácido glutárico-hidroximetil encontrada em todos os membros da família das estatinas. Independente desta característica comum, as várias estatinas diferem entre si por vários aspectos farmacológicos, como por exemplo, a lovastatina, simvastatina e pravastatina que são derivadas de *Aspergillus terreus*, ou seja, de origem natural enquanto outras formadas por um processo semi-sintético como fluvastatina e atorvastatina (ENDO, 2010).

Quando se refere à potência das estatinas as seguintes doses têm sido propostas como equipotentes: 10 mg de atorvastatina, 20 mg de sinvastatina, 40 mg de lovastatina, 40 mg de pravastatina e de 80 mg de fluvastatina. Estas doses levam a uma redução média dos níveis de LDL-colesterol em  $\pm 27\%$ , enquanto que cada nova duplicação da dose só conduz a uma diminuição de 6% adicional (DAVIGNON, 2004).

A obesidade e a resistência insulínica estão associadas aos fatores de riscos cardiovasculares, incluindo alteração de níveis de marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial (SHETTY *et al.*, 2004). O estudo e a inclusão das estatinas para os pacientes portadores dessas síndromes metabólicas crescem a cada dia, e a importância do tratamento concomitante com as estatinas tem se tornado cada vez mais presente visto o caráter preventivo dado a elas.

Em nosso estudo, escolhemos trabalhar com a atorvastatina que, apesar de atuar pelo mesmo mecanismo que as demais estatinas, apresenta maior contribuição dos metabólitos bioativos para a eficácia do fármaco, possivelmente por apresentar uma meia-vida significativamente mais longa em comparação com as demais estatinas.

## 1.2 DIABETES MELLITUS

A DM é uma doença metabólica conhecida também como uma síndrome sistêmica, de caráter crônico devido à impossibilidade de cura. Apresenta uma alteração no metabolismo de carboidratos e gorduras causada pela insuficiência ou falta do hormônio insulina produzido pelas células  $\beta$  encontradas nas ilhotas de Langherans do pâncreas ou, todavia, pela incapacidade da insulina de agir sobre os tecidos alvos. A hiperglicemia resultante de alterações no metabolismo de carboidratos é capaz de induzir diversas alterações teciduais, levando à doenças micro e macrovasculares (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009).

A diabetes tipo 2 está sendo considerada como um dos mais sérios desafios globais de saúde pública do século XXI de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2016). Uma doença multifatorial, responsável pela mortalidade e morbidade de 8% da população mundial, sendo considerado um grave problema econômico em todo o mundo (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009). O número de pessoas com diabetes tipo 2 é crescente em resposta a vários fatores, como sedentarismo e a obesidade populacional (WHO, 2016). Estudos estimam que o número de pessoas que sofrem de diabetes tipo 2 aumentará de aproximadamente 171 milhões no ano de 2000, para 366 milhões em 2030, sendo os indivíduos mais jovens os mais afetados (DAVEL *et al.*, 2011).

A diabetes tipo 2 é uma doença metabólica caracterizada pelo desenvolvimento progressivo de resistência insulínica, incapacitando a utilização de glicose durante a exposição à insulina por parte dos tecidos (DAVEL *et al.*, 2011), pela deficiência na produção de insulina por parte das células  $\beta$  e pela hiperglicemia (MEEUWISSE-PASTERKAMP, VAN DER KLAUW *et al.*, 2008).

Além da predisposição genética, fatores ambientais também apresentam um papel significativo no desenvolvimento de diabetes tipo 2. Idade, obesidade, dislipidemia e o sedentarismo se tornam fatores de risco importantes para esta síndrome (CHENG, 2005).

### **1.2.1 Doenças vasculares associadas à diabetes mellitus**

Diversas complicações cardiovasculares e cerebrovasculares (SOLDATOS & COOPER, 2006), aterosclerose e obstrução vascular periférica (CADE 2008; SOLDATOS & COOPER, 2006), além de complicações microvasculares, como a retinopatia, nefropatia, neuropatia, estão associadas à diabetes (CADE 2008), levando a considerá-la não apenas uma doença metabólica, mas sim uma doença vascular (SRIKANTH & DEEDWANIA, 2007).

A doença macrovascular apresenta um dos mais dramáticos problemas clínicos ligados aos pacientes diabéticos, desenvolvendo-se em mais de 50% da população portadora de diabetes e sendo responsáveis por cerca de 50% a 60% da mortalidade (SOLDATOS & COOPER, 2006). Pacientes diabéticos apresentam um risco quatro vezes maior de desenvolverem doenças cardiovasculares, comparativamente à população normal (CADE, 2008). Os principais fatores para o desenvolvimento de doenças vasculares associados à diabetes tipo 2 são a resistência insulínica, obesidade, dislipidemia, hiperinsulinemia, síndrome metabólica, hipertensão, hiperglicemia e tabagismo (VAN DER REE *et al.*, 2001).

Dentre aos principais fatores de risco, a hiperglicemia crônica é um dos mais importantes nas complicações vasculares (CADE, 2008), pois seus efeitos afetam diretamente as células endoteliais, aumentando a formação de EROs e estresse

oxidativo (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009), além de desenvolver um estado constante e progressivo de lesões na parede vascular, que vão causar o que chamamos de disfunção endotelial (VAN DER REE *et al.*, 2001).

A disfunção endotelial constitui-se em um conjunto de fatores que se tornam marcadores precoces do desenvolvimento de doenças macrovasculares (CADE, 2008). Encontramos nela alterações na vasodilatação devido à diminuição da biodisponibilidade do NO, a disfunção das células musculares lisas, a elevada produção de fatores de crescimento endotelial, a inflamação crônica, danos na fibrinólise e aumento da agregação plaquetária (CADE, 2008).

### 1.3 FUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio é formado por uma única camada de células que recobrem o lúmen vascular, com muitas outras funções além do que se acreditou ter por muito tempo, ao invés de ser apenas uma camada celular imóvel, que servia somente como uma barreira física entre o sangue circulante e dos tecidos subjacentes. A partir de meados dos anos 80 foi reconhecido que as células endoteliais são metabolicamente ativas com importantes funções parácrina, endócrinas e autócrinas, indispensável para a manutenção da homeostasia vascular (VERSARI *et al.*, 2009; SENA *et al.*, 2007).

Dentre as várias funções do endotélio vascular estão à regulação da integridade dos vasos, o crescimento vascular e a remodelação, o crescimento do tecido e o metabolismo, respostas imunes, a adesão celular, a angiogênese, a hemostasia e a permeabilidade vascular. Portanto, o endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular, no controle do fluxo de sangue nos tecidos, nas respostas inflamatórias e para manter a fluidez do sangue (BAGI *et al.*, 2006; TESHAMARIAM, BROWN *et al.*, 1990; OKAZAKI T *et al.*, 2011).

Para manter a homeostase até então descrita, o endotélio apresenta um equilíbrio quanto à formação e liberação de fatores derivados do endotélio com ação vasodilatadora e efeitos antiproliferativos, incluindo o fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF) (COHEN & TONG 2010), o NO (SPITALER & GRAIER, 2002; Kamata K & KOBAYASHI, 1996) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (SHI *et al.*, 2007). A endotelina - 1 (San *et al.*, 2007), a angiotensina II, EROs (WEI *et al.*, 2007; LEMOS *et al.*, 2012), o TXA<sub>2</sub> e a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), (AVOGARO, DE

KREUTZENBERG & FADINI, 2008; HADI & SUWAIDI, 2007) estão entre os mediadores que exercem efeitos vasoconstritores.

As células endoteliais produzem também ação antitrombótica, através do efeito inibitório de agregação plaquetária causada pelo NO e PGI<sub>2</sub>, e moléculas pró-trombóticas (factor de Von Willebrand), que promovem agregação plaquetária, e o inibidor do ativador do plasminogénio - 1 (PAI-1), que inibe a fibrinólise (OKAZAKI *et al.*, 2011).

A manutenção do equilíbrio entre os agentes vasodilatadores e vasoconstritores é fundamental para a regulação do tônus muscular (HADI & SUWAIDI, 2007). Este equilíbrio mantido pelas células endoteliais integra estímulos que regulam a função hemodinâmica (GIANNOTTIAND & LANDMESSER, 2007). Além disso, as células endoteliais se encontram envolvidas na produção de moléculas específicas do processo inflamatório, chamadas moléculas de adesão leucocitária (LAM), moléculas de adesão intracelular (ICAM) e moléculas de adesão celular vascular (VCAM) (HADI & SUWAIDI, 2007).

### **1.3.1 Fatores reguladores do tônus vascular**

#### **1.3.1.1 Óxido nítrico**

Desde 1980 já se conhece que a vasodilatação é mediada por fatores produzidos pelo endotélio. (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1983; MONCADA, Palmer, *et al.*, 1991). Entretanto, somente sete anos mais tarde, foi proposto que o NO seria este mediador, devido ao relaxamento induzido por nitritos em meio ácido na aorta de coelhos sujeitos a remoção prévia do endotélio (PALMER, Ferrige, *et al.*, 1987; FURCHGOTT, 1988; ANGUS & COCKS, 1989;



MARÍN & SÁNCHEZ-FERRER, 1990; MONCADA, PALMER, *et al.*, 1991; MARIN & RODRIGUEZ- MARTINEZ, 1995). O NO é considerado o mais importante e melhor vasodilatador caracterizado. Sendo um gás altamente reativo e lipofílico (POTENZA, ADDABBO, *et al.*, 2009), possui um peso molecular baixo, facilitando difundir-se rapidamente, e apresenta um tempo de meia vida de apenas 4 segundos (GUERCI *et al.*, 2001), sendo o principal responsável pelo relaxamento dependente do endotélio (AVOGARO, DE KREUTZENBERG & FADINI, 2008). Além do mais, o NO apresenta propriedades antioxidantes, anti-proliferativas, anti-inflamatórias, anti-coagulantes e anti-trombogênicas (SCHALKWIJK & STEHOUWER, 2005), se tornando responsável pela regulação de diversos processos celulares e fisiológicos.

O NO é um radical livre produzido por um processo de oxidação onde há uma conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina (POTENZA, ADDABBO, *et al.*, 2009). Esta síntese pode ser induzida por vários estímulos físicos e químicos, como estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento (shear stress), agregação plaquetária, histamina, catecolaminas, aldosterona, vasopressina, bradicinina, adenosina difosfato (ADP), serotonina, acetilcolina, entre outras (Marín, Rodríguez-Martínez, 1997; MONCADA, PALMER, *et al.*, 1991). A reação descrita é catalisada pelo complexo enzimático óxido nítrico sintase (NOS) (AVOGARO, DE KREUTZENBERG & FADINI, 2008; KOLLURU, SIAMWALA, *et al.*, 2010).

São conhecidas três isoformas de NOS. A primeira isoforma da NOS foi encontrada no cérebro, conhecida como NO-sintase neuronal (nNOS), de origem constitutiva, onde o NO tem papel de neurotransmissor. Há também a isoforma NO-sintase endotelial (eNOS), presente no endotélio, também constitutiva, encontrada

em condições fisiológicas no organismo, e assim como a nNOS são dependentes da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para sua ativação.

A terceira isoforma foi encontrada em macrófagos, em células endoteliais, em cardiomiócitos, dentre outros. Chamada de NO-sintase induzível (iNOS), seu nome já diz, apresenta a particularidade de ser fortemente induzida por estímulos pro-inflamatórios, e ao contrário das demais, ela independe da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  para sua ativação.

Ademais, a síntese de NO só ocorre na presença de co-fatores, tais como: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ( NADPH) , tetrahidrobiopterina (BH4) flavina adenina dinucleótido (FAD) e flavina mononucleótido (FMN) (FÖRSTERMANN & SESSA 2012).

O óxido nítrico (NO) promove vasodilatação a partir do momento que se difunde para o músculo liso vascular e, por meio da ativação da guanilato ciclase solúvel gera um aumento da concentração intracelular de 3', 5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Este GMPc, por sua vez, ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, diminuindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, promovendo o relaxamento vascular. Outra via também, é pela PKG sobre a via de canais para  $\text{K}^{+}$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e voltagem, onde ao hiperpolarizar a membrana plasmática, promove o relaxamento. Além da vasodilatação, o NO inibe a ativação, secreção e agregação de plaquetas, previne a adesão de leucócitos e inibe a migração e proliferação das células musculares lisas (POTENZA, ADDABBO *et al.*, 2009).

### 1.3.1.2 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

O tônus vascular pode ser modulado por outros fatores além do NO. Estudos mostraram uma mudança no potencial de repouso da membrana plasmática do músculo liso vascular. Esta constatação levou a investigar outras vias de relaxamento vascular, e concluiu que a hiperpolarização da membrana do músculo liso é outro mecanismo que explica o relaxamento dependente do endotélio (NAGAO & VANHOUTTE, 1991; GARLAND & MCPHERSON, 1992).

Este mecanismo ocorre pela ativação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio do músculo liso vascular, dos EDHF que, através da hiperpolarização, diminuem a atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo L voltagem dependente, proporcionando uma redução do cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) favorecendo seu relaxamento (FÉLETOU, KÖHLER *et al.*, 2010). As respostas mediadas pelos EDHFs são importantes na homeostase vascular, todavia podem ser alteradas em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, aterosclerose e DM (FÉLETOU, KÖHLER *et al.*, 2010).

### 1.3.1.3 Prostanóides

Os componentes dos fatores constritores derivados do endotélio (EDCF) são os prostanóides, substâncias que participam da atividade vasomotora do endotélio além de ser um agente antiplaquetário (WRIGHT & BARSNESS 2001). Dentre eles encontramos a prostaciclina ( $PGI_2$ ), prostaglandina E2 ( $PGE_2$ ), prostaglandina D2 ( $PD_2$ ), prostaglandina F2 $\alpha$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e o TXA2. São prostanóides derivados do ácido araquidônico, um constituinte dos fosfolipídios de membrana, resultante da ação da fosfolipase A2.

Após sua liberação o ácido araquidônico é oxidado pela enzima ciclooxigenase (COX), responsável pela síntese de prostanóides, e convertido a PGH<sub>2</sub>, precursor de muitos outros prostanóides (BAGI *et al.*, 2005).

As prostaglandinas atuam preferencialmente, porém não exclusivamente, em receptores específicos transmembrana, acoplados à proteína G. Estas proteínas, quando ativadas, podem estimular ou inibir a adenilato ciclase, causando um aumento ou redução dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), respectivamente, promovendo o relaxamento do músculo liso vascular ou vasoconstrição. De todos os receptores de prostanóides ativadores de células do músculo liso vascular, os receptores TP parecem ser os únicos responsáveis por contrações dependentes do endotélio (FÉLETOU, KÖHLER *et al.*, 2010).

A PGI<sub>2</sub> foi a primeira substância vasoconstritora dependente do endotélio a ser descoberta (MONCADA *et al.*, 1977). Uma vez liberada induz o relaxamento da musculatura lisa vascular e reduz agregação plaquetária, via aumento de AMPc (DAVIDGE, 2001).

Esta interação também pode estimular a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que atua aumentando a permeabilidade dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP hiperpolarizando a membrana das células musculares lisa, e estimulando a saída de Ca<sup>2+</sup> do citosol por aumento da atividade de bomba de Ca<sup>2+</sup> sarcolemal e da SERCA do retículo sarcoplasmático. Com isso ela diminui o íon disponível à contração levando ao seu relaxamento (FÉLETOU, KÖHLER *et al.*, 2010).

Somado a este mecanismo, temos também a ação dos demais prostanóides prostaglandina E<sub>2</sub>, a PGF<sub>2</sub>α e o TXA<sub>2</sub> que se unem aos seus receptores EP<sub>1</sub>, FP e TP respectivamente. Quando unidos, ocorre a ativação da fosfolipase C formando inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), os chamados segundo mensageiros,

ativando a mobilização de cálcio intracelular e PKC para gerar a contração do músculo liso vascular (BAGI *et al.*, 2005).

A via da COX portanto são enzimas que sintetizam prostanóides e se apresentam por duas isoformas: a chamada tipo 1 (COX-1), constitutiva na maioria das células, está relacionada com as funções fisiológicas, se apresentando em maior quantidade nos vasos saudáveis; e a do tipo 2 (COX-2). Esta isoforma induzida pelas citocinas, fatores mitogênicos e por estímulos pró-inflamatórios em vários tipos de células, tem sua expressão vascular aumentada e está diretamente relacionada com condições patológicas associadas a processos inflamatórios como aterosclerose e hipertensão arterial (ANTMAN, DeMets, *et al.*, 2005; ÁLVAREZ *et al.*, 2005).

Vários estudos têm demonstrado que o equilíbrio entre prostanóides vasodilatadores e vasoconstritores é modificado na diabetes (BAGI *et al.*, 2005; FÉLÉTOU, HUANG, *et al.*, 2011), e pode implicar a forma induzível da enzima, a COX-2. Enquanto em artérias saudáveis, prevalece a isoforma constitutiva da COX-1 com formação preferencial de prostaciclina.

No entanto, por estímulos inflamatórios e físicos pode haver a estimulação da isoforma COX-2 (FÉLÉTOU, HUANG, *et al.*, 2011). A resistência insulínica está associada com um estado pró-inflamatório da parede vascular que conduz a remodelação vascular e disfunção endotelial em artérias sistêmicas (CHAHWALA & ARORA, 2009). A COX-2 é induzida durante algum processo inflamatório, portanto prostanóides derivados da COX-2 tem sido associado com o desenvolvimento de complicações vasculares sob condições de resistência à insulina e risco cardiovascular (BAGI *et al.*, 2005; VIRDIS *et al.*, 2009; FÉLÉTOU, HUANG, *et al.*, 2011), que por sua vez podem contribuir para a elevação da pressão arterial. Xavier

e colaboradores (2012) demonstraram em seu estudo uma “up-regulation” de COX-2 ligado a um aumento na formação de prostanóides vasoconstritores em artérias de resistência de ratos diabéticos, e este fator é uma peça chave para a progressão da disfunção endotelial na diabetes.

#### **1.3.1.4 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo**

O estresse oxidativo está aumentado na diabetes e apresenta-se como a base para suas complicações vasculares (AVOGARO, DE KREUTZENBERG & FADINI, 2008). É causado pelo desequilíbrio entre os sistemas que produzem oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes, levando ao aumento da produção de EROs somado a uma redução da ação protetora de antioxidantes e incapacidade de reparação dos efeitos produzidos pelas EROs (VAN DER REE *et al.*, 2001).

As EROs nada mais são do que átomos ou moléculas que apresentam elétrons desemparelhados, também conhecidas como radicais livres, sendo potencialmente reativas com moléculas biológicas capazes de causar oxidação. Elas apresentam várias fontes endógenas como a mitocôndria (a principal geradora de EROs) (LEE & WEI, 2007), o citocromo P-450, o mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido, a xantina oxidase, mieloperoxidases, COX, lipooxigenases, NOS e enzimas da família da Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidases (NADPH oxidases ) (MUELLER *et al.*, 2005; BEDARD & KRAUSE, 2007; KOH, Oh, *et al.*, 2009; WESELER & BAST, 2010).

Em condição fisiológica normal, células vasculares são capazes de produzir uma pequena quantidade de EROs, sendo constantemente destruídas pelo próprio sistema endógeno. Com isso, o corpo se mantém em equilíbrio constante através da

geração (sistema oxidante) e destruição (sistema anti-oxidante) de EROs. Quando há um desequilíbrio, o aumento da geração de EROs pode ativar vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (SZASZ *et al.*, 2007; WESELER & BAST, 2010; ZINKEVICH & GUTTERMAN, 2011).

No sistema vascular, o ânion superóxido assume destacada relevância entre as EROs, sendo formado pela redução univalente do oxigênio, que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases, além de ser produzida pelo desacoplamento da eNOS (WESELER & BAST, 2010; FÖRSTERMANN & SESSA 2012).

Após sua formação, o ânion superóxido, além de exercer seus efeitos em diferentes vasos sanguíneos e órgãos, pode dar origem a outras EROs. Talvez por isso é considerado um dos mais importantes EROs. O ânion superóxido reage com o NO, inativando-o e originando o peróxido de nitrito (ONOO<sup>-</sup>). Por outro lado, através da ação da superóxido desmutase (SOD), o ânion superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o qual pode ser convertido em água por ação da glutathione peroxidase ou da catalase.

Destaca-se também o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual apresenta grande participação na função vascular, pois ele regula vias de sinalização que levam à contração e ao crescimento do músculo liso vascular, migração e inflamação (Dröge *et al.*, 2002). No entanto, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também foi descrito como um vasodilatador, a depender de sua concentração (FÉLETOU & VANHOUT, 2006). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também pode ser metabolizado pela mieloperoxidase e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou também

reagir com metais de transição e dar origem ao radical hidroxila (GRIEDLING, SORESCU & USHIO-FUKAI, 2000; SZOCS *et al.*, 2002). A catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetiva quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (CAI, 2005; SINDHU *et al.*, 2005; GONGORA *et al.*, 2006).

O complexo da NADPH oxidase, uma das principais fontes geradoras de ânion superóxido a nível vascular, é um heterodímero constituído por diferentes subunidades: gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox e rac2 (DRUMMOND *et al.*, 2011). A gp91phox, também conhecida como NOX (*Nonphagocytic NADPH oxidase*), apresenta subunidades homólogas que são NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 presentes em vários tecidos e diretamente ligadas a funções biológicas como a de defesa e de crescimento celular (DRUMMOND *et al.*, 2011). Suas isoformas variam de acordo com a localização e dependendo do tipo de célula presente. Por exemplo, as células endoteliais expressam NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5 (DRUMMOND *et al.*, 2011).

Quando se trata de endotélio vascular, os principais componentes do complexo enzimático NADPH oxidase, são a NOX1 e NOX4. Diante disto, o aumento da expressão dessas isoformas está sendo diretamente relacionadas a várias doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, hipertensão, diabetes, isquemia / reperfusão ou aneurismas da aorta abdominal (DRUMMOND & SOBEY, 2014). Isso nos leva a correlacionar processos como estresse oxidativo, inflamação vascular, disfunção endotelial e remodelamento vascular, que são consideradas causadoras de diversas patologias cardiovasculares, com um aumento de EROs



provenientes de NADPH oxidase (DRUMMOND *et al.*, 2011; MONTEZANO & TOUYZ, 2014).

Em relação a óxido nítrico sintase (NOS), as três isoformas podem promover a formação de  $O_2^{\bullet-}$ , se estiverem desacopladas. No caso da endotelial, seu desacoplamento é causado pela ausência dos co-fatores L-arginina e BH4 (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

Porém, como a tendência do sistema fisiológico é manter o equilíbrio, existem também os agentes antioxidantes presentes no corpo humano: seriam a SOD, a catalase e a glutatona peroxidase que atuam contrapondo a ação das EROs (SENA, PEREIRA, *et al.*, 2013). Cada uma agindo de acordo com suas particularidades, todas têm o objetivo de diminuir a agressão desses radicais livres. Portanto a SOD, que apresenta diferentes isoformas como a SOD cobre/zinco (SOD-Cu/Zn; SOD1), SOD mitocondrial (SOD-Mn; SOD2) e a SOD extracelular (SOD-EC; SOD3), atua catalisando a reação que transforma duas moléculas de ânion superóxido em  $H_2O_2$  e oxigênio (SENA, PEREIRA, *et al.*, 2013). Outra enzima conhecida é a catalase, um dos mais importantes antioxidantes intracelulares. Altamente eficiente esta localizada principalmente em peroxissomas, mas também atua no citosol e catalisa a conversão de  $H_2O_2$  em água e em seguida dismutando ânion superóxido pela SOD (SINDHU *et al.*, 2005; SENA, PEREIRA, *et al.*, 2013).

Tanto a hiperglicemia aguda como a crônica estão associadas com a disfunção endotelial. Os efeitos deletérios da sobrecarga de açúcar na diabetes tipo 2 são frequentemente amplificados e associados à resistência à insulina, incluindo

hiperlipidemia e hipertensão. A ativação de NADPH oxidase está implicada no estresse oxidativo associada com hiperglicemia (COHEN & TONG, 2010).

O sistema renina-angiotensina é ativado na diabetes, possivelmente pela NADPH oxidase. A angiotensina II atua através do receptor AT1 para inibir muitas das ações da insulina na vasculatura, incluindo a vasodilatação. O aumento de receptores e ativação de AT1 / NADPH oxidase parece contribuir para a resistência à insulina vascular, a disfunção endotelial, a apoptose, e a inflamação (COHEN & TONG, 2010).

#### 1.4 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Como já descrito, o endotélio é um tecido ativo com funções fisiológicas importantes principalmente na manutenção do equilíbrio hemodinâmico e hemostático. Qualquer desempenho contrário de suas funções é considerado como disfunção endotelial, caracterizando a incapacidade das células endoteliais conduzirem a vasodilatação adequada quando estimuladas (DAVEL *et al.*, 2011). Essa disfunção pode ser devido a vários fatores como a provocada por estresse bioquímico ou físico, ou um desequilíbrio entre a liberação de vasodilatadores e vasoconstrictores, ou por um aumento da proliferação das células musculares lisas e até mesmo por aumento do estado pró-inflamatório e pró-trombótico no vaso sanguíneo (VERSARI *et al.*, 2009). A disfunção endotelial é considerada o primeiro passo na progressão da aterosclerose e doenças cardiovasculares (POTENZA, ADDABBO *et al.*, 2009). O endotélio perde seu equilíbrio fisiológico desenvolvendo-se um estado de vasoconstrição, inflamação, coagulação, trombose e proliferação (POTENZA, ADDABBO *et al.*, 2009; VAN DER REE *et al.*, 2001).

O principal marcador da disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade de NO, devido a uma redução da sua produção e/ou a uma perda da sua atividade biológica (VAN DER REE *et al.*, 2001), e isso pode ser observado pela diminuição da expressão da eNOS, da reduzida quantidade de co-fatores e substratos para a eNOS, pelos danos na ativação da eNOS e pelo consumo de NO pelas EROs (POTENZA, ADDABBO *et al.*, 2009).

De fato, um mecanismo que influencia bastante as enfermidades é a reação do ânion superóxido com o NO, o que leva à diminuição da biodisponibilidade do

NO, e como uma cascata de reações, diminuem seus efeitos vasodilatadores e antiinflamatórios; além de aumentar a formação de peroxinitrito, gerando cada vez mais o estresse oxidativo (Wallace *et al.*, 2010). Além disso, o ânion superóxido também contribui para o processo inflamatório, participando do aumento da expressão de COX-2, presente na diabetes (SHI & VANHOUTTE, 2009). Cabe ressaltar que o aumento nos níveis de EROs em pacientes diabéticos é a principal causa de complicações vasculares associadas a esta patologia (SHI & VANHOUTTE, 2009).

A fonte de radicais livres derivadas de oxigênio na diabetes ainda não é bem estabelecida, mas alguns pesquisadores sugerem que a hiperglicemia não só é capaz de aumentar a liberação de ácido araquidônico pelas células vasculares, mas também que o metabolismo deste, via da COX, possa ser uma importante fonte geradora de EROs (TESFAMARIAM *et al.*, 1990; MULLARKEY, EDELSTEIN *et al.*, 1990). Portanto a diabetes é capaz de aumentar seletivamente a expressão de COX-2 sem afetar os níveis de COX-1, e dessa forma gera um aumento da liberação de prostanóides vasoconstritores (BAGI *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual a COX-2 se apresenta super expressa na parede vascular não é claro, entretanto acredita-se que é devido as EROs ativar as vias de transdução de sinal redox-sensíveis e específicos eventos reguladores da transcrição (BAGI *et al.*, 2006). Um estudo mostrou também que em coronária de cães diabéticos, o ácido araquidônico exógeno induziu a contração pela via do TXA<sub>2</sub>, o que em artérias de animais controle provocou relaxamento mediado por PGL<sub>2</sub> (DAVEL *et al.*, 2011).

Além de aumentar a produção de ânion superóxido, o endotélio de um paciente diabético também produz altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levando conseqüentemente

a uma maior produção intracelular de radical hidroxila induzindo a disfunção endotelial (HADI, SUWAIDI, 2007). Isso ocorre porque a hiperglicemia provoca dano na parede vascular por mecanismos diversos como: aumento do fluxo de glicose e outros açúcares através da via do poliol; aumento da formação intracelular de avançados produtos finais da glicação; ativação de proteína quinase C (PKC) e a ativação da via de hexosamina (SENA, PEREIRA *et al.*, 2013). Os efeitos globais destes mecanismos são aumento do estresse oxidativo, apoptose e aumento da permeabilidade vascular. Essa quantidade de EROs que se encontra aumentada na diabetes, promove uma reação direta entre NO e o ânion superóxido (HADI, SUWAIDI, 2007).

Em situação de hiperglicemia, a atividade da enzima conversora de angiotensina se encontra aumentada. Conseqüentemente, a angiotensina II exerce efeitos nas células musculares lisas por estimular a contração, o crescimento, a proliferação e a diferenciação. Além de se responsabilizar pela migração de monócitos e estimulação da produção de ICAM, VCAM e LAM (VAN DER REE *et al.*, 2001), atuam no aumento da expressão da proteína de quimioatração de monócitos 1 responsável por promover o movimento de monócitos para a parede dos vasos sanguíneos, estimulando a agregação plaquetária e também ativando a NADPH oxidase, enzima responsável pela produção de ânion superóxido (HSUEH & QUIÑONES, 2003).

Conforme descrito até o momento, a diabetes cursa com o aumento da geração de prostanóides constritores e estresse oxidativo, o que propicia injúria vascular e formação de aterosclerose. Ao mesmo tempo, já é reportado que a atorvastatina inibe a NADPH oxidase, uma das maiores fontes geradoras de ânion

superóxido em vasos sanguíneos e que possui relação direta com a atividade da COX-2 (DE BATISTA *et al.*, 2014). Portanto, nossa hipótese é que o tratamento crônico com a dose máxima de atorvastatina irá melhorar a reatividade vascular à fenilefrina em aorta isolada de ratos diabéticos, provavelmente por interferir no processo inflamatório instalado na diabetes.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar efeitos pleiotrópicos de estatina (atorvastatina) na dose de 80 mg / kg em um tratamento crônico, promove efeito pleiotrópico positivo sobre a função vascular em vaso de condutância em ratos diabéticos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a reatividade vascular à fenilefrina, em aortas de ratos diabéticos e controle, e avaliar o tratamento com 80 mg/kg/dia de atorvastatina por 30 dias nestas respostas
- ✓ Investigar a influência do endotélio e do NO sobre o efeito contrátil induzido pela fenilefrina em aortas de ratos diabéticos e controle tratados ou não com atorvastatina.
- ✓ Investigar a participação de prostanóides vasoconstritores no efeito induzido pela fenilefrina.
- ✓ Verificar se a expressão vascular da COX-2 está alterada no modelo de DM e se a atorvastatina pode influenciar no processo.
- ✓ Comparar o efeito da atorvastatina na produção de EROs e sobre a função vascular de ratos diabéticos e controle.
- ✓ Verificar se a expressão vascular do NOX1 está alterada no modelo de DM e se a atorvastatina influi neste processo.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os protocolos experimentais realizados receberam autorização da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), conforme o protocolo nº 017/2012. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com os princípios éticos para experimentação animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Biologia Experimental e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - 1991).

## 3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade aproximada de 10 a 12 semanas, pesando entre 220 – 250 gramas. Estes animais foram fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES (Vitória, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura e umidade constantes, além de ciclo claro-escuro de 12 / 12 horas, com livre acesso a ração e água.

### 3.2.1 Obtenção do modelo experimental de diabetes

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: um grupo diabético (Db), cujos experimentos foram realizados após quatro semanas de diabetes estabelecida, um grupo diabético tratado com atorvastatina (Db+At), um grupo não diabético (Ct) e um grupo não diabético tratado com atorvastatina (Ct+At). O tratamento foi realizado pela técnica de gavagem, onde os animais tratados receberam por quatro semanas uma dose diária de 80 mg/kg de atorvastatina diluída no veículo carboximetilcelulose (0,5%), e os grupos não tratados receberam diariamente somente o veículo, carboximetilcelulose (0,5%).

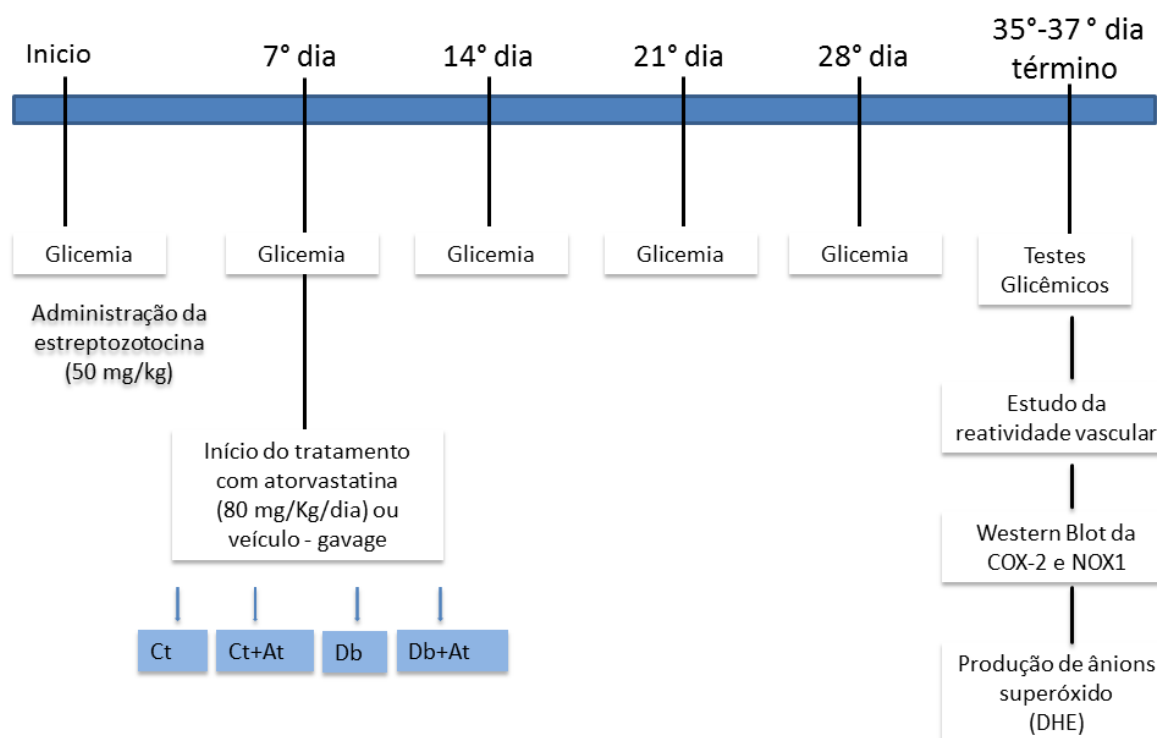
O DM do tipo 1 foi induzido através de injeção única de estreptozotocina, 50 mg/kg, i.v. dissolvida em 0,2 ml de solução tampão citrato 0,1 M (pH 4,5), enquanto que os animais controles receberam igual volume apenas de solução tampão citrato. A solução com estreptozotocina, assim como a solução tampão citrato foram aplicadas através da veia peniana, para este procedimento os ratos foram anestesiados com cetamina/xilazina (Xavier, *et al.*, 2003).

### 3.2.2 Concentração de glicose sanguínea

Os níveis de glicose no sangue foram mensurados usando um hemoglicoteste (ACCU-CHEK®Active analyzer, Roche, Mannheim, Germany) antes e após a injeção de estreptozotocina ou tampão citrato. Aqueles animais que recebiam a injeção de estreptozotocina e que apresentavam um nível de glicose no sangue superior a 250 mg / dl foram considerados hiperglicêmicos, caracterizando um modelo de DM tipo 1, largamente utilizada para investigações desta doença devido às semelhanças fisiopatológicas da doença de origem imunológica que apresenta uma deficiência na produção de insulina causada por uma diminuição da quantidade de células beta presentes nas ilhotas de Langerhans no pâncreas (MARCHAND, ARANY *et al*, 2010).

Ao final do tratamento, desses animais de aproximadamente dezesseis semanas de idade, foram obtidos segmentos de aorta torácica para medidas não só bioquímicas como também foram usados para identificação de ERO através da técnica de imunofluorescência. De acordo com a sequência de experimentos, foi pesquisado se o tratamento com altas doses de atorvastatina influencia de alguma forma as alterações vasculares funcionais associadas a esse processo patológico. Para isto, foram obtidos anéis de aorta torácica destes animais com o objetivo de avaliar a reatividade vascular através de experimentos *in vitro*.

A Figura esquematiza, de forma resumida, os protocolos experimentais realizados.



**Figura 1 – Esquema representativo dos grupos de animais utilizados no presente estudo e dos respectivos protocolos experimentais desenvolvidos, na sequência em que foram analisados**

Experimentos com animais dos grupos Wistar controle (Ct) (n = 8), Controle tratado com atorvastatina (Ct+At) (n = 16), diabéticos (Db) (n= 23) e diabéticos tratados com atorvastatina (Db+At) (n = 7).

O índice de mortalidade ao aplicar a estreptozotocina nos ratos wistar foram minimizados ao introduzir água com açúcar nos primeiros 3 dias após a indução.

### 3.3 MEDIDA DO PESO CORPORAL

A medida do peso corporal dos ratos dos grupos controle, diabético, controle tratado com atorvastatina e diabético tratado com atorvastatina foi realizada semanalmente. Estas avaliações ocorreram no mesmo horário, com os mesmos equipamentos e dirigido sempre pela mesma pessoa, com intuito de diminuir vieses.

Com estas informações, foi possível avaliar não só o efeito da doença instalada no animal, mas também o efeito do tratamento sobre esta conduta farmacológica.

### 3.4 MEDIDA DA GLICEMIA

Foram medidas a glicemia capilar dos ratos do grupo controle, diabético, controle tratado com atorvastatina e diabético tratado com atorvastatina semanalmente. Este processo ocorreu sempre pelas manhãs, no mesmo horário, com os mesmos equipamentos e pela mesma pessoa, com intuito de diminuir vieses. Os ratos eram mantidos em jejum de doze horas e então era realizada a medida da glicose usando um hemoglicoteste (ACCU-CHEK®Active analyzer, Roche, Mannheim, Germany). Através deste procedimento e com estas informações, foi possível avaliar não só o efeito da doença instalada no animal, mas também o efeito do tratamento farmacológico.

#### 3.4.1 Teste de sensibilidade à insulina

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado ao final de 4 semanas de tratamento, dois dias antes de serem sacrificados. Neste experimento os ratos se apresentavam sem estarem em condição de jejum. Foi então administrada uma injeção intraperitoneal de insulina 0,75 L / kg (Sigma, St. Louis, MO) nos ratos e em seguida, amostras de sangue da veia caudal foram obtidas nos tempos: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Para a aferição dos valores de glicemia, foi utilizado um glicosímetro (ACCU-CHEK®Active analyzer, Roche, Mannheim, Germany)

#### 3.4.2 Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância a glicose foi realizado ao final das quatro semanas de tratamento; para este experimento, os animais ficam em jejum de 12 horas. O teste

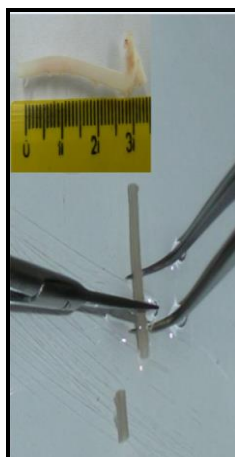
consistiu na aferição das variações na glicemia após administração de glicose (2 mg/Kg) por via intraperitoneal, nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração (BERTULOSO *et al.*, 2015). Para a aferição dos valores de glicemia, foi utilizado um glicosímetro (ACCU-CHEK®Active analyzer, Roche, Mannheim, Germany).



### 3.5 REATIVIDADE VASCULAR

Após a realização das medidas descritas acima, os animais dos grupos Ct, Ct+At, Db e Db+At tiveram sua função vascular investigada através de estudos de reatividade vascular *in vitro* com segmentos de aorta em preparação de banho de órgãos (NIELSEN & OWMAN, 1971; MARÍN, SÁNCHEZ-FERRER *et al.*, 1988). A finalidade desses estudos foi não só avaliar se o tratamento com atorvastatina influenciou a reatividade vascular, como também conhecer possíveis fatores vasoativos envolvidos.

Os ratos, então foram anestesiados, sacrificados por decapitação seguida de exsanguinação, utilizando toda e possível forma para minimizar o sofrimento dos animais em experimentação. O toráx foi aberto, e a aorta torácica foi cuidadosamente removida com auxílio de pinças e tesoura, posteriormente foi colocada em uma placa de Petri com solução refrigerada (4°C) de Krebs-Henseleit: 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,1 mM glicose e 0,01 mM Na<sub>2</sub>EDTA). A aorta foi, então, manipulada delicadamente com as pinças para retirada do tecido conectivo e adiposo e em sequencia, foi cortado um número de seis segmentos cilíndricos de 3 a 4 mm de comprimento (Figura 2). Durante todo este processo, a aorta e seus segmentos mantiveram submersos em solução resfriada de Krebs- Henseleit.



**Figura 2 – Aorta torácica, de um rato Wistar, imersa em solução refrigerada de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo. Na imagem, a aorta esta sendo dividida em segmentos cilíndricos de 3 a 4 mm. (Adaptado de Angeli, 2013).**

Em continuidade, os segmentos foram posicionados no aparato experimental, como demonstrado esquematicamente na

**Figura 3.** Cada anel de artéria foi então colocado dentro de cubas contendo um volume padronizado de 5 mL de solução de Krebs-Henseleit que se mantém continuamente gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>), de pH em torno de 7,4, e aquecida a  $36 \pm 0,5$  °C por um sistema de Banho Maria circulante com termostato.

O objetivo deste experimento foi avaliar a força desenvolvida pelo vaso. Nesta preparação, dois fios de aço inoxidável, em formato de triângulos, são passados através do lúmen dos anéis da aorta, mantendo os fios paralelos enquanto os anéis são tensionados. Um dos triângulos se liga a haste fixa da preparação, que por sua vez se mantém presa ao fundo da cuba, e o outro triângulo fica preso numa haste móvel, ligada ao transdutor de força isométrica (TSD 125 C *BIOPAC Systems, Inc.*, Califórnia, EUA) ligado ao sistema de aquisição de dados biológicos (MP100

BIOPAC Systems, Inc., Califórnia, EUA) e que por sua vez transmitiu ao computador que estava conectado (

Figura 4).

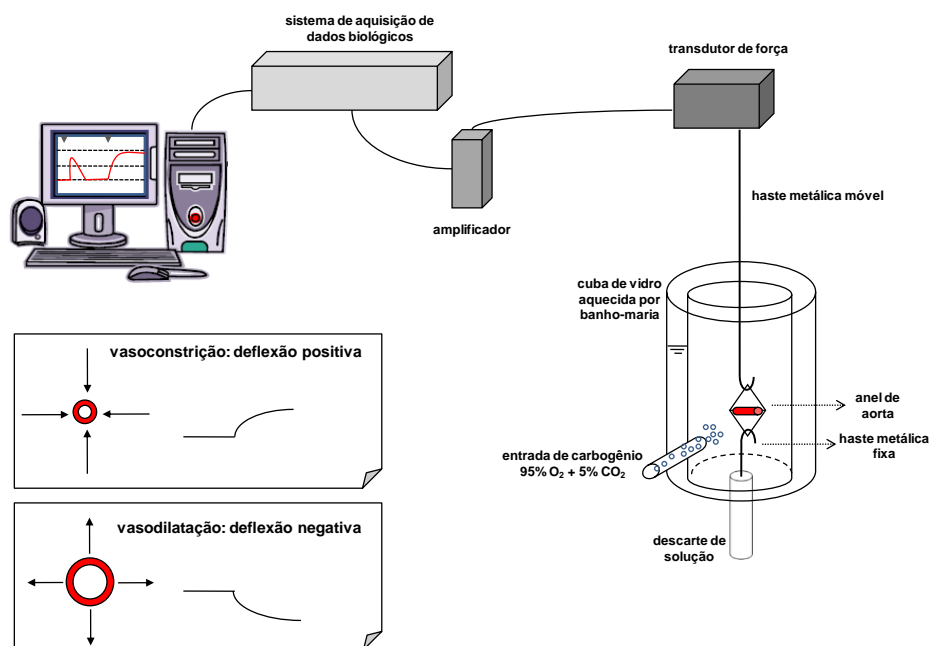


Figura 3 – Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro* (adaptado de Batista, 2014).

O anel de aorta é conectado à preparação através de dois triângulos de aço inoxidável, fixos acima e abaixo por hastes, móvel e fixa, respectivamente. O transdutor de força detecta as variações mecânicas na resposta vascular, e traduzem ao sistema de aquisição de dados biológicos seguidos da transferência para o computador e então, registrado.

Após os anéis de aorta serem montados no sistema, estes se mantiveram a uma força de repouso de 1 grama-força durante 45 minutos, chamado período de estabilização. Este valor foi adotado neste estudo como a forma representativa da

força gerada pelos anéis de aorta. O equivalente no Sistema Internacional (SI) para essa força basal do anel em repouso é de 0,015 N.

### 3.5.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Seguindo o período de estabilização (

**Figura 4 A)**, foi adicionado cloreto de potássio (KCl) ao banho numa concentração final de 75 mM, com o intuito de estimular a atividade contrátil induzida por despolarização (

**Figura 4 B)**. Após obter a reação contrátil esperada, os anéis de aorta foram lavados (

**Figura 4 C)** por aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit para retornarem a tensão basal também chamada de tensão de repouso, seguida por um novo intervalo de 30 minutos para novamente levar a estabilização do sistema (

**Figura 4 D)**. Uma nova dose de KCl (75 mM) foi então adicionada ao banho (

**Figura 4 E)** desta vez com o objetivo de adquirir uma contração máxima do músculo liso vascular (

Figura 4 F), que foi mensurada após 30 minutos de incubação, tempo suficiente para atingir um platô no registro desta contração. Quando a variação entre o basal e o valor máximo de contração chegou a, pelo menos, um grama de força,

os anéis de aorta de todos os grupos eram considerados íntegros. Após este platô, novamente os anéis foram lavados por mais três vezes seguidas (

**Figura 4 G)** para que retornassem à tensão de repouso e, novamente se esperou 30 minutos estabilizando o sistema (

**Figura 4 H)**, após este processo os anéis seguiram para uma avaliação da integridade funcional do endotélio.

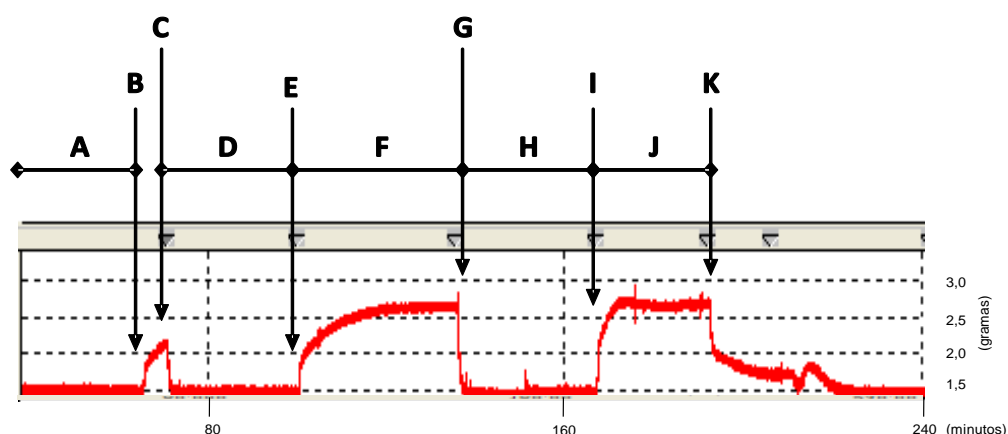
### **3.5.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio**

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzida por acetilcolina. Para isso, os anéis de aorta foram pré-contraídos com 1  $\mu\text{M}$  de fenilefrina (

**Figura 4 I e**

**Figura 4 J).** Uma vez, obtido o platô, foi adicionado 10  $\mu\text{M}$  de acetilcolina (

**Figura 4 K).** A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis em que a acetilcolina foi capaz de induzir relaxamento igual ou superior a 85 % nos ratos Wistar controles e diabéticos tratados ou não em relação à contração máxima provocada pela fenilefrina.



**Figura 4 – Registro com curvas representativas dos testes de viabilidade do músculo liso vascular com KCl e de integridade funcional do endotélio (adaptado de Dias, 2011).** Teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização; E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização. Teste para avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Contração com fenilefrina (1  $\mu$ M); J) Platô induzida pela fenilefrina; K) Adição de acetilcolina (10  $\mu$ M). O tempo foi registrado em minutos, representado no eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força registrada em gramas (g), observada no eixo vertical.

### 3.5.3 Avaliação do tratamento com atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade muscular lisa e endotelial, os diferentes anéis de aorta seguiram protocolos diferentes, embora simultaneamente. Neste caso, os anéis foram lavados três vezes e passaram por um período de estabilização de 30 minutos de duração, mantendo a tensão basal. Para investigar o efeito do tratamento com atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta a este agonista alfa-adrenérgico, na concentração de 0,1 nM a 0,3 mM, ao final foram totalizadas 14 distintas concentrações adicionadas em ordem crescente e

sequencialmente ao banho (Figura 6 A). O efeito desta concentração crescente de fenilefrina foi normalizado em todos os grupos em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (75 mM), que foi considerada 100 % da resposta contrátil.

#### **3.5.4 Estudo da modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

O efeito do tratamento com atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos na participação do endotélio sobre a resposta contrátil à fenilefrina foi investigado após a remoção mecânica deste componente vascular. Esta remoção foi realizada antes de os anéis de aorta serem fixados ao aparato experimental, visto que esta remoção mecânica do endotélio foi realizada por uma leve fricção na parede interna do anel de aorta utilizando um fio polido e rígido de aço inoxidável. Para confirmar a ausência do endotélio, foi avaliada a incapacidade de relaxamento dos anéis de aorta incubados com 10  $\mu$ M de acetilcolina após contração prévia com 1  $\mu$ M de fenilefrina. É considerada incapacidade de relaxamento quando este é inferior a 10 %, cálculo realizado em relação a resposta máxima de contração à fenilefrina, assim como descrito anteriormente.

Sendo assim, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas em segmentos de aorta com os chamados, endotélio íntegro (E<sup>+</sup>) e sem endotélio (E<sup>-</sup>), nos quatro grupos experimentais que participaram dos estudos de reatividade vascular.

### **3.5.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos sobre a resposta à fenilefrina na aorta**

Os protocolos de reatividade vascular, deste momento em diante do experimento, foram igualmente realizados para todos os quatro grupos de tratamento. Portanto, seguindo o teste do endotélio e posteriormente a estabilização da preparação por um tempo de 30 minutos, o fármaco a ser estudado foi incubado por mais trinta minutos, e ao final deste período foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M).

### **3.5.6 Influência do tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos na via do óxido nítrico**

Com o objetivo de estudar a participação do NO na resposta contrátil à fenilefrina, o anel de aorta foi incubado com um inibidor não-seletivo da enzima NOS, o N G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu$ M).

### **3.5.7 Envolvimento de radicais livres no tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos**

Para verificar o envolvimento de EROs nos ratos diabéticos ou não tratados com atorvastatina, na resposta contrátil à fenilefrina foi utilizado a apocinina (APO, 100  $\mu$ M), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, ou seja, na presença de antioxidantes, inibindo uma das principais enzimas formadoras de radicais livres, possibilitando avaliar se o tratamento melhora a disfunção endotelial através da modulação da produção de EROs.



### **3.5.8 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o tratamento de atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos**

Com o objetivo de estudar a influência dos prostanóides da via da COX na vasoconstrição induzida pela fenilefrina, foram utilizados os seguintes fármacos: Indometacina (10  $\mu$ M), um inibidor não específico da COX e o NS 398 (1  $\mu$ M), inibidor específico da COX-2.

### 3.6 IMUNOFLOURESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDIO (DHE)

A técnica utilizada para verificar o efeito do tratamento com atorvastatina na diabetes sobre a produção *in situ* de anion superóxido, foi a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE), os procedimentos seguiram conforme previamente descrito (NUNES *et al.*, 2014).

O DHE é um derivado do etídio, que em contato com ânion superóxido, oxida-se e então liga-se ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Este método permite analisar a produção “in situ” de anion O<sub>2</sub> nos segmentos arteriais. Para isto, os segmentos de aorta foram retirados dos animais, em seguida, foram limpos e colocados em uma solução de Krebs-HEPES contendo 30 % de sacarose permanecendo ali por pelo menos uma hora em um tubo de eppendorf.

Posteriormente, os seguimentos foram adequadamente posicionados dentro de um blister, onde submergidos em meio de congelamento de tecidos para criostomia *Optimum cutting temperature* (OCT) *Tissue-Tek* (Sakura, Finetek Europe, Flemingweg, Holanda) permaneceram congelados e mantidos a -80°C até o dia do experimento.

Utilizando um criostato, os segmentos de aorta foram cortados em anéis com 10 µm de espessura e posicionados em lâminas previamente gelatinadas. Passado um período de 60 a 90 minutos numa temperatura de 37° C, as seções transversais da aorta foram bloqueadas durante um período de duas horas, com uma combinação de soluções contendo PBS, 5 % de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA), com o objetivo de lavar e bloquear uniões

inespecíficas do anticorpo, e 0,3 % de detergente polioxietileno sorbitano 20 (Tween 20), para evitar a perda dos segmentos de aorta e para permeabilizar o tecido aumentando a entrada do anticorpo ao local específico.

Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 759 mg de  $\text{NaCl}$ , 41,7 mg de  $\text{KCl}$ , 4,9 mg de  $\text{MgCl}_2$ , 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à 37° C. Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escorrido e o excesso foi seco. O próximo passo, foi a incubação com DHE 2  $\mu\text{m}$  por duas horas na estufa com câmara fechada a 37° C. A luminescência emitida foi visualizada com microscópio fluorescência invertido (NIKON Eclipse Ti-S, x20 objective) e câmara fotográfica (NIKON digital sigth DS-U2) com filtro de fluorescência para DHE. O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com  $\lambda_{\text{exc}} = 546 \text{ nm}$  e detectado com  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ . As imagens foram quantificadas pelo programa Image J.

### 3.7 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA

#### **3.7.1 Western Blot para detecção da isoforma COX-2 e da isoforma NOX1 da NADPH oxidase em aorta de ratos**

A técnica de Western Blot (TOWBIN, STAEHELIN *et al.*, 1979) foi utilizada para determinar a influência do tratamento por quatro semanas de atorvastatina sobre a expressão protéica no âmbito vascular da enzima COX-2 e da isoforma NOX1 da NADPH em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e diabéticos. A expressão protéica foi realizada em condições basais (segmentos retirados logo após o animal ser sacrificado).

#### **3.7.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas**

As amostras foram preparadas utilizando segmentos de aorta torácica de todos os grupos. Os anéis de aorta foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de serem utilizados. Com auxílio do homogeneizador (Marconi, MA102/MINI, Brasil), as amostras teciduais foram homogeneizadas em microtubos contendo solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH:7,4, em banho de gelo.

Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, em 6.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Em uma pequena amostra do sobrenadante, foi realizada a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Com o valor

quantificado, foi calculado o volume necessário para uma carga de 40-60 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada em partes iguais, com solução tampão de homogeneização. Por último, alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%).

### **3.7.3 Eletroforese e transferência das amostras**

As amostras agora diluídas em solução de Laemmli, foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 7,5% e 10% para COX-2 e NOX1 (1,5 M Tris HCl pH: 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura).

Ao final da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por metanol durante 20 segundos. Para realizar a transferência o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche e banhados por uma solução tampão de transferência (Tris 88 Materiais e métodos 25mM, glicina 190mM, SDS 0.1% e Metanol 20%) à temperatura ambiente usando um “*semi-dry*” (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) com uma corrente de 25 V por 1 hora.

### **3.7.4 Incubação com anticorpos**

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, Tris HCl 10

mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Sequencialmente, as membranas foram incubadas durante a noite à 4° C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para COX-2 (1:200; anticorpo monoclonal de coelho; Cayman Chemical, Ann Arbor, Mi, USA), e para NOX1 (gp22phox, 1:500; anticorpo monoclonal de coelho; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), em um segundo momento a mesma membrana foi utilizada para incubar com  $\alpha$ -actina (1:5000; anticorpo monoclonal; Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA).

Depois deste momento, as membranas foram lavadas, através de agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com o correspondente anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete: anticorpo IgG anti-coelho (1:5000).

### **3.7.5 Detecção das proteínas**

As proteínas correspondentes a COX-2, NOX1 e  $\alpha$ -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ELC 89 Materiais e métodos Plus, Amersham™ GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas eram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham TM, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas.

Os dados de expressão proteica das proteínas COX-2 e NOX1 foram expressos como razão da expressão proteica da  $\alpha$ -actina, usadas como controle de

carga. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas, para isto, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram escaneadas e analisados com o software Image J.

### 3.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foram utilizados os programas *Microsoft Office Excel* (Redmond, Washington, EUA) e *GraphPad Prism Software 6.0* (San Diego, Califórnia, EUA). O software *GraphPad Prism* é configurado na língua inglesa, portanto, os valores decimais dos gráficos são delimitados por pontos, e não por vírgulas.

Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do número de animais usados em cada experimento (n).

Em relação aos experimentos de reatividade vascular, foram calculados os valores de resposta máxima (Emax) e de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina através da análise de regressão não-linear de cada curva individualmente.

Para variáveis de distribuição normal, as diferenças foram analisadas usando o teste t de *Student* pareado ou não pareado para comparação de duas médias. Para comparar três médias ou mais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma via para comparação entre os grupos tratados ou medidas repetidas. Quando o teste ANOVA detectava significância estatística, foi realizado o pós-teste (*pos-hoc*) de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .



### 3.9 FÁRMACOS, REAGENTES E ANTICORPOS

- Atorvastatina cálcica: Morepen Laboratories
- Acetilcolina, cloridrato: Sigma-Aldrich Co.
- Acrilamida (N, N`-Metilenbisacrilamida 40 % Solução 37, 5:1): BioRad
- Acido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA): Sigma-Aldrich Co.
- Anticorpo monoclonal produzido em coelho para anti-COX-2 (Cayman Chemical)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para  $\alpha$ -actina (Sigma)
- Anticorpo NOX1
- Anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete IgG anti-coelho: BioRad
- Anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete IgG anti-camundongo: Stressgen Bioreagents Corporation
- Apocinina: Fluka, Sigma-Aldrich Co.
- Azul de bromofenol (3`, 3`, 5`, 5"-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico): Sigma-Aldrich Co.
- Carboximetilcelulose

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (cloreto de cálcio dihidratado): Merck, Pancreac
- Carbogênio (95 % de  $\text{O}_2$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ ): White Martins, Praxair, Inc.
- Ketamina
- Dihidroetídio (DHE): Invitrogen-Molecular Probes Inc.
- EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético): Sigma-Aldrich Co.
- Etanol (96 %): Merck & Co.
- Estreptozotocina
- Fenilefrina, hidrocloreto: Sigma-Aldrich Co.
- Glicerol: Sigma-Aldrich Co.
- Glicina (ácido aminoacético): Sigma-Aldrich Co.
- Glicogênio: Sigma-Aldrich Co.
- Glicose: Merck & Co.
- Indometacina (Sigma)
- KCl (cloreto de potássio): Merck, Pancreac
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato monopotássico): Merck, Pancreac
- Leite desnatado em pó: Nestlé
- L-NAME ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil éster), dicloridrato: Sigma- Aldrich Co.
- Marcador de peso molecular 6 a 180 kDa: Nippon Genetics Europe

- Metanol: Sigma-Aldrich Co.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de magnésio heptahidratado): Merck, Pancreac
- $\text{Na}_2$  EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético, sal dissódico): Sigma-Aldrich Co.
- NaCl (cloreto de sódio): Merck, Pancreac
- $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio): Merck, Pancreac
- NS 398(N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Cayman Chemical)
- octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL CA-630): Sigma Aldrich Co.
- Persulfato amônico (APS) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL plus): Amersham Life Science, Pharmacia Biotech
- Sacarose: Merck
- SDS (dodecil sulfato sódico): Sigma-Aldrich Co.
- Solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) com  $\text{Ca}^{2+}$  e com  $\text{Mg}^{2+}$ : Invitrogen-Gibco
- Solução tampão citrato
- Temed (tetrametiletilenodiamina): Sigma-Aldrich Co.
- Tris [tris(hidroximetil)aminometano]: Sigma-Aldrich Co.

- Tris-HCl: Sigma-Aldrich Co.
- Tween 20 (polioxietileno sorbitano 20): Sigma-Aldrich Co.
- Uréia (Sigma)
- Xilazina

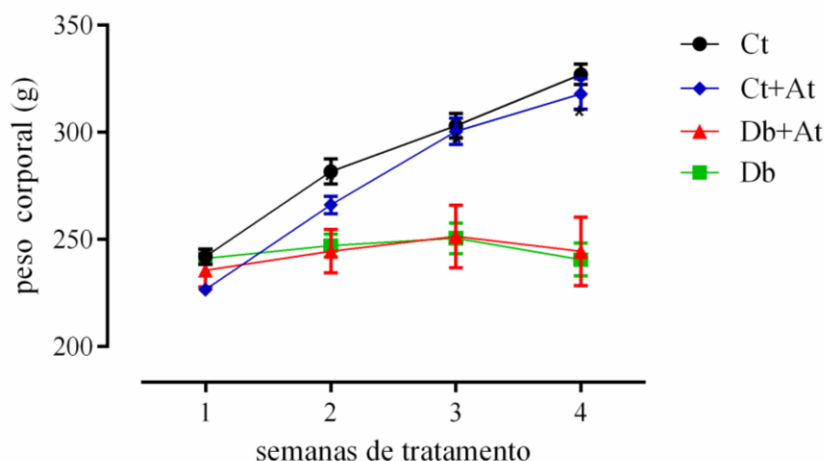
Todos os fármacos foram diluídos em água destilada e mantidos em temperatura controlada.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS APÓS O TRATAMENTO CRÔNICO COM 80 MG / KG / DIA DE ATORVASTATINA EM RATOS DIABÉTICOS

##### 4.1.1 Avaliação dos valores do peso corporal dos modelos experimentais

As medidas do peso corporal foram avaliadas semanalmente nos animais que participaram dos experimentos. No início do estudo, os quatro grupos de tratamento apresentavam o peso corporal semelhante (Ct:  $248 \pm 14$  g, n = 19; Ct+At:  $226 \pm 12$  g, n = 17; Db:  $237 \pm 20$  g, n = 33 e Db+At:  $235 \pm 28$  g, n = 24;  $p > 0,05$ ). Durante as quatro semanas de tratamento os ratos que foram induzidos a diabetes através da injeção de 50mg/kg de estreptozotocina tiveram uma redução de peso comparados aos grupos não diabéticos, e o tratamento com 80mg/kg/dia de atorvastatina, não causou alteração significativa no peso desses animais, tampouco apresentou variações significativamente ao ganho de peso corporal nos ratos dos grupos controle (Ct:  $324 \pm 26$  g; Ct + em:  $317 \pm 30$  g; Db:  $233 \pm 49$  g \* e Db + At :  $244 \pm 61$  g \*; \*  $p < 0,05$ ).



**Figura 5 – Animais induzidos à diabetes sofrem uma perda de peso corporal progressiva e tratamento com atorvastatina não influencia no ganho de peso corporal tanto de ratos controle ou diabéticos.** Comparação do peso corporal (em gramas, g) entre os grupos controle (Ct), controle tratado (Ct+At), diabéticos (Db) e diabéticos tratados (Db+At), semanalmente, e ao longo das 4 semanas de tratamento com atorvastatina (80 mg / Kg / dia, gavagem).

#### **4.1.2 Avaliação dos índices glicêmicos antes, após a indução com estreptozotocina e durante o tratamento crônico com atorvastatina.**

Antes de iniciar o tratamento com atorvastatina, nos ratos dos grupos diabéticos foram administrados uma dose única de estreptozotocina na veia peniana com o intuito de induzir a DM, para isso foi avaliado a glicose destes animais antes e após a indução para confirmação. Estes animais então exibiram após a injeção de estreptozotocina uma hiperglicemia severa que se manteve da primeira até a quarta semana de tratamento (Tabela 1). O tratamento com atorvastatina 80mg/kg/dia não afetou a hiperglicemia em ratos diabéticos tampouco em ratos controle que permaneceram com a glicose em níveis clinicamente aceitáveis (Tabela 1).

Ao final da quarta semana, foram realizados testes glicêmicos nos quatro grupos de animais e foi constatado que o tratamento com 80mg/kg/dia de atorvastatina não afetou a curva glicêmica nem a resistência à insulina destes animais (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 1: Níveis de glicose sanguínea nos animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não tratados com 80mg/kg/dia com atorvastatina por quatro semanas**

<b>Controle de glicose</b>	<b>Ct (mg / dL) n=19</b>	<b>Ct+At (mg / dL) n=17</b>	<b>Db (mg / dL) n=33</b>	<b>Db+At (mg / dL) n=14</b>
1 semana	103 ± 7	125 ± 10	457 ± 95 *	395 ± 43*
2 semana	106 ± 7	128 ± 8	445 ± 94 *	458 ± 89*
3 semana	129 ± 10	121 ± 12	494 ± 114*	461 ± 108*
4 semana	112 ± 12	102 ± 14	514 ± 100*	394 ± 147*

Os valores expressos como média ± EPM.

\* p < 0.05 vs. Controle; ANOVA uma via, pós-teste de Tukey.



**Tabela 2: Valores referentes ao teste de Curva Glicêmica nos animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com 80mg/kg/dia de atorvastatina após quatro semanas de tratamento.**

Curva Glicêmica	Ct (mg / dL) n=4	Ct+At (mg / dL) n=4	Db (mg / dL) n=4	Db+At (mg / dL) n=4
Basal	110 ± 24	88 ± 10	345 ± 107*	413 ± 41*
30 min	227 ± 28	258 ± 68	468 ± 101*	394 ± 19*
60 min	187 ± 24	161 ± 15	429 ± 98*	378 ± 25*
90 min	145 ± 15	126 ± 8	444 ± 129*	389 ± 25*
120 min	116 ± 14	115 ± 5	399 ± 105*	375 ± 5*

Os valores expressos como média ± EPM.

\* p < 0.05 vs. Controle; ANOVA uma via, pós-teste de Tukey.

**Tabela 3: Níveis de glicose sanguínea no teste de resistência insulínica em animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com 80mg/kg/dia de atorvastatina por quatro semanas.**

Teste de Resistência Insulínica	Ct (mg / dL) n=5	Ct+At (mg / dL) n=5	Db (mg / dL) n=5	Db+At (mg / dL) n=5
Basal	112 ± 11	123 ± 8	525 ± 86*	420 ± 30*
30 min	81 ± 14	80 ± 12	491 ± 71*	400 ± 52*
60 min	78 ± 17	92 ± 12	437 ± 83*	363 ± 13*
90 min	79 ± 15	79 ± 9	340 ± 66*	316 ± 30*
120 min	85 ± 10	87 ± 10	316 ± 29*	295 ± 37*

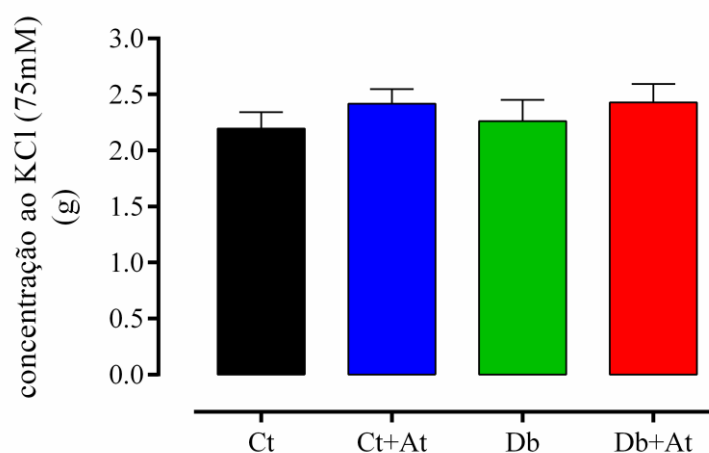
Os valores expressos como média ± EPM.

\* p < 0.05 vs. Controle – ANOVA uma via, pós-teste de Tukey.

#### 4.1.3 Avaliação da resposta contrátil à fenilefrina entre os grupos estudados

Para dar início aos protocolos de estudo da reatividade vascular, o primeiro passo foi avaliar a integridade dos componentes da aorta. Para isso foi testado o componente funcional do músculo liso vascular, cuja contração máxima induzida por 75 mM KCl foi semelhante nos anéis de aorta dos quatro grupos estudados: controle ( $2,20 \pm 0,15$  g, n = 18); Controle tratado com atorvastatina ( $2,41 \pm 0,13$  g; n = 16); diabético ( $2,26 \pm 0,19$  g, n = 31); diabético tratado com atorvastatina ( $2,43 \pm 0,16$  g, n = 14);  $p < 0,05$ , ANOVA uma-via (Figura 6).

Seguido o teste de integridade do músculo liso, foi realizado o teste do endotélio, que teve por objetivo avaliar a capacidade do endotélio promover vasodilatação frente a 10  $\mu$ M de acetilcolina após pré-contracção com 1  $\mu$ M de fenilefrina. Tal pré-contracção com fenilefrina foi similar entre os grupos. E em relação ao relaxamento dependente do endotélio induzido por uma única dose de acetilcolina (10  $\mu$ M), artérias de ratos que apresentaram a camada endotelial comprometida, com redução do relaxamento diante do teste do endotélio, foram excluídas. Conforme já foi descrito, os valores limítrofes para considerar o anel de aorta íntegro e, viabilizando a realização dos experimentos, são valores de relaxamento igual ou superior a 85 % em relação à contração máxima provocada pela fenilefrina previamente.



**Figura 6 – Tratamento com atorvastatina não modificou as respostas de KCl.**

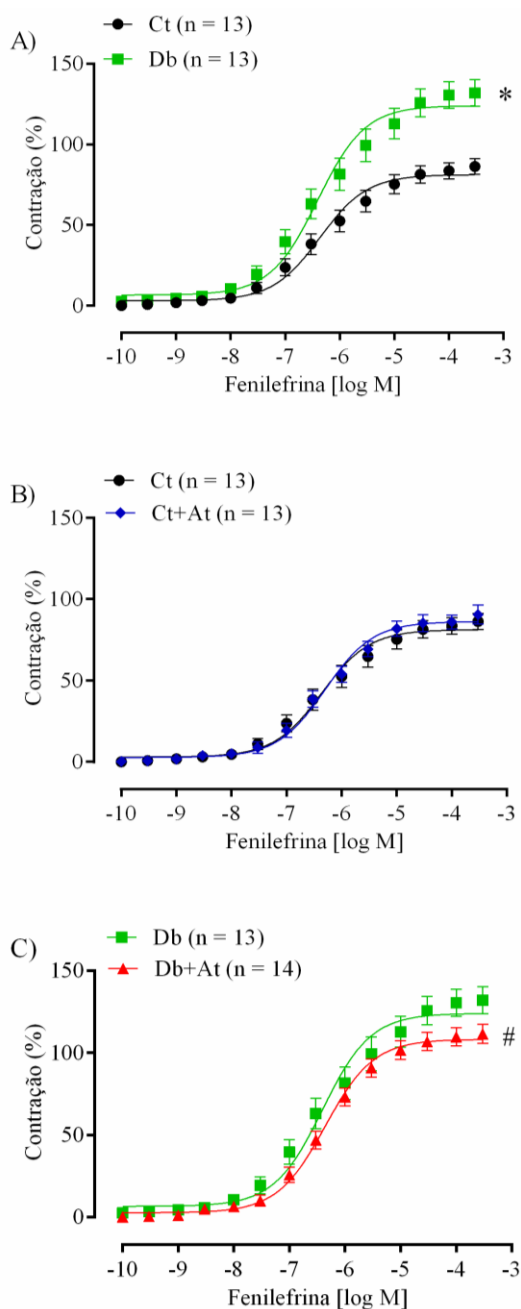
Não houve diferenças entre os grupos em relação à integridade muscular lisa ao contrair-se diante de 75 mM de KCl (Ct:  $2,20 \pm 0,15$  g, n = 18; Ct+At:  $2,41 \pm 0,13$  g, n = 16; Db:  $2,26 \pm 0,19$  g, n = 31; e Db+At:  $2,43 \pm 0,16$  g, n = 22, \*  $p > 0,05$ , ANOVA uma via).

Quando analisado os efeitos após quatro semanas de tratamento sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina na aorta torácica, observou-se que foi maior nos anéis de aorta de ratos diabéticos do que nos de ratos não diabéticos, demonstrado por uma resposta máxima significativamente maior (Emax: CT:  $86 \pm 5$  vs. Db:  $132 \pm 8,2$  \*,  $p < 0,05$  teste t de *Student*) (Figura 7 A).

Embora o tratamento com atorvastatina não tenha modificado a reatividade vascular à fenilefrina nos grupos controles (Emax: Ct:  $86 \pm 5$  vs. Ct+At:  $90 \pm 5,9$ ,  $p < 0,05$ , teste t de *Student*) (Figura 7 B), nos grupos diabéticos, foi observada que a resposta máxima à fenilefrina foi significativamente reduzida nos anéis dos animais

tratados com atorvastatina (Emax: Db:  $132 \pm 8,2$  vs Db+At:  $112 \pm 5,8$ ,  $p < 0,05$ , teste t de Student) (Figura 7 C).

Portanto, estes dados sugerem que a atorvastatina tem efeito na redução da disfunção endotelial nos ratos com DM, como também observado pelos valores na Tabela 4.



**Figura 7 - Atorvastatina reduz hiperreatividade vascular à fenilefrina.** Curva concentração-resposta de fenilefrina em anéis de aorta de ratos A) controle

(Ct) vs. diabéticos (Db); B) controle tratados com atorvastatina (Ct+At) vs. controle; e C) diabético tratado com atorvastatina (Db+At) vs. diabético.

**Tabela 4 – Valores de pD2 e Emax obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE, 0,1 nM–0,3 mM) em anéis de aorta de ratos de todos os grupos.**

Ct		Ct+At		Db		Db+At	
Emax	pD2	Emax	pD2	Emax	pD2	Emax	pD2
86±5	6,3±0,2	90±6	6±0,2	132±8*	6,3±0,1	112±6#	6,6±0,1

Valores expressos como média ± EPM.

\*p<0.05 vs. Ct; #p<0.05 vs. Db; por teste t *Student*.

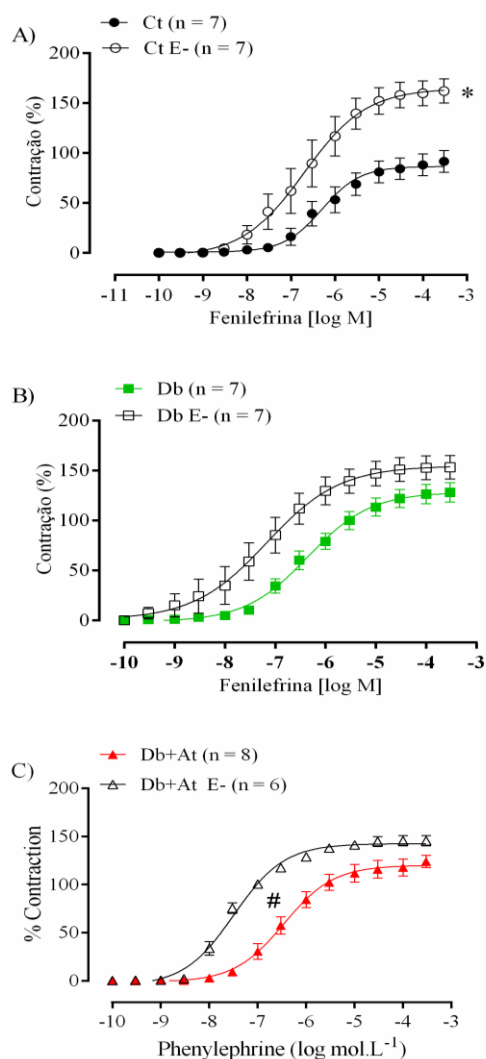
#### **4.1.4 Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora da fenilefrina**

Para investigar se a DM modifica a influência do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina e se o tratamento com atorvastatina causa alguma alteração seja ela positiva ou não, esta camada foi removida mecanicamente, participando deste protocolo somente os anéis de aorta que apresentaram relaxamento de menos de 10 % do teste de integridade endotelial.

Esta remoção endotelial (E-) provocou um aumento da resposta contrátil nos anéis dos animais controle, quando comparada à situação com endotélio, porém não houve diferenças estatísticas na sensibilidade tampouco na resposta máxima à vasoconstrição induzida pela fenilefrina nos anéis do grupo diabético (Figuras 8A e B).

Quando observamos os anéis do grupo diabético tratado com atorvastatina, houve uma melhora da modulação endotelial reduzida nos ratos diabéticos, como foi observado através de um aumento da sensibilidade (pD2) (Figura 8C).

Estes resultados nos levam a sugerir que há uma modulação endotelial reduzida nos animais com DM, e que o tratamento com atorvastatina melhora esta modulação nos ratos diabéticos, como pode ser visto na pD<sub>2</sub> e os valores de E<sub>max</sub> (Tabela 5).



**Figura 8 - O efeito da remoção endotelial na diabetes é diminuído pelo tratamento com atorvastatina.** O efeito da remoção do endotélio (E-) quando comparado ao seu respectivo endotélio intacto (Ct, Db, Db+At), nas curvas de concentração-resposta à felinefrina em anéis de aorta de ratos controle (A), ratos diabéticos (B) e ratos diabéticos tratados com atorvastatina (C). \*p < 0.05 vs. Ct; #p < 0.05 vs. Db; por teste t *Student*.

**Tabela 5 - Valores de pD<sub>2</sub> e R<sub>max</sub> obtidos nas curvas concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) na presença (E+) e ausência de endotélio (E-) em anéis de aorta de ratos de todos os grupos.**

	Ct		Db		Db+At	
	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>
<b>Curva controle</b>	98±10	6,3±0,2	128±10	6,3±0,1	124±6	6,5±0,1
<b>Curva E<sup>-</sup></b>	162±12*	6,7±0,3	153±12	7,6±0,6	145±5	7,5±0,1#

Valores expressados como média ± EPM.

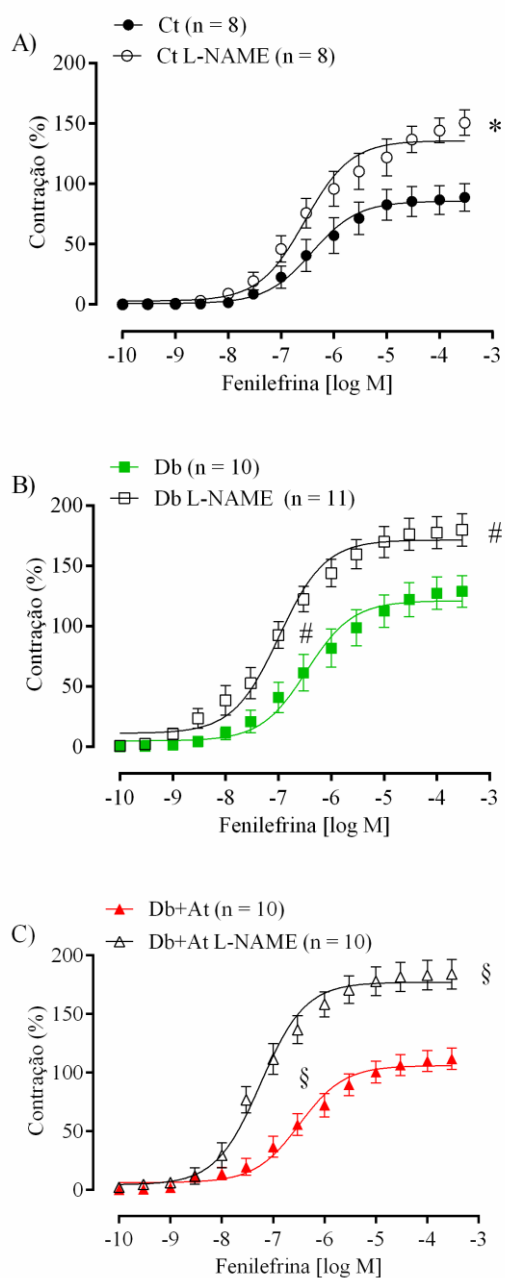
\*p<0.05 vs. Curva controle (Ct); #p<0.05 vs. Curva controle (Db+At); teste t *Student*.

#### **4.1.5 Efeito do bloqueio com L-NAME sobre as respostas vasoconstritoras à fenilefrina**

A disfunção endotelial é frequentemente associada a uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico. Sabendo disso, foi utilizado o inibidor não seletivo da síntese de NO, L-NAME, com o intuito de investigar o papel deste na disfunção endotelial causada pela DM, e o efeito que o tratamento com atorvastatina causa nestes ratos. A curva de concentração-resposta à fenilefrina foi deslocada para a esquerda em todos os grupos, caracterizada por um aumento da resposta máxima. Entretanto, nos animais diabéticos, tratados ou não, observou-se também um aumento da sensibilidade (pD<sub>2</sub>) nos anéis de aorta (Figuras 9 A e B).

O destaque se dá para o tratamento com atorvastatina, que foi suficiente para aumentar a biodisponibilidade do NO nos ratos diabéticos (Figura 9 C), o qual pode ser visto pela variação ( $\Delta$ ) da resposta máxima de cada grupo calculada através das respectivas curvas com L-NAME em comparação com ratos controle ( $\Delta$  E<sub>max</sub> Ct: 62 ± 11;  $\Delta$  E<sub>max</sub> Db: 51 ± 13;  $\Delta$  E<sub>max</sub> Db+At: 72 ± 10\*, \*P < 0,05 vs. Db; ANOVA uma via, seguido de pos-teste de Tukey).





**Figura 9. Atorvastatina aumenta a influencia do NO na reatividade vascular.** Efeito do L-NAME (100  $\mu$ M) na curva de concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos controle (A), ratos diabéticos (B) e ratos diabéticos tratados com atorvastatina (C). \* $p < 0.05$  vs. Ct; # $p < 0.05$  vs. Db; § $p < 0.05$  vs. Db+At; por teste t Student.

**Tabela 6 – Valores de pD<sub>2</sub> e R<sub>max</sub> obtidos nas curvas concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM - 0,3 mM) sob o efeito do L-NAME (100 µM) em anéis de aorta de todos os grupos de ratos.**

	Ct		Db		Db+At	
	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>
<b>Curva controle</b>	89±11	6,2 ± 0,2	129±13	6,3±0,2	112±9	6,4±0,2
<b>Curva L-NAME</b>	151±11*	6,4 ± 0,3	180±13#	7,1±0,1#	184±12§	7,3±0,1§

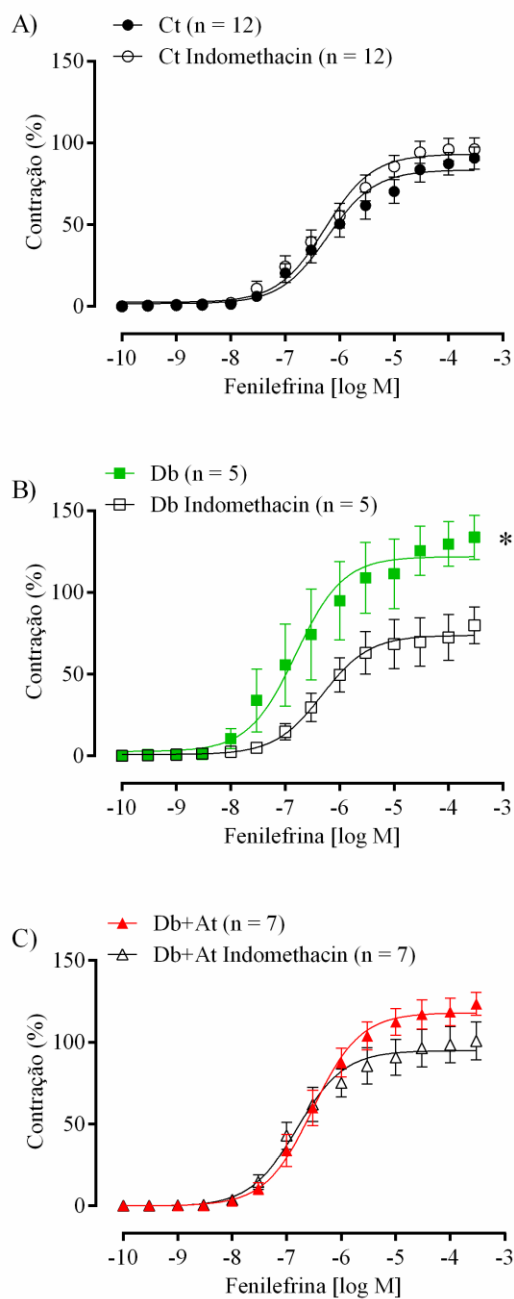
Valores expressos como média ± EPM.

\*p<0.05 vs. Ct; #p<0.05 vs. Db; §p<0.05 vs. Db+At; teste t *Student*.

#### **4.1.6 Efeito do bloqueio com indometacina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Para investigar o papel de prostanóides no mecanismo pelo qual o tratamento com atorvastatina afeta o aumento da resposta da fenilefrina encontrado em ratos diabéticos, incubamos anéis de aorta com o inibidor da via do ácido araquidônico-COX, indometacina. Foi observado que a reatividade vascular à fenilefrina foi reduzida no grupo diabético em comparação com o grupo controle (Figuras 12A e B). Este resultado sugere que pode haver envolvimento de prostanóides vasoconstritores na hiper-reatividade vascular à fenilefrina em ratos diabéticos. Como demonstrado na figura 12A, a presença de indometacina não modificou a resposta à fenilefrina no grupo controle, mas foi suficiente para reduzir a reatividade vascular à fenilefrina no grupo diabético (Figura 12B). Ao analisar o efeito nos animais tratados com atorvastatina, observamos um efeito preventivo, o que sugere que a atorvastatina pode reduzir o envolvimento de prostanóides vasoconstritores em aorta dos animais diabéticos (Figura 12C). Estes resultados

podem ser evidenciado pelos dados de sensibilidade pD<sub>2</sub> e E<sub>max</sub> mostrados na tabela 7.



**Figura 10 - Atorvastatina diminui a participação da via da COX.** Efeito da indometacina (10  $\mu$ M) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos, A) controle (Ct); B) diabético (Db); e C) diabético tratado com atorvastatina. \* $p < 0.05$  vs. Db; por teste t *Student*.

**Tabela 7 – Valores de pD<sub>2</sub> e R<sub>max</sub> obtidos nas curvas concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) em anéis de aorta de ratos incubados com indometacina (10 µM) em todos os grupos.**

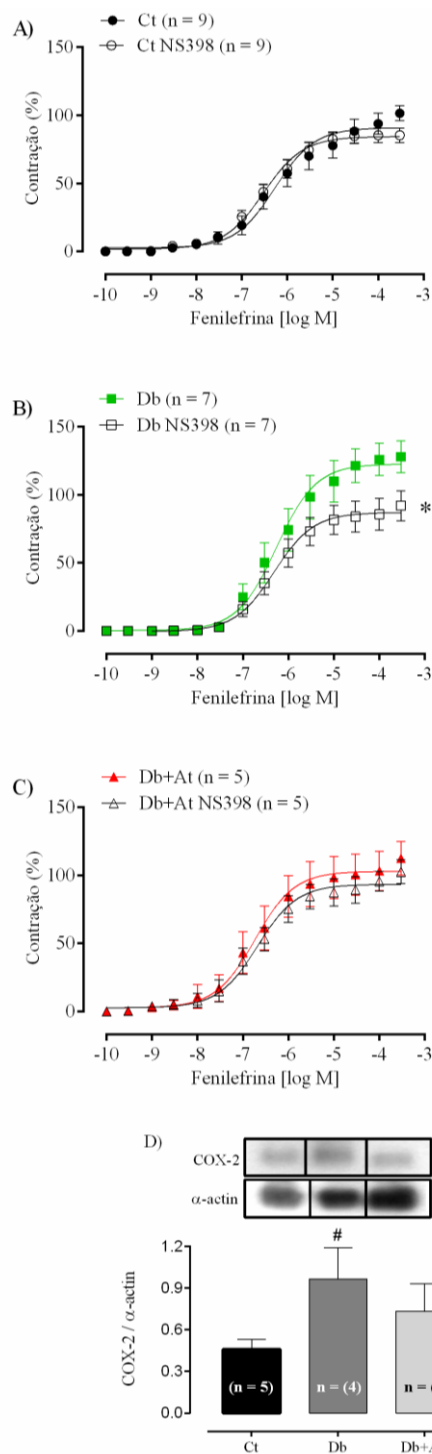
	Ct		Db		Db+At	
	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>
<b>Curva controle</b>	91±7	6±0,2	134±13	6,5±0,4	123±7	6,5±0,1
<b>Indometacina</b>	92±7	6,2±0,2	80±11*	6,2±0,1	101±11	6,8±0,1

Valores expressos como média ± EPM.

\*p<0.05 vs. Db; por teste t *Student*.

#### **4.1.7 Efeito do bloqueio com NS398 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Demonstrada a participação de prostanóides nos fatores envolvidos na disfunção endotelial presente nos animais diabéticos, houve a necessidade de esclarecer qual seria a isoforma da COX envolvida. A partir de então, anéis de aorta foram incubados com um inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1 M). Os resultados na reatividade vascular mostram que não houve alteração no grupo controle (Figura 11A), entretanto a resposta máxima à fenilefrina foi reduzida em segmentos de aorta de ratos diabéticos (Figura 11B). Quando em presença do tratamento com atorvastatina, o efeito visualizado nos ratos diabéticos foi impedido (Figura 11C), o que sugere que a redução de prostanóides vasoconstritores é mediada pela COX-2 (E<sub>max</sub>: Ct: 101 ± 5 vs Ct (NS398): 85 ± 5; Db: 127 ± 11 vs Db (NS398): 91 ± 11 \* e Db+At: 112 ± 12 vs Db+At (NS398): 102 ± 8, \*p <0,05 vs Db, pelo teste t *Student*) (Figuras 11A, B e C). Ao avaliar a expressão protéica da COX-2 houve um aumento no grupo diabético, o que não foi modificado após tratamento com atorvastatina (Figura 11D).

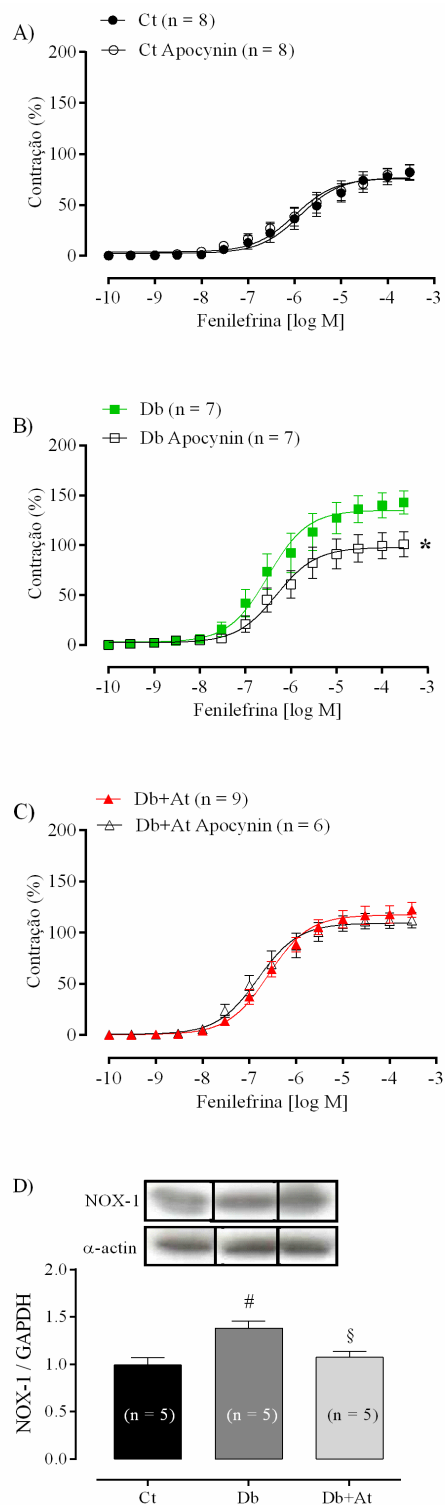


**Figura 11. Atorvastatina reduz a produção de prostanoídes vasoconstritores via ciclooxigenase (COX-2).** Efeito do NS398 (1  $\mu$ M) na curva de concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos A) controle (Ct); B) diabético (Db); e C) diabético tratado com atorvastatina. \* $p < 0.05$  vs. Db; via teste t *Student*. D) Expressão protéica COX-2. # $p < 0.05$  vs. Ct; via ANOVA uma via seguido de pós teste de Tukey.

#### 4.1.8 Efeito do bloqueio com apocinina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para investigar os mecanismos responsáveis pelo já mencionado aumento da resposta contrátil à fenilefrina em ratos diabéticos quando comparada à resposta dos ratos controle, foram desenvolvidas curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta na ausência (curva controle) ou na presença de um antioxidante incubado previamente por 30 minutos, a apocinina (30  $\mu$ M) um inibidor da NADPH oxidase.

Muito se discute a respeito da ação da atorvastatina sobre a NADPH oxidase, como demonstrado em estudos anteriores (SAN MARTIN *et al.*, 2007) Por isso utilizamos este antioxidante geral, para determinar o envolvimento do ânion superóxido nas respostas vasoconstritoras dos ratos diabéticos. Os ratos controle não apresentaram participação de EROs na resposta contrátil à fenilefrina, pois a apocinina não produziu deslocamento da curva concentração-resposta em relação à curva controle, Já as aortas de ratos diabéticos demonstraram aumento da produção de EROs na resposta contrátil à fenilefrina, verificada diante do deslocamento da curva para a direita e este efeito foi abolido nos ratos tratados com atorvastatina (Emax: Ct:  $82 \pm 8$  vs Ct (APO):  $82 \pm 7$ ; Db:  $143 \pm 11$  vs Db (APO):  $101 \pm 12$  \* e Db+At:  $122 \pm 7$  vs Db+At (APO):  $112 \pm 7,4$ ; \*  $p < 0,05$  vs. Db, teste t *Student*) (Figuras 12A, B e C). Para confirmar esta resposta funcional, avaliamos a expressão proteica da subunidade NOX1 da NADPH oxidase (Figura 12D), e nas amostras dos ratos tratados com atorvastatina, foi constatado uma redução da expressão proteica da NOX1, o que sugere que houve uma redução do ânion superóxido derivado da NADPH oxidase, em ratos diabéticos tratados com atorvastatina.

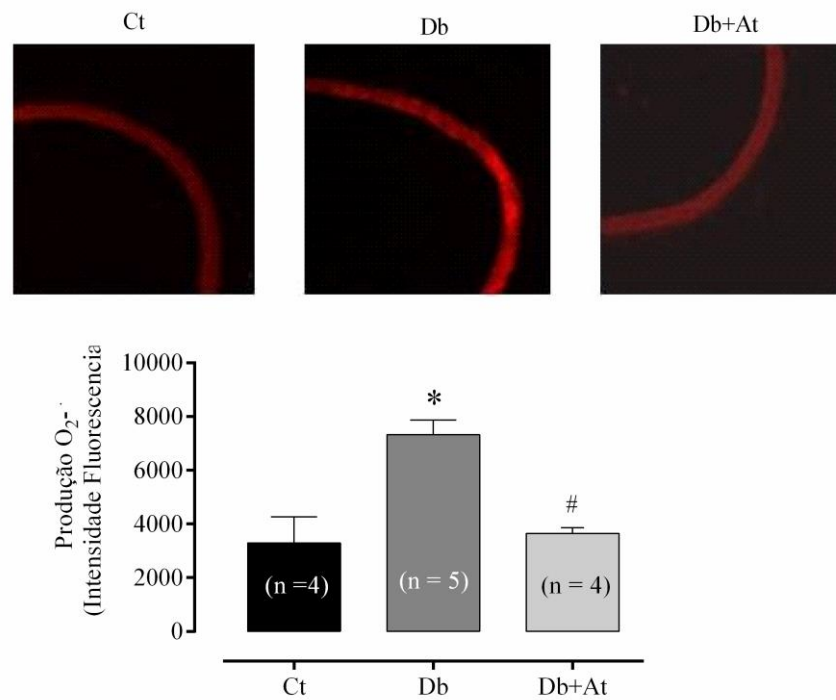


**Figura 12. Atorvastatina diminui a contribuição de ânion superóxido via NADPH oxidase para resposta vasoconstritora.** Efeito da apocinina (30  $\mu$ M) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos A) controle (Ct); B) diabético (Db); e C) diabéticos tratados com atorvastatina. \* $p < 0.05$  vs. Db; por teste t *Student*. D) Expressão protéica de NOX1. # $p < 0.05$  vs. Ct; § $p < 0.05$  vs. Db. Teste ANOVA, uma via, e post teste de Tukey.

#### **4.1.9 Efeitos do tratamento com atorvastatina em ratos diabéticos e não diabéticos sobre a produção vascular de ânion superóxido**

Para verificar a influência do tratamento com atorvastatina por quatro semanas sobre a produção vascular de ânion superóxido foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE. Através dessa técnica, foi possível constatar que o aumento de ânion superóxido observado em anéis de ratos diabéticos foi reduzido pelo tratamento com atorvastatina, corroborando com os resultados funcionais encontrados, que mostrou a produção de ânion superóxido significativamente maior nos anéis de aorta dos animais diabéticos quando comparado aos animais controle e a reversão deste quadro quando tratado com atorvastatina (Figura 13).





**Figura 13. Produção de ânions superóxido *in situ* é diminuída pela atorvastatina.** Efeito da atorvastatina na produção do ânion superóxido em anéis de aorta de ratos controle (Ct), diabético (Db) e diabético tratado com atorvastatina (Db+At). \* $p < 0.05$  vs. Ct; # $p < 0.05$  vs. Db, usando ANOVA uma via, seguido de pós teste de Tukey.

#### 4.2 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que o tratamento por quatro semanas com 80 mg / kg / dia de atorvastatina:

- não alterou o peso corporal, tampouco a glicemia de ratos diabéticos ou controles;
- foi capaz de reduzir a hiper-reatividade vascular à fenilefrina; restaurar a modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora, provavelmente através da maior liberação de NO;
- reduziu a produção de prostanóides vasoconstritores por COX-2 que se encontra exacerbada em aortas de ratos diabéticos;
- reduziu a produção de ânion superóxido derivado da NADPH oxidase em ratos diabéticos, reduzindo também a expressão protéica da subunidade NOX1 da NADPH oxidase.

## **5 DISCUSSÃO**

Os maiores achados em nosso estudo sugerem que o tratamento com altas doses de atorvastatina melhora a função vascular de ratos diabéticos, e isso pode estar relacionado tanto com a redução do ânion superóxido derivado da NADPH oxidase como dos prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2. Ademais, o tratamento com atorvastatina não promoveu alteração significativas nos elevados níveis de glicemia encontrados no grupo diabético. Portanto, os benefícios vasculares provocados pelo tratamento com atorvastatina, podem ocorrer mesmo em condições hiperglicêmicas.

As estatinas têm muitos efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, principalmente por melhorar a função endotelial (TAN *et al.*, 2002; Crespo & QUIDGLEY, 2015). Isso ocorre por vários mecanismos, incluindo a *upregulation* da expressão da eNOS e produção NO, a redução do estresse oxidativo e ações anti-inflamatórias (ENDRES *et al.*, 1998; WASSMANN *et al.*, 2001; WASSMANN *et al.*, 2012; LAUFS *et al.*, 1998; LEFER 2002). Portanto, uma vez que um indivíduo diabético adquire uma lesão vascular, a hipótese é de que uma dose elevada de atorvastatina (80 mg / kg) pode melhorar a função vascular.

## 5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA SOBRE OS PARÂMETROS DE PESO E GLICÊMICOS NOS RATOS DIABÉTICOS

Para estudar a DM, utilizamos o modelo experimental com ratos Wistar, no qual, através de uma dose única de estreptozotocina, foi elevada a glicemia do rato acima de 250 mg/ml. Assim, considerado de forma bem estabelecida na literatura, um quadro de diabetes (XAVIER *et al.*, 2003). A partir da patologia confirmada, foi feito um tratamento crônico com atorvastatina por quatro semanas, e, posteriormente, avaliadas as alterações vasculares possíveis presentes.

Ao ser analisado o peso corporal, não foi possível encontrar diferença entre os animais diabéticos e os diabéticos tratados com atorvastatina, porém, quando comparados aos grupos controle, alterações significativas foram destacadas, sendo os ratos diabéticos de menor peso que os ratos controle o que está de acordo com o relato de outros autores que descrevem como característica da diabetes do tipo I não ter ganho ponderal (CONTRERAS & KING, 1989; ZHANG *et al.*, 1994).

Quanto à glicemia, alguns estudos relatam que o uso das estatinas pode aumentar a glicemia dos pacientes saudáveis, questionando até mesmo a possibilidade de o tratamento com estatinas induzir à síndrome metabólica e em alguns casos até mesmo à diabetes, como por exemplo, os resultados da meta-análise realizada (Sattar *et al.*, 2014) que mostraram que pessoas que receberam estatinas apresentaram um risco ligeiramente aumentado de diabetes em comparação com aqueles tratados com placebo ou tratamento padrão, este risco pareceu mais elevado nos pacientes de idade mais avançada.

Em outro estudo, que avaliou os efeitos de várias estatinas sobre a via dos transportadores de glicose, somente a atorvastatina, dentre todas as demais estatinas estudadas, pareceu ter um efeito prejudicial sobre o metabolismo da glicose através da diminuição da maturação de adipócitos por inibição da biossíntese de isoprenóides, podendo afetar potencialmente o controle da diabetes tipo 2 (NAKATA *et al.*; 2006).

Entretanto, em nosso estudo o tratamento com atorvastatina não afetou a hiperglicemia predominante e não controlada, tampouco a curva glicêmica nem a resistência à insulina em ratos diabéticos. Sabendo que a hiperglicemia é o principal fator de risco para o desenvolvimento de disfunção endotelial em pacientes com DM, o fato do tratamento não afetar estes valores é o primeiro resultado positivo.

A hiperglicemia aguda ou crônica pode causar várias alterações na função vascular, incluindo uma diminuição de relaxamento derivado do endotélio (PIEPER & GROSS 1988, PIEPER, 1999; GUPTA *et al.*, 2010), ou um aumento da resposta contrátil do músculo liso vascular (DAVEL *et al.*, 2000; KONIOR *et al.*, 2014; ABEBE, HARRIS *et al.*, 1900) e uma predisposição para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, ateroscleróticas e trombóticas (COHEN & TONG, 2010).

Alterações decorrentes da disfunção endotelial nos processos hiperglicemiantes são multifatoriais e diretamente relacionados ao tempo de exposição (XAVIER *et al.*, 2003). Por isso a necessidade e a busca de medicamentos que previnam a aterosclerose, uma das principais doenças cardiovasculares que atingem pacientes diabéticos.

Mesmo assim, existe ainda nos dias de hoje, muita controvérsia a respeito dos efeitos benéficos das estatinas sobre a função vascular. Uma linha de pesquisadores acredita que o tratamento com as estatinas não traz benefícios vasculares, como visto em um estudo feito com pacientes diabéticos tipo 2 com níveis normais de colesterol, que mostrou que a função endotelial não foi restaurada após um mês de tratamento com 20mg de atorvastatina (TANTIKOSOOM *et al.*, 2005). Já em outro estudo, mostrou-se uma piora na função endotelial de pacientes com diabetes tipo 2 que não foi restaurada após um período de tratamento de seis semanas com 40 mg de sinvastatina (VAN DE REE *et al.*, 2001), ou como no estudo reportado por Ling e colaboradores (2005) que verificaram que o tratamento feito com 40mg de pravastatina por oito semanas, foi ineficaz na melhoria do relaxamento endotelial em pacientes com doença coronária.

Em contrapartida, existe outra vertente científica que acredita que as estatinas apresentam muitos efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, principalmente por melhorar a função endotelial. Um estudo mostrou que pacientes diabéticos tratados com atorvastatina (10 mg e 20 mg) não só reduziram os níveis de colesterol plasmático, como a vasodilatação dependente do endotélio melhorou no grupo da atorvastatina comparado com o grupo de placebo (TAN *et al.*, 2002). Outro estudo, também mostrou benefícios cardiovasculares quando comparou o tratamento com 10mg de três das principais estatinas (atorvastatina, sinvastatina e pravastatina) onde se mostraram igualmente eficazes na melhoria da função endotelial, na redução do tônus vascular e no remodelamento, independente dos níveis de colesterol plasmático, em ratos diabéticos (Crespo & QUIDGLEY 2015).

## 5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA NA REATIVIDADE VASCULAR EM RATOS DIABÉTICOS

No presente estudo observamos que aortas de ratos diabéticos apresentaram aumento da resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina, quando comparadas aos animais controles, corroborando com os dados de Xavier e colaboradores (2003) que apresentam um aumento de reatividade em ratos diabéticos após quatro semanas de diabetes estabelecida.

Vários fatores podem levar a essa disfunção endotelial encontrada nos ratos diabéticos. Os possíveis mecanismos relacionados são: aumento da inativação do NO por espécies reativas de oxigênio (PIEPER & SIEBENEICH, 1997; XAVIER *et al.*, 2003), redução da NO-sintase endotelial por falta de cofator como a BH4 (PIEPER & SIEBENEICH, 1997), diminuição dos substratos L-arginina ou sua utilização incorreta para a síntese do óxido nítrico (PIEPER & SIEBENEICH, 1997), aumento da PKC pelas células endoteliais (PELLIGRINO *et al.*, 1994), aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (PIEPER & SIEBENEICH, 2000), dentre outros.

Ademais, no tratamento com atorvastatina, observamos em nosso trabalho que o grupo diabético apresentou uma diminuição da resposta à fenilefrina quando comparada com o grupo diabético não tratado com atorvastatina. Esses resultados corroboram com os de Takemoto & Liao (2001) que destacam os efeitos das estatinas sobre o sistema cardiovascular por uma melhora do relaxamento dependente do endotélio por mecanismos envolvidos no *up-regulation* da expressão da NO sintase, a redução e progressão da aterosclerose e efeito anti-hipertensivo.



Por isso, as estatinas são a classe de medicação mais utilizada nos países desenvolvidos, principalmente após a recomendação dada pela *American Diabetes Association* (ADA) sobre a prescrição para todos os pacientes diabéticos (Alexandria, 2014). Além de comprometerem a síntese do colesterol através da inibição da síntese de mevalonato, limitando a biossíntese do colesterol, seus efeitos pleiotrópicos a nível cardiovascular são amplamente aceitos. Nomeadamente se fazem através do aumento da biodisponibilidade do NO derivado da NOS, reduzindo a morbidade e mortalidade relacionada a alterações cardiovasculares em pacientes com ou sem doença arterial coronariana (BOUITBIR *et al.*, 2012).

Diante da confirmação, decidimos investigar o papel do endotélio na redução da resposta à fenilefrina induzida pela atorvastatina nos ratos diabéticos. Para isso, as experiências foram realizadas na presença e ausência de endotélio. A remoção do endotélio levou a um aumento da contração induzida pela fenilefrina em ratos controle, mas não foi encontrada diferença nos ratos diabéticos, o que sugere que a capacidade do endotélio para modular a resposta contrátil induzida pela fenilefrina pode estar prejudicada nos anéis aórticos isolados de ratos diabéticos. Esses resultados estão em concordância com os de outros pesquisadores que relatam que a diabetes está associada à disfunção endotelial com o aumento da resposta vasoconstritora (FOLKOW, 1982; BOHR & WEBB, 1984; LÜSCHER & VANHOUTTE, 1986; INTEGAN & SCHIFFRIN, 2000; MULVANY, 2002; XAVIER *et al.*, 2003).

No entanto, os nossos resultados sugerem que o tratamento com atorvastatina pode melhorar a modulação endotelial da resposta contrátil à fenilefrina nos ratos diabéticos. Após a remoção mecânica do endotélio nos animais diabéticos tratados com atorvastatina, foi verificado um aumento da sensibilidade, sugerindo que o tratamento melhorou a participação endotelial em ratos diabéticos, seja por um aumento de vasodilatador ou redução de vasoconstrição.

O NO, que é formado a partir do metabolismo da L-arginina sob a ação da enzima NOS, é um dos mais importantes fatores relaxantes derivados do endotélio, contribuindo com a regulação do tônus vascular (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989). Portanto quando produzido, o NO é liberado pelo endotélio e se propaga para as células do músculo liso vascular, levando à diminuição de  $Ca^{2+}$  intracelular e consequente vasodilatação (MONCADA & HIGGS, 2006). Porém, em determinados momentos, a NOS pode sofrer uma diminuição da capacidade de formar NO, pois quando em altas concentrações de ânion superóxido o mesmo reage com o NO, reduzindo assim sua biodisponibilidade (Xia *et al.*, 1998). Além disso, o desacoplamento da eNOS leva ao aumento do estresse oxidativo e o processo de produção de superóxido, corroborando para a diminuição da biodisponibilidade de NO no diabetes (SENA *et al.*, 2014).

Sabemos que a atorvastatina, é um agente redutor de lipídios, entretanto tem se destacado em um papel importante na angiogênese coronariana. De acordo com o estudo realizado para avaliar os efeitos da atorvastatina sobre a capacidade de resposta angiogênica de células endoteliais coronárias tanto de ratos normais como de diabéticos, mostrou que tratamento com atorvastatina em baixas doses causou um aumento significativo sobre a resposta angiogênica induzida

principalmente pela libertação de NO quando comparado ao grupo não tratado, concluindo que o tratamento com baixa dose de atorvastatina melhora a resposta angiogênica através da ativação da eNOS, aumentando o fluxo de NO (CHAUDAGAR & MEHTA, 2014).

Em nosso estudo observamos, que a modulação endotelial nos ratos diabéticos está prejudicada quando comparados aos ratos controle, podendo ser devido à redução da participação do NO naqueles animais. Nossos resultados sugerem que a atorvastatina melhora a liberação de NO nos ratos diabéticos, isso pode ser observado quando incubados com o L-NAME (100  $\mu$ M), onde temos a redução do Rmax mediado pela atorvastatina em anéis de aorta de ratos diabéticos.

Estudo comandado por Mason e colaboradores (2015) verificou em ratos diabéticos e hipertensos por cinco semanas um alto desacoplamento da eNOS, estresse oxidativo e disfunção endotelial; neste mesmo estudo, o tratamento com atorvastatina restaurou parcialmente a função endotelial, aumentando os níveis de NO, e reduzindo peróxido de hidrogênio, efeito este causado por moduladores de eNOS ou da NADPH oxidase. Desta forma foi possível confirmar uma melhora da função endotelial e proteção vascular por atorvastatina em diabetes e hipertensão (MASON *et al.*, 2015). Nossos resultados corroboram parcialmente com o estudo acima citado, uma vez que encontramos melhora na função endotelial associado ao aumento da liberação de NO e redução do estresse oxidativo no tratamento com atorvastatina.

Já está muito bem descrita na literatura que a diabetes também é capaz de gerar um processo inflamatório vascular (SHI & VANHOUTTE, 2009; MASSARO *et*

*al.*, 2010). Deste modo, foi investigado se o tratamento com atorvastatina seria capaz de minimizar o processo inflamatório encontrado na diabetes.

Prostanóides derivados da COX-2 em níveis aumentados apresentam um relevante papel nas alterações vasculares presentes na diabetes (XAVIER *et al.*, 2003; MASSARO *et al.*, 2010; HADI & SUWAIDI, 2007), muitas vezes ligados a uma dinâmica de troca entre EROs e COX-2 na inflamação vascular característica deste processo patológico (MARTÍNEZ *et al.*, 2013). Isto pode explicar, pelo menos em parte, o aumento das respostas constritoras à fenilefrina vista em ratos diabéticos.

Assim, para avaliar a participação de prostanóides, utilizou-se indometacina, um inibidor não seletivo das ciclo-oxigenases, e NS398, um inibidor específico da COX-2. De fato, nossos resultados demonstram a resposta a fenilefrina reduzida após as incubações, confirmando o que estudos anteriores relataram (SHI Y & VANHOUTTE, 2008; GALLO *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2003), sugerindo que existe um aumento de prostanóides constritores provenientes da via da COX-2 e um aumento da expressão protéica de COX-2 nos anéis aórticos isolados de ratos diabéticos. No entanto, o tratamento com atorvastatina bloqueando a COX-2 sugere que possa haver o aumento de prostanóides constritores derivados da COX-2 na aorta de ratos diabéticos.

Embora não tenha alterado a expressão protéica da COX-2 em nossos ratos diabéticos, já foi demonstrado que a atorvastatina reduz a atividade da COX-2 em células do endotélio vascular de humanos (MASSARO *et al.*, 2010).

Vários relatos descrevem vias de sinalização e diferentes formas de estímulos que podem ser responsáveis pela liberação de COX-2 e EROs. Autores

descrevem uma relação recíproca entre ambos os mediadores (MARTINEZ-REVELLES *et al.*, 2013). Portanto, podemos caracterizar a própria atividade da COX-2 como uma fonte de ânion superóxido promovendo aumento de atividade da NADPH, que é uma das principais vias na diabetes, além de alguns prostanóides que podem aumentar a produção de ânion superóxido em artérias de animais diabéticos (WENZEL *et al.*, 2007).

A NADPH oxidase é a uma das principais fontes de ânion superóxido, levando ao estresse oxidativo no sistema cardiovascular (HARE & STAMLER, 2005). A família da NADPH oxidase inclui uma série de isoformas, com NOX1 sendo a principal isoforma. Ela está presente na cavéola sarcoplasmática das células endoteliais e é ativada primeiramente por tensão de cisalhamento, prostaglandina e angiotensina II (KLEIKERS *et al.*, 2012).

Seguindo o raciocínio, observamos em nosso estudo que ratos diabéticos apresentam importante participação de EROs sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, sugerindo a presença de estresse oxidativo vascular nestes animais. Quando incubamos com apocinina (30  $\mu$ M), observamos que a inibição de ânion superóxido, via NADPH oxidase, leva à redução da vasoconstrição exacerbada em ratos diabéticos, bem como à melhora da função vascular, prejudicada nestes animais.

Corroborando esses achados, observou-se um aumento de produção de ânion superóxido local e um aumento na expressão protéica da NOX1 nos ratos diabéticos. Vários relatórios demonstraram que o aumento do estresse oxidativo em

ratos diabéticos resulta de um aumento na atividade da NADPH oxidase vascular (SONTA *et al.*, 2004; BUBOLZ *et al.*, 2005; DAVEL *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, confirmamos que a diabetes foi capaz de aumentar a subunidade da enzima NADPH oxidase NOX1, expressa na aorta. Ademais, a atividade da NADPH oxidase, constatada pela quimioluminescência, foi efetivamente aumentada pela condição de diabetes instalada, promovendo aumento da produção de ânion superóxido. Esses dados nos levam a um entendimento que o aumento da expressão gênica da subunidade NOX1, como também o aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, resultaram, no aumento da produção do ânion superóxido em animais diabéticos. Como descrito por Drummond e colaboradores (2011), a NOX1 está envolvida na produção de ânion superóxido, corroborando com nossos achados bioquímicos, em que os animais diabéticos apresentam um aumento de ânion superóxido.

Ao mesmo tempo, as estatinas podem inibir a NADPH oxidase e reduzir a expressão da proteína NOX1 (WASSMANN *et al.*, 2002; KLENIEWSKA *et al.*, 2012) contribuindo para os efeitos vasoprotetores das estatinas. De fato, estudos anteriores demonstraram esta diminuição da produção de EROs pelas estatinas no DM experimental, principalmente ânion superóxido, e que esta está associada com a inibição da NADPH oxidase (WENZEL *et al.*, 2008; MASON *et al.*, 2015; BRUDER *et al.*, 2015).

Assim, de acordo com estudos anteriores, os nossos resultados mostram que o tratamento com atorvastatina pode diminuir os efeitos de ânion superóxido

derivado da NADPH oxidase e diminuir a expressão protéica de NOX1, que, por sua vez, pode reduzir a lesão vascular no DM (BRUDER *et al.*, 2015).

Outros estudos também discutem que as alterações encontradas na diabetes podem contribuir para a disfunção endotelial através do aumento do estresse oxidativo. Foi demonstrado que a sobrecarga de açúcar circulante pode estimular a produção de EROs, como ânion superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CHRIST *et al.*, 2002; MARITIM, SANDERS *et al.*, 2003; SHI & VANHOUTTE, 2009). As EROs geradas a partir da hiperglicemia são provenientes, em grande parte, da NADPH oxidase e da mitocôndria (WENZEL *et al.*, 2007). De acordo com esses dados, foi relatado que em ratos obesos e diabéticos, ou seja, portadores de vias inflamatórias ativas, é observado o nível das EROs levando à redução da produção e biodisponibilidade de NO (PEREZ *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo é responsável pelo início do processo inflamatório, e isso ocorre porque são eles os principais estimuladores da permeabilidade vascular, através do aumento de mediadores inflamatórios como prostaglandina (LEE *et al.*, 2004). Os estágios seguintes da inflamação, conhecidos pela adesão, migração e quimiotaxia das células inflamatórias na vasculatura, também são determinados pela produção de EROs.

O equilíbrio que deve existir entre a geração e a inativação das EROs se faz necessário para modulação da função vascular, seja pela ação direta causada pelo estresse oxidativo ou pela ativação das vias de sinalização intracelulares que são capazes de promover a proliferação celular, o remodelamento vascular, o

desenvolvimento de processo inflamatório e a alteração no tônus vascular (SZASK *et al.*, 2007; WESELER & BAST, 2010; ZINKEVICH & GUTTERMAN, 2011).

Conforme o que já foi relatado, um grande número de autores consideram que o aumento do estresse oxidativo é um dos mecanismos bem descrito para explicar a biodisponibilidade de NO reduzida e a disfunção endotelial associada, presentes no DM.

Entretanto, não podemos confirmar que a síntese e liberação de óxido nítrico não estão efetivamente modificadas, mas sua biodisponibilidade pode estar reduzida devido ao aumento da formação de ânion superóxido no DM (CHRIST *et al.*, 2002), sendo eles responsáveis pela inativação do óxido nítrico, e conseqüentemente a diminuição de sua ação vasodilatadora, e por fim a potencialização do efeito vasoconstritor (GRYGLEWSKI, PALMER & MONCADA, 1986).

Espécies reativas de oxigênio é como é chamado o grupo formado pelo ânion superóxido, o  $H_2O_2$  e o radical hidroxila (SHI & VANHOUTTE, 2009). Esses radicais livres são capazes de reagir com a grande maioria das moléculas biológicas, incluindo lipídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e com o óxido nítrico, com isso eles participam da regulação da sinalização, crescimento e proliferação celular. Por outro lado, o resultado do excesso de EROs, principalmente no sistema cardiovascular, são a injúria celular e a disfunção endotelial (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003), podendo ainda ser a causadora da inibição de outras fontes vasodilatadoras dependentes do endotélio, como a prostaglandina  $I_2$  e o EDHF, contribuindo para o aumento da resposta vasopressora e conseqüentemente para a hipertensão arterial, subsequente da diabetes (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006).



Não foram observadas quaisquer alterações na expressão protéica de COX-2 em ratos diabéticos tratados com atorvastatina. No entanto, Martínez-Revelles e colaboradores (2013) demonstraram que os produtos derivados da COX-2 podem modular a produção de EROs. Assim, pode-se especular que o tratamento com atorvastatina promove uma inibição da NADPH oxidase, que pode reduzir a geração de ânion superóxido, a qual pode, em seguida, reduzir o nível de prostanóides constritores derivados da COX-2 em ratos diabéticos.

Portanto, os nossos resultados mostram que o tratamento com dose elevada de atorvastatina, independentemente da hiperglicemia, melhora a função vascular nos anéis aórticos isolados de ratos diabéticos por provável redução de prostanóides constritores derivados de COX-2 e por reduzir o estress oxidativo através da NADPH oxidase, bem como um possível aumento de participação do NO.

## **6 CONCLUSÃO**

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a DM induz alterações vasculares após quatro semanas da doença estabelecida, na reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta torácica isolados de rato. Además, decorrente da indução do estresse oxidativo, a hiperglicemia leva à disfunção endotelial, presente na diabetes.

Nosso estudo também sugere que o tratamento com atorvastatina em alta dose é capaz de melhorar essa disfunção endotelial nos anéis aórticos isolados dos ratos diabéticos através da redução de prostanóides constritores derivados da COX-2 e por inibir a via da NADPH oxidase reduzindo o estresse oxidativo aumentando, dessa forma, a participação do NO.

## **7 REFERÊNCIAS**

ABEBE, W.; HARRIS, K. H.; MACLEOD, K.M. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. **J Cardiovasc Pharmacol.** n.16, p. 239-248, 1990.

ALI RAZA, J.; MOVAHED A. Current concepts of cardiovascular diseases in diabetes mellitus. **Int J Cardiol.** v. 89. n. (2-3). p. 123-134, 2003.

ALVAREZ, Y. *et al.* Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of Hypertension.** v. 23, n. 4, p. 767-777, 2005.

ANGELI, Jhuli Keli. **Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em aorta de ratos:** papel do estresse oxidativo, da angiotensina II e dos prostanóides da via da ciclooxygenase. 2013. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

ANGUS, J.A.; COCKS, T.M. Endothelium-derived relaxing factor. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 41, n. 1-2, p. 303-351, 1989.

ANTMAN, E.M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation.** v. 112, n. 5, p. 759-770, 2005.

AVOGARO, A.; DE KREUTZENBERG, S.V.; FADINI, G. Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.** Suppl 2:S94-S101, 2008.

BAGI, Z.; ERDEI, N.; PAPP Z.; EDES, I.; KOLLER, A. Up-regulation of vascular cyclooxygenase-2 in diabetes mellitus. **Pharmacol Rep,** v. 58(Suppl), p. 52-56, 2006.

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

BAIGENT, C.; KEECH, A.; KEARNEY, P.M.; BLACKWELL, L.; BUCK, G.; POLLICINO, C.; KIRBY, A.; SOURJINA, T.; PETO, R.; COLLINS, R.; SIMES, R. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. **Lancet**. v.8. n. 366(9493). p. 1267-1278, 2005.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**. v. 87, n. 1, p. 245-313; 2007.

BERTULOSO, B.D.; PODRATZ, P.L.; MERLO, E.; DE ARAÚJO, J.F.; LIMA, L.C.; DE MIGUEL, E.C.; DE SOUZA, L.N.; GAVA, A.L.; DE OLIVEIRA, M.; MIRANDA-ALVES, L.; CARNEIRO, M.T.; NOGUEIRA, C.R.; GRACELI, J.B. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicol Lett**. v. 235, n.1, p. 45-59, 2015.

BISHOP-BAILEY, D.; HLA, T.; MITCHELL, J.A. Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle. **Int J Mol Med**. v. 3, n.1, p. 41- 48. Review, 1999.

BLUM, A.; SIMSOLO, C.; HASIN, Y. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins), atherosclerosis and coronary syndromes. **Atherosclerosis**. v. 175. n. 1. p.1-5, Review, 2004.

BOHR, D. F.; WEBB, R.C. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. **The American Journal of Medicine**. v. 77, n. 4A, p. 3-16, 1984.

BOUITBIR, J.; CHARLES, A.L.; ECHANIZ-LAGUNA, A.; KINDO, M.; DAUSSIN, F.; AUWERX, J.; PIQUARD, F.; GENY, B.; ZOLL, J. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. **Eur Heart J**. v. 33, n.11, p. 1397-1407, 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v.7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**. v.232, n.4746, p.34-47, 1986.

BRUDER-NASCIMENTO, T.; CALLERA, G.E.; MONTEZANO, A.C.; HE, Y.; ANTUNES, T.T.; CAT, A.N.; TOSTES, R.C.; TOUYZ, R.M. Vascular injury in diabetic db/db mice is ameliorated by atorvastatin: role of Rac1/2-sensitive Nox-dependent pathways. **Clin Sci (Lond)**. n.128, p. 411- 423, 2015.

BUBOLZ, A.H.; LI, H.; WU, Q.; LIU, Y. Enhanced oxidative stress impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel function in small coronary arteries of diabetic rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, n. 289, p. H1873-1880, 2005.

CADE, W.T. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. **Phys Ther**. v. 88, n.11, p. 1322-1335, 2008.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ. Res.** n. 87, p. 840–844, 2000.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**. v. 68, n. 1, p. 26-36, 2005.

CALABRÒ, P.; YEH, E.T. The pleiotropic effects of statins. **Curr Opin Cardiol**. v. 20, n. 6, p. 541-546. Review, 2005.

COHEN, R.A.; TONG, X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 55, n. 4, p. 308-316. Review, 2010.

CONTRERAS, R.J.; KING, S. High fat/sucrose feeding attenuates the hypertension of spontaneously hypertensive rats. **Physiology & Behavior**. v. 46, n. 2, p. 285-291, 1989.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacol Ther**. v. 84, n. 3, p. 413-428. Review, 1999.

CRESPO, M.J.; QUIDGLEY, J. Simvastatin, atorvastatin, and pravastatin equally improve the hemodynamic status of diabetic rats. **World J Diabetes**. v. 6, n. 10, p.1168-1178, 2015.

CHAHWALA, V.; ARORA, R. Cardiovascular manifestations of insulin resistance. **Am J Ther**. v. 16, n. 5, p. 14-28. Review, 2009.

CHAUDAGAR, K.K.; MEHTA, A.A. Effect of atorvastatin on the angiogenic responsiveness of coronary endothelial cells in normal and streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. **Can J Physiol Pharmacol**. n. 92, p.338-349, 2014.

CHENG, D. Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. **Nutr Metab (Lond)**. v.18, n. 2, p. 29, 2005.

CHRIST, M.; BAUERSACHS, J.; LIEBETRAU, C.; HECK, M.; GÜNTHER, A.; WEHLING, M. Glucose increases endothelial-dependent superoxide formation in coronary arteries by NADPH oxidase activation: attenuation by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor atorvastatin. **Diabetes**. v. 51, n. 8, p. 2648-2652, 2002.

DAVEL, A.P.; ROSSONI, L.V.; VASSALLO, D.V. Effects of ouabain on the pressor response to phenylephrine and on the sodium pump activity in diabetic rats. **Eur J Pharmacol**. n. 406, p. 419-427, 2000.

DAVEL, A.P.; WENCESLAU, C.F.; AKAMINE, E.H.; XAVIER, F.E.; COUTO, G.K.; OLIVEIRA, H.T.; *et al*. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. **Braz J Med Biol Res**. n. 44. P. 920-932, 2011.

DAVIDGE, S.T.; PROSTAGLANDIN, H. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circulation Research**. v. 89, n. 8, p. 650-660, 2001

DAVIGNON, J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. **Circulation**. n. 109, p. 39-43, 2004.

DE BATISTA PR.; PALACIOS R.; MARTÍN A.; HERNANZ R.; MÉDICI CT.; SILVA MA.; ROSSI EM,]; AGUADO A.; VASSALLO DV.; SALAICES M.; ALONSO MJ. Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and



vascular dysfunction through reactive oxygen species production. **PLoS One**. v. 5, n. 9 (8):e104020, 2014.

DE BATISTA, Priscila Rossi. **Aumento da expressão do receptor tipo toll 4 pela angiotensina ii contribui para a hipertensão arterial e disfunção vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio**. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

DE OLIVEIRA, L.P.; VIEIRA, C.P.; DA RÉ GUERRA, F.; DE ALMEIDA, M.D.O.S.; PIMENTEL, E.R. Statins induce biochemical changes in the Achilles tendon after chronic treatment. **Toxicology**. v. 311, n.3, p. 162-168, 2013.

DIAS, Fernanda Moura Vargas. **Participação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase e dos canais para K<sup>+</sup> nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca**. 2011. 193f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

DRUMMOND, G.R.; SOBEY, C.G. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? **Trends Endocrinol Metab**. V. 25, n. 9, p. 452-463. Review, 2014.

DRUMMOND, G.R. *et al.* Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 10, n. 6, p. 453-471, 2011.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci** .v. 86, n.5, .p. 484-493, 2010.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J Lipid Res**, v.33, n.11, p.1569-1582, 1992.

ENDRES, M.; LAUFS, U.; HUANG, Z.; NAKAMURA, T.; HUANG, P.; MOSKOWITZ, M.A.; *et al.* Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci**. n. 95, p. 8880-8885, 1998.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Curr Hypertens Rep.** v. 12, n. 4, . 267-275. Review., 2010

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 e COX-2 products. **British Journal of Pharmacology.** v. 164, n. 3, p. 894-912, 2011.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. **The American Journal of Physiology.** v. 291, n. 3, p. H985-H1002, 2006.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews.** v. 62, n. 2, p. 347-504, 1982.

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

FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. **Circulation Research.** v. 53, n. 5, p. 557-572, 1983.

FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: VANHOUTTE, P.M. **Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium.** New York: Raven Press. p. 401-414, 1988.

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

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GALLO, L.C.; DAVEL, A.P.; XAVIER, F.E.; ROSSONI, L.V. Time-dependent increases in ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase activity in aortas from diabetic rats: The role of prostanoids and protein kinase C. **Life Sci.** n. 87, p. 302-308, 2010.

GARLAND, C.J.; MCPHERSON, G.A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. **Br J Pharmacol.** v. 105, n.2, p. 429-435, 1992.

GE, T.; *et al.* Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H<sub>2</sub> in the SHR aorta. **Circulation Research.** v. 76, n. 6, p. 1003-1010, 1995.

GIANNOTTI, G.; LANDMESSER, U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. **Herz.** v. 32, n. 7, p. 568-572. Review, 2007.

GONGORA, M.C.; *et al.* Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. **Hypertension.** v. 48, n. 3, p. 473-481, 2006.

GRIENGLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. **Circulation.** v. 108, n.17, p. 2034-2040. Review. 2003.

GRIENGLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research.** v. 86, n. 5, p. 494-501, 2000.

GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, J. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** v. 320, n. 6061, p. 454-456, 1986.

GUERCI, B.; KEARNEY-SCHWARTZ, A.; BÖHME, P.; ZANNAD, F.; DROUIN P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. **Diabetes Metab.** v. 27(4 Pt 1), p. 425-434. Review, 2001.

GUPTA, S.; LABINSKY, N.; GUPTA, R.; CSISZAR, A.; UNGVARI, Z.; EDWARDS, J.G. Role of NADPH oxidase in superoxide generation and endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki (GK) rats as a model of nonobese NIDDM. **PLoSOne.** v.5, n. 7, p. e11800, 2010.

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

HARE, J.M.; STAMLER, J.S. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. **J Clin Invest.** n. 115, p. 509-517, 2005.

HOFFMAN, K.B.; KRAUS, C.; DIMBIL, M.; GOLOMB, B.A. A survey of the FDA's AERS database regarding muscle and tendon adverse events linked to the statin drug class. **PLoS One.** v. 7, n.8, p. e42866, 2012.

HSUEH, W.A.; QUIÑONES, M.J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. **Am J Cardiol.** v. 18, n. 92(4A), p. 10J-17J. Review, 2003.

ICHIKI, T.; TAKEDA, K.; TODUNOU, T.; *et al.* Down regulation of angiotensin II type 1 receptors by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzima A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells. **Arterioscl Thromb Vasc Biol.** n. 21, p. 1896-1901, 2001.

INTEGAN, H.D.; SCHIFFRIN, E.L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension,** v. 36, n. 3, p. 312-318, 2000.

JAMES, K.; LIAO, U.L.; RICH LAUFS. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** n. 45, p. 89 -118, 2005.

KAMATA, K.; KOBAYASHI, T. Changes in superoxide dismutase mRNA expression by streptozotocin-induced diabetes. **Br J Pharmacol.** n. 119, p.583-589, 1996.

KLEIKERS, P.W.; WINGLER, K.; HERMANS, J.J.; DIEBOLD, I.; ALTENHOFER, S.; RADERMACHER, K.A.; *et al.* NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. **J Mol Med (Berl).** n. 90, p. 1391-1406, 2012.

KLENIEWSKA, P.; PIECHOTA, A.; SKIBSKA, B.; GORACA, A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz ).** n. 60, p. 277-294, 2012.

KOH, K.K.; OH, P.C.; QUON, M.J. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? **Cardiovascular Research**. v. 81, n. 4, p. 649-659, 2009.

KOLLURU, G.K.; SIAMWALA, J.H.; CHATTERJEE, S. eNOS phosphorylation in health and disease. **Biochimie**. v. 92, n. 9, p. 1186-1198, Review, 2010.

KONIOR, A.; SCHRAMM, A.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M.; GUZIK, T.J. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. **Antioxid Redox Signal**. p.2794-2814, 2014.

LAROSA, J.C. Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. **Am J Cardiol**. v.88, n. 3, p.291-293. Review, 2001.

LAUFS, U.; LA, F.V.; PLUTZKY, J.; LIAO, J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. **Circulation**. n. 97. P. 1129-1135, 1998.

LEE, C.H.; WEI, Y.H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. **Experimental Biology and Medicine**. v. 232, n. 5, p. 592-606, 2007.

LEE, E.Y. *et al.* Angiotensin II receptor blocker attenuates overexpression of vascular endothelial growth factor in diabetic podocytes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 36, n. 1, p. 65-70, 2004.

LEFER, D.J. Statins as potent antiinflammatory drugs. **Circulation**. n.106, p. 2041-2042, 2002.

LEMOS NB.; ANGELI JK.; FARIA TO.; RIBEIRO JUNIOR RF.; VASSALLO DV.; PADILHA AS.; *et al.* Low Mercury Concentration Produces Vasoconstriction, Decreases Nitric Oxide Bioavailability and Increases Oxidative Stress in Rat Conductance Artery. **PLoS ONE**. v. 7, n. 11, p. e49005, 2012.

LEWIS, G.F.; RADER, D.J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circ Res**. v. 96, n.12, p.1221-1232. Review, 2005.

LIAO, J. K. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. **Int J Cardiol**, v.86, n.1, p.5-18, 2002.

LING, M.C.; RUDDY, T.D.; DEKEMP, R.A.; UKKONEN, H.; DUCHESNE, L.; HIGGINSON, L.; WILLIAMS, K.A.; MCPHERSON, R.; BEANLANDS, R. Early effects of statin therapy on endothelial function and microvascular reactivity in patients with coronary artery disease. **Am Heart J**. v.149, n. 6, p.1137, 2005.

LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. v. 8, n. 4, p. 344-348, 1986.

MANGRAVITE, L.M.; THORN, C.F.; KRAUSS, R.M. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. **Pharmacogenomics J**. v. 6, n. 6, p. 360-374, 2006.

MARCHAND, K.C.; ARANY, E.J.; HILL, D.J. Effect of atorvastatin on the regeneration of pancreatic b-cells after streptozotocin treatment in the neonatal rodent. **Physiol Endocrinol Metab**. n. 299, p. E92-E100, 2010.

MARCHESE S.; LUPATTELLI G.; SIEPI D. Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. **J Cardiovasc Pharmacol**. n. 36, p. 617-621, 2000.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M.A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. **J Auton Pharmacol**. v.15, n.4, p.279-307. Review, 1995.

MARÍN, J.; SÁNCHEZ-FERRER, C.F. Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. **Gen Pharmacol**. v. 21, n. 5, p.575-587. Review, 1990.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M.A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 75, n. 2, p. 111-134, 1997.

MARÍN, J.; SÁNCHEZ-FERRER, C. F.; SALAICES, M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. **British Journal of Pharmacology**. v. 93, n. 1, p. 43-52, 1988.

MARITIM AC.; SANDERS RA.; WATKINS III JB. Diabetes, Oxidative stress, and Antioxidants: A Review. **J Biochem Mol Toxicol**. v.17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MARTINEZ-REVELLES S.; AVENDANO MS.; GARCIA-REDONDO AB;; ALVAREZ Y.; AGUADO A.; PEREZ-GIRON JV.; *et al.* Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxid Redox Signal**. n.18, p. 51-65, 2013.

MASATO E.; KOZAI T.; COSENTINO F.; *et al.* Statin prevents tissue factor expression. In human endothelial cells. Role of Rho/Rho-kinase and AKT pathways. **Circulation**. n.105, p.1756-1759, 2002.

MASON, J.C. Statins and their role in vascular protection. **Clinical Science**. v. 105, n. 3, p. 251-266, 2003.

MASON, R.P.; CORBALAN, J.J.; JACOB, R.F.; DAWOUD, H.; MALINSKI, T. Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitrooxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes. **J Physiol Pharmacol**. n. 66, p.65-72, 2015.

MASSARO, M.; ZAMPOLLI, A.; SCODITTI, E.; CARLUCCIO, M.A.; STORELLI, C.; DISTANTE, A.; *et al.* Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. **Cardiovasc Res**. n. 86, p. 311-320, 2010.

MEEUWISSE-PASTERKAMP, S.H.; VAN DER KLAUW, M.M.; WOLFFENBUTTEL, B.H. Type 2 diabetes mellitus: prevention of macrovascular complications. **Expert Rev Cardiovasc Ther**. v. 6, n. 3, p. 323-341, Review, 2008.

MONCADA, S. *et al.* Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall: an explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**. v. 11, n. 3, p. 323-344, 1977.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**. v. 147, suppl 1, p. S193-201, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGES, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. **Antioxid Redox Signal**. v. 20, n.1, p.164-182, Review, 2014.

MOZAFFARIAN, D.; NYE, R.; LEVY, W.C. Statin therapy is associated with lower mortality among patients with severe heart failure. **Am J Cardiol**. v.1, n. 93, p. 1124-1129, 2004.

MUELLER, C.F. *et al.* Redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 25, n. 2, p. 274-278, 2005.

MULVANY, M.J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News in Physiological Sciences**. v. 17, p. 105-109, 2002.

MULLARKEY, C.J.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**. v.173, n.3, p. 932-939, 1990.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P.M. Hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. **Am J Physiol**. v.261, n.(4 Pt 2), p. H1034-7, 1991.

NAKATA, M.; NAGASAKA, S.; KUSAKA, I.; MATSUOKA, H.; ISHIBASHI, S.; YADA, T. Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. **Diabetologia**. v. 49, n. 8, p. 1881-1892, 2006.



NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxid Redox Signal.** v. 11, n.12, p. 3071-3109, 2009.

NIELSEN, K.C.; OWMAN, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. **Brain Research** v. 27, n. 1, p. 33-42, 1971.

NUNES, D.O.; ALMENARA, C.C.; BROSEGHI, N.I.; FILHO, G.B.; SILVA, M.A.; STEFANON, I.; VASSALLO, D.V.; PADILHA, A.S. Flaxeed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. **Lipids Health Dis.** v.13, p.107, 2014.

OKAZAKI, T.; OTANI, H.; SHIMAZU, T.; YOSHIOKA, K.; FUJITA, M.; KATANO, T.; *et al.* Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart. **J Mol Cell Cardiol.** n. 50, p. 534-544, 2011.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PELLIGRINO, D.A.; KOENIG, H.M.; WANG, Q.; ALBRECHT, R.F. Protein kinase C suppresses receptor-mediated pial arteriolar relaxation in the diabetic rat. **Neuroreport.** v. 5, n.4, p. 417-420, 1994.

PEREZ, Y.G.; GIANOTTI, M.; LLADÓ, I.; PROENZA, A.M. Sex-dependent effects of high-fat-diet feeding on rat pancreas oxidative stress. **Pancreas Journal.** n. 40, p. 682-688, 2011.

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

PIEPER, G.M.; GROSS, G.J. Oxygen free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am J Physiol.** n. 255, p. H825-33, 1988.

PIEPER, G.M.; SIEBENEICH, W. Diabetes-induced endothelial dysfunction is prevented by long-term treatment with the modified iron chelator, hydroxyethyl starch conjugated-deferoxamine. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 30, n. 6. P.734-738, 1997.

PIEPER, G.M.; SIEBENEICH, W. Temocapril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, protects against diabetes-induced endothelial dysfunction. **Eur J Pharmacol.** v. 1, n. 403(1-2), p. 129-132, 2000.

POTENZA, M.A.; ADDABBO, F.; MONTAGNANI, M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 297, n. 3, p. E568-577, 2009.

RAY, K.K.; CANNON, C.P.; GANZ, P. Beyond lipid lowering: What have we learned about the benefits of statins from the acute coronary syndromes trials? **Am J Cardiol,** v.98, n.11A, p.18P-25P, 2006.

ROBERT, S.; ROSENSON, M.D; CHRISTINE, C.; TANGNEY, P.H.D. Antiatherothrombotic Properties of Statins Implications for Cardiovascular Event Reduction FREE. **JAMA.** v. 279, n. 20, p. 1643-1650, 1998.

ROSENSON, R.S.; TANGNEY, C.C. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. **JAMA.** n. 279, p.1643-1650, 1998.

SAN, M.A.; FONCEA, R.; LAURINDO, F.R.; EBENSPERGER, R.; GRIENGLING, K.K.; LEIGHTON, F. NOX1-based NADPH oxidase-derived superoxide is required for VSMC activation by advanced glycation end-products. **Free Radic Biol Med.** n. 42, p. 1671-9, 2007.

SATTAR, N.A.; GINSBERG, H.; RAY, K.; CHAPMAN, M.J.; ARCA, M.; *et al.* The use of statins in people at risk of developing diabetes mellitus: evidence and guidance for clinical practice. **Atheroscler Suppl.** v. 15, n.1, p. 1-15. Review, 2014

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

SENA, C.M.; MATAFOME, P.; LOURO, T.; NUNES, E.; SEIÇA, R.M. Effects of atorvastatin and insulin in vascular dysfunction associated with type 2 diabetes. **Physiol Res.** v. 63, n. 2, p. 189-197, 2014.

SENA, C.M.; NUNES, E.; LOURO, T.; SEIÇA, R.M. Endothelial dysfunction in Type 2 Diabetes: Effect of Antioxidants. **Rev Port Cardiol.** v. 26, n. 6, p. 609-619, 2007.

SENA, C.M.; PEREIRA, A.M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochim Biophys Acta.** V. 1832, n.12, p. 2216-223, Review, 2013.

SHETTY, G.K.; ECONOMIDES, P.A.; HORTON, E.S.; MANTZOROS, C.S.; VEVES, A. Circulating adiponectin and resistin levels in relation to metabolic factors, inflammatory markers, and vascular reactivity in diabetic patients and subjects at risk for diabetes. **Diabetes Care.** v. 27, n. 10, p. 2450-2457, 2004.

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

SHI, Y.; SO, K.F.; MAN, R.Y.; VANHOUTTE, P.M. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions in femoral arteries of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Br J Pharmacol.** n. 152, p. 1033-1041, 2007.

SHI, Y.; VANHOUTTE, P.M. Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. **J Diabetes.** v. 1, n. 3, p. 151-162, 2009.

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacol Ther.** v. 112, n. 1, p. 71-105, Review, 2006.

SINDHU, R.K.; *et al.* Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1743, n. 1-2, p. 86-92, 2005.

SOLDATOS, G.; COOPER, M.E. Advanced glycation end products and vascular structure and function. **Curr Hypertens Rep.** v.8, n.6, p. 472-478, 2006.

SONTA, T.; INOBUCHI, T.; TSUBOUCHI, H.; SEKIGUCHI, N.; KOBAYASHI, K.; MATSUMOTO, S.; *et al.* Evidence for contribution of vascular NADPH oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. **Free Radic Biol Med.** n. 37, p.115-123, 2004.

SPITALER, M.M.; GRAIER, W.F. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. **Diabetologia.** n. 45, p.476-494, 2002.

SRIKANTH, S.; DEEDWANIA, P. Management of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. **Curr Cardiol Rep.** v. 9, n. 4, p. 264-271. Review, 2007.

STAMLER, J.; WENTWORTH, D.; NEATON, J.D. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). **Jama.** v.256, n.20, p.2823-2828, 1986.

SUZUKI, H. *et al.* In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.** v. 25, n. p. 1083-1089, 1995.

SZASZ, T. *et al.* A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. **Experimental Biology and Medicine.** v. 232,n. 1, p. 27-37, 2007.

SZOCS, K. *et al.* Upregulation of Nox-based NADPH oxidases in restenosis after carotid injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** v. 22, n. 1, p. 21-27, 2002.

TAKEMOTO, M.; LIAO, J.K. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 21, n. 11, p. 1712-1719. Review, 2001.

TAN, K.C.; CHOW, W.S.; TAM, S.C.; AI, V.H.; LAM, C.H.; LAM, K.S. Atorvastatin lowers C-reactive protein and improves endothelium-dependent

vasodilation in type 2 diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.** n. 87, p. 563-568, 2002.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension.** v. 42, n. 6, p. 1075-1081, Review, 2003.

TANTIKOSOOM, W.; THINKHAMROP, B.; KIATCHUSAKUL, S.; JARERNSIRIPORNKUL, N.; SRINAKARIN, J.; OJONGPIAN, S. Randomized trial of atorvastatin in improving endothelial function in diabetics without prior coronary disease and having average cholesterol level. **J Med Assoc Thai.** v. 88, n. 3, p. 399-406, 2005.

TEHRANI, S.; MOBARREZ, F.; LINS, P.E.; ADAMSON, U.; WALLEN, H.N.; JORNESKOG, G. Impaired endothelium-dependent skin microvascular function during high-dose atorvastatin treatment in patients with type 1 diabetes. **Diab Vasc Dis Res,** n.10, p. 483-488, 2013.

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

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, G. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VAN DE REE, M.A.; HUISMAN, M.V.; DE MAN, F.H.; VAN DER, V.I.J.; VER J.C.; MEINDERS, A.E.; BLAUW, G.J. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes mellitus and the lack of effect of simvastatin. **Cardiovasc Res.** v. 52, n. 2, p. 299-305, 2001.

VASQUEZ-VIVAR, J.; *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.** v. 95, n. 16, p. 9220-9225, 1998.

VERSARI, D.; DAGHINI, E.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. **Diabetes Care**. v.32, (Suppl) 2, p. S314-321, 2009.

VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; VERSARI, D.; GHISU, N.; FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; *et al.* Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. **Hypertension**. n. 53, p. 1008-1016, 2009.

VIRGÍNIA, A. New Standards of Care Provide Guidelines for Statin Use for People with Diabetes to Prevent Heart Disease. **ADA**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/newsroom/press-releases/2014/new-standards-of-care-provide-guidelines-for-statin-use-for-people-with-diabetes-to-prevent-heart-disease.html>>. Acesso em: 06 mai.2015.

WALTER DH.; RITTIG K.; BAHLMANN FH.; *et al.* Statin Therapy accelerates reendothelization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **Circulation**. n. 105, p. 3017-3024, 2002.

WASSMANN S.; LAUFS U.; BAUMER AT.; MULLER K.; AHLBORY K.; LINZ W.; *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. **Hypertension**. n. 37, p. 1450-1457, 2001.

WASSMANN, S.; LAUFS, U.; MULLER, K.; KONKOL, C.; AHLBORY, K.; BAUMER, A.T.; *et al.* Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. n. 22, p. 300-305, 2002.

WEI, Y.; WHALEY-CONNELL, A.T.; CHEN, K.; HABIBI, J.; UPTERGROVE, G.M.; CLARK, S.E.; *et al.* NADPH oxidase contributes to vascular inflammation, insulin resistance, and remodeling in the transgenic (mRen2) rat. **Hypertension**. n. 50, p. 384-391, 2007.

WENZEL, P.; DAIBER, A.; OELZE, M.; BRANDT, M.; CLOSS, E.; XU, J.; *et al.* Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-CoA reductase inhibition in a

rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Atherosclerosis**. n. 198, p. 65-76, 2008.

WENZEL, P.; DAIBER, A.; OELZE, M.; BRANDT, M.; CLOSS, E.; XU, J.; THUM, T.; BAUERSACHS, J.; ERTL, G.; ZOU, M.; FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-Coa reductase inhibition in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Atherosclerosis**. n. 198, p. 65-76, 2007.

WESELER, A.R.; BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Current Hypertension Reports**. v. 12, n. 3, p. 154-161, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on diabetes**. <http://www.who.int>, 2016.

WRIGHT, R.S.; BARSNESS, G.W. Diabetes and Coronary Intervention: Special Considerations for Antithrombotic Therapy. **Curr Interv Cardiol Rep**. v. 3, n. 4, p. 330-335, 2001.

XAVIER, F.E.; *et al.* Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. **Vascular Pharmacology**. v. 40, n. 1, p. 67-76, 2003.

XIA, Y.; *et al.* Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 40, p. 25804-25808, 1998.

YAMASHITA, S.; TSUBAKIO-YAMAMOTO, K.; OHAMA, T.; NAKAGAWA-TOYAMA, Y.; NISHIDA, M. Molecular mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions. **J Atheroscler Thromb**. v. 17, n. 5, p. 436-451, 2010.

ZHANG, T.; REID, K.; ACUFF, C.G.; JIN, C.B.; ROCKHOLD, R.W. Cardiovascular and analgesic effects of a highly palatable diet in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v. 48, n. 1, p. 57-61, 1994.

ZINKEVICH, N.S.; GUTTERMAN, D.D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. **American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology**. v. 301, n. 3, p. H647-H653, 2011.



## **8 ANEXOS**

## PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS / UFES

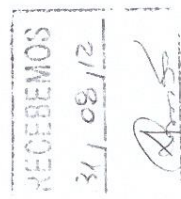


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 017/2012, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Ações Vasculares do Tratamento com Artovastatina em ratos diabéticos induzidos por streptozotocina.**", que tem como responsável o (a) docente **Fabiana Vieira Simões**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 03/08/12.



  
Presidente do  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA / UFES

Vitória (ES), 24 de agosto de 2012.

## CARTA DE ACEITE DO ARTIGO RELACIONADO À TESE

23/05/2016

View Letter

## View Letter

Close

**Date:** May 06, 2016  
**To:** "Priscila R. Batista" pri.ftp@gmail.com  
**From:** "Pharmacological Reports" editor@if-pan.krakow.pl  
**Subject:** Your Submission

---

Ms. Ref. No.: PHAREP-D-16-00138R1  
Title: Treatment with high dose of atorvastatin reduces vascular injury in diabetic rats  
Pharmacological Reports

Dear Mrs. Batista,

I am pleased to inform you that your paper "Treatment with high dose of atorvastatin reduces vascular injury in diabetic rats" has been accepted for publication in Pharmacological Reports.

Thank you for submitting your work to Pharmacological Reports.

Yours sincerely,

Beata Kreiner  
Editorial Office  
Pharmacological Reports

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

---

Close

[Author's Home](#) > Track your accepted article

## TRACK YOUR ACCEPTED ARTICLE

Welcome! [Login](#) to get personalized options. New user? [Register](#) | [Why register?](#)

Your article's details and status are shown in the following table:

### Article status

Article title:	Treatment with high dose of atorvastatin reduces vascular injury in diabetic rats
Reference:	PHAREP498
Journal title:	Pharmacological Reports
Corresponding author:	Mrs. Priscila R. Batista
First author:	Dr. Fabiana V. Simões
Received at Editorial Office:	4 Apr 2016
Article revised:	28 Apr 2016
Article accepted for publication:	29 Apr 2016
Received at Elsevier:	6 May 2016
Journal publishing agreement sent to author:	10 May 2016
PDF offprint:	Yes
Journal publishing agreement returned:	10 May 2016
DOI information:	10.1016/j.pharep.2016.04.022
Status comment:	At this moment it is not yet possible to give you information about the publication date. This depends on the number of articles lined up for publication in the journal. Citation information will be shown when available.

**ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PHARMACOLOGICAL  
REPORTS**