José Felippe Pinho da Silva

Estudo dos mecanismos implicados no aumento da contratilidade vascular em um modelo animal de Diabetes *Mellitus* Tipo I

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

José Felippe Pinho da Silva

Estudo dos mecanismos implicados no aumento da contratilidade vascular em um modelo animal de Diabetes *Mellitus* Tipo I

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora Profª Drª Virginia Soares Lemos

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Profº Ronaldo Tadeu Pena

Vice-reitora: Heloisa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO

PRÓ-REITORA: Profª Elizabeth Ribeiro da Silva

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DE MINAS GERAIS

DIRETOR: Prof ª Maria Cristina Lima de Castro

Vice-Diretor: Prof º Sergio Costa Oliveira

PÓS-GRADUAÇÃO FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

COORDENADORA: Prof º Frederic Jean Georges Frezard

Dedicação

Dedico este trabalho aos meus pais, a minha irmã e a Graziela e a todos os meus amigos. Pilares essenciais em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho. Pessoas que ao longo destes anos de trabalho me mostraram o verdadeiro sentido da palavra equipe. Equipe que trabalha como peças de uma engrenagem, perfeitamente sincrônicas e com um objetivo claro: a vitória comum. Sito como exemplo disto este trabalho, que é uma vitória de todos nós.

Agradeço então de uma forma especial as peças fundamentais para a concretização de mais esta etapa: Ao Bruno Rezende, pela sua paciência perseverança em acreditar no trabalho e de me ensinar os primeiros passos no laboratório ao Luciano Capettini pelo exemplo de dedicação, comprometimento e eficácia no trabalho, ao Marcos Medeiros, um cabra macho, que não hesitou em nos ajudar com sua técnica extraordinária nos momentos mais complicados, a nossa amiga e irmã Josiane, com sua responsabilidade admirável, agradeço ao professor Jader Cruz que compartilhou de sua sabedoria para o desenvolvimento do trabalho, a Paula Campos e a Profª Silvia Passos pela ajuda nos experimentos de histologia, a Profª Daniela Souza por ter me incentivando a carreira científica e a professor Steyner por todos os ensinamentos e amizade. Agradeço ainda aos amigos do laboratório de fisiologia e farmacologia cardiovascular Graziele, Liliane, Rosária, Denis, Silvia e demais amigos de outros laboratórios pela convivência extraordinária.

Digo ainda que mesmo que as engrenagens estejam perfeitamente congruentes elas nãos se movem sem um comando superior por isto também agradeço de forma especial a minha orientadora Virgínia Soares Lemos, pelo exemplo de liderança. Líder na essência que exibe todas as características daquele que precede, guia e lidera, ou seja: respeito, serenidade segurança e audácia nos momentos mais cruciais da nossa jornada.

Peço ainda desculpas pelas possíveis injustiças que possa ter ocorrido e digo que se esqueci aqui nestas palavras de agradecê-lo, pode contar comigo, pois sou eternamente grato por sua amizade e por seu companheirismo.

E digo a todos: de tê-los como amigos me põe em uma situação extremamente confortável para assumir os desafios que ainda estão por vir.

Agradeço também a Capes e a Fapemig pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigado!

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- $[Ca^{2+}]_i$ - Concentração intracelular de íons Ca^{2+}
- 5-HETE - Ácido 5-hidroxieicosatetraenóico
- AA - Ácido aracdônico
- ACh - Acetilcolina
- AKT/PKB - Proteína Cinase B
- AS-ODNs - Oligodeoxinucleotídeos Antisense
- Ca^{2+} - Íons Cálcio
- CaM - Complexo Cálcio/Calmodulina
- CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CPI-17- Fosfoproteína inibitória CPI-17
- DNA - Ácido desoxiribonucleico
- DOCA-sal - Ratos hipertensos induzidos por desoxicorticosterona e sal
- EDHF- Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
- EDRF - Fatores Relaxantes Derivado do Endotélio
- eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- FCDE - Fatores contráteis derivados do endotélio
- Fen - Fenilefrina
- FRDE - Fatores relaxantes derivados do endotélio
- GDP - Guanosina difosfato
- GMPc - Monofosfato de Guanosina Cíclica
- GPCR - Receptores acoplados à proteína G
- GTP - Guanosina trifosfato
- L-NNA - N-nitro-L-Arginina
- MLC - Cadeia Leve da Miosina
- MLCK - Cinase da cadeia leve miosina
- MLCP - Fosfatase da cadeia leve da miosina
- MM-ODN - Sequência de oligodesoxinucleotídeos embaralhada (*mismatch oligodeoxinucleotides).*
- MYPT-1 - Subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve da miosina (130-kDa *myosin targeting subunit*)

- NO - Óxido Nítrico
- NOS - Oxido Nítrico Síntase
- O_2^- - Ânion superóxido.
- ODNs - Oligodesoxinucleotíideos
- $PGH_{2.}$ - Prostaglandina H_2
- PGI_2 - Prostaciclina
- PI3Ks - Fosfatidilinositol-3-cinases
- PKC - Proteína cinase C
- PKG - Proteina cinase G
- PtdIsp - Fosfatidilinositol
- R - Receptor
- SOD - Superóxido Dismutase
- STZ - Streptozotocina
- TP - Receptor TP de prostanóides
- TXA_2 - Tromboxano A_2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1:	Mecanismo da disfunção endotelial no diabetes	08
FIGURA 2:	Ações bioquímicas da PI3K	11
FIGURA 3:	Diferentes classes de PI3Ks	12
FIGURA 4:	Mecanismo de ação da PI3K no endotélio vascular	13
FIGURA 5:	Mecanismo de ação da PI3K na musculatura lisa vascular	14
FIGURA 6:	Peso e glicemia dos animais diabéticos comparados com os animais controles.	25
FIGURA 7:	Curva concentração resposta para acetilcolina (ACh), fenilefrina(Fen) e KCl em anéis de aorta de animais diabéticos e controles.	27
FIGURA 8:	Análise morfológica da parede dos anéis de aorta dos animais diabéticos e controles	28
FIGURA 9:	Curvas concentração-resposta cumulativas para fenilefrina (Fen) na presença e na ausência de calfostin-C	29
FIGURA 10:	Curvas concentração-resposta cumulativas para Fenilefrina na presença dos inibidores da PI3K, LY 294002 e wortimannim.	30
FIGURA 11:	Análise da expressão das isoformas das PI3Ks por Western blot na aorta dos animais controles e diabéticos	31
FIGURA 12:	Curvas concentração resposta para Fenilefrina (Fen) na presença de IC87114	32
FIGURA 13:	Análise da eficiência AS-ODN em bloquear a expressão da PI3kδ por Western blot	33
FIGURA 14:	Curva concentração resposta para fenilefrina(Fen) e KCl em anéis de aorta de animais diabéticos e controles na presença de AS-ODN ou MM-ODM	34
FIGURA 15:	Análise da influência da aplicação de AS-ODN para PI3Kδ sobre a expressão protéica das outras isoformas da PI3K	35

RESUMO

As alterações vasculares associadas ao diabetes representam a maior causa de morte nos pacientes portadores de diabetes. No entanto, os mecanismos envolvidos nestas disfunções vasculares ainda não são completamente esclarecidos. Neste trabalho nós investigamos os mecanismos envolvidos na disfunção vascular observada na aorta do camundongo diabético tipo I induzido por estreptozotocina. A função vascular foi avaliada dez semanas após a indução do diabetes em um sistema de banho de órgão. Os animais diabéticos apresentaram uma resposta contrátil a fenilefrina e ao KCL muito aumentada em relação aos animais controle, independente da presença de endotélio funcional. Corroborando com estes dados, a indometacina (10μM) e o Ibuprofeno (10μM), inibidores da ciclooxigenase e bosentan (10μM) antagonista do receptor da endotelina, não restauraram a resposta contrátil do animal diabético. As análises morfológicas não mostraram hipertrofia ou hiperplasia da camada média que pudessem justificar o aumento da contração da aorta dos animais diabéticos. O conjunto dos resultados até então, sugerem, portanto, uma alteração funcional das células musculares lisas. Passamos, então a investigar as vias envolvidas no controle da resposta contrátil nas células musculares. A inibição da PKC não alterou a reposta contrátil nos animais controles ou diabéticos. A inibição da via da PI3K com LY294002 e wortimannin foram mais efetivos em diminuir a resposta contrátil nos animais diabéticos. A análise da expressão protéica revelou que o animal diabético apresenta um aumento da expressão da PI3Kδ, mas não da PI3Kα, PI3Kβ ou PI3Kγ, na aorta do animal diabético. Tanto a inibição farmacológica seletiva da PI3Kδ quanto o nocauteamento desta isoforma de PI3K pela técnica de oligodeoxinucleotideo antisense *in vivo*, restauraram a resposta contrátil do animal diabético para o nível do animal controle. Estes resultados apontam para um importante papel da PI3Kδ no aumento da resposta contrátil do animal diabético. Diante disto, podemos concluir que a via de sinalização da PI3Kδ está aumentada no músculo liso da aorta do camundongo diabético podendo representar um novo alvo terapêutico no tratamento das alterações vasculares que representam a principal causa de morte entre os pacientes portadores de diabetes.

Palavras Chaves: PI3K; Músculo Liso Vascular; Disfunção Contrátil.

ABSTRACT

Vasculopathies represent the main cause of morbidity and mortality in patients with type I or type II diabetes. Vascular malfunctioning in diabetes is associated with abnormal contractile response. Here, the involvement of PI3K signaling in regulating vascular function was investigated in a mouse model of type I diabetes. Contractile responses to phenylephrine and KCl were strongly enhanced in diabetic aorta independently on the presence of a functional endothelium. Corroborating with these data, indomethacin (10μM) and Ibuprofen (10μM), cyclooxygenase inhibitors and bosentan (10μM) an inhibitor of endothelin receptors did not restore contractile responses in diabetic vessels to control levels. Selective pharmacological inhibition and *in vivo* oligodeoxinucleotide antisense PI3Kδ knocking down normalized contractile response of diabetic vessels. PI3Kδ, but not PI3Kα, PI3Kβ and PI3Kγ expression was increased in diabetic aortas. These data indicate that PI3Kδ play a role in α_1 adrenergic receptor- and depolarization-elicited smooth muscle contraction and is crucial for the increased vascular contractile response in diabetes. Therefore, PI3Kδ signaling is up-regulated in type I diabetes and leads to increased vascular contractility. Thus, PI3Kδ could represent a novel target to expand the therapeutic strategies to treat vascular disease in diabetes.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**2**
1.1	Diabetes	2
1.1.1	Consequências epidemiológicas e econômicas do diabetes	3
1.1.2	Diabetes e as complicações vasculares	4
1.1.2.1	Diabetes e a disfunção endotelial	5
1.1.2.2	Diabetes e alterações funcionais da musculatura lisa vascular	8
1.2	PI3 cinase(phosphatidilinositol-3-cinase) e o controle do tônus vascular	10
2	**OBJETIVOS**	16
2.1	Objetivos Gerais	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	**MATERIAIS E METODOS**	**18**
3.1	Animais	18
3.2	Comitê de Ética	18
3.3	Preparação do modelo experimental	18
3.4	Montagem da aorta	19
3.4.1	Avaliação do papel do endotélio e dos seus mediadores na resposta vascular	19
3.4.2	Papel da musculatura lisa no processo de contração vascular	20
3.4.3	Avaliação da participação das vias da proteína cinase C e PI3K na disfunção vascular no diabetes	20
3.5	Avaliação de aspectos morfológicos da musculatura lisa vascular em anéis de aorta	20
3.6	Determinação da expressão protéica das diferentes isoformas de PI3K (α, β, γ, δ) por Western blot	21
3.7	Silenciamento *in vivo* da PI3-kinase p110δ	22
3.8	Análises estatísticas e expressão dos resultados	22
4	**RESULTADOS**	**25**

4.1 Alterações de glicose e peso corporal que caracterizam nosso modelo 25
4.2 A resposta contrátil na aorta dos animais diabéticos esta aumentada 25
4.3 Análise morfológica 28
4.4 Participações de cinases no aumento resposta contrátil do animal diabético 29

5 DISCUSSÃO 37

6 CONCLUSÃO 42

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

1.1-Diabetes

Diabetes *mellitus* é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos da secreção e/ou da ação da insulina (A.D.A 2006). A hiperglicemia crônica está relacionada a danos diretos e indiretos em diversos órgãos principalmente olhos, rins, sistema nervoso, coração e vasos sanguíneos (Gross & Nehme, 1999). Dentre estes danos, as complicações cardiovasculares representam mais de 50% de todas elas sendo as grandes responsáveis pela maioria das mortes dos pacientes diabéticos (Karnik et. al., 2007, Wadwa, 2006; Wilbert & Aronow, 2008).

O processo patológico relacionado ao desenvolvimento do diabetes é complexo e pode envolver alterações funcionais das células β pancreáticas que resulta em uma produção deficiente de insulina ou alterações na sua ação no tecido alvo, podendo estes processos coexistir em alguns pacientes. Estes parâmetros servem como base para a classificação do diabetes em tipo I e tipo II, respectivamente (A.D.A, 2009).

O diabetes tipo I é caracterizado por um déficit na produção de insulina, devido à destruição das células β-pancreáticas por processos auto-imunes ou idiopáticos e ocorre mais frequentemente entre jovens e crianças. Este tipo de diabetes é conhecido como diabetes *mellitus* insulino-dependente. Nela, o corpo produz pouca ou nenhuma insulina e os pacientes acometidos devem receber injeções diárias de insulina. A quantidade de injeções diárias é variável em função do tratamento escolhido pelo endocrinologista e também em função da quantidade de insulina produzida pelo pâncreas (A.D.A., 2006).

O diabetes tipo II é conhecido como diabetes não insulino-dependente, tem mecanismo fisiopatológico complexo e não completamente elucidado. Ocorre uma diminuição na resposta dos receptores presentes no tecido periférico à insulina, levando ao fenômeno de resistência à insulina. As células β do pâncreas aumentam a produção de insulina e, ao longo dos anos, a resistência à insulina acaba por levar as células β à exaustão. Desenvolve-se frequentemente em etapas adultas da vida e é muito frequente a associação com a obesidade.

Além dos tipos I e II de diabetes ainda podemos encontrar na prática clínica casos de diabetes com caracteristicas peculiares como a diabetes gestacional que envolve uma combinação de secreção e responsividade de insulina inadequadas, assemelhando-se à diabetes tipo II em diversos aspectos. Outros casos específicos de diabetes também podem ser observados como a diabetes causada por defeitos genéticos da função das células β como: alterações dos cromossomos 12 HNF-1α (MODY3); cromossomo 7 glucokinase (MODY2); cromossomo 20 HNF-4 α (MODY1); cromossomo 13 *insulin promoter factor*-1 (IPF-1; MODY4); cromossomo 17 HNF-1 (MODY5); cromossomo 2 NeuroD1 (MODY6) e alterações do DNA mitocondrial, entre outros. Também podem ser encontradas diabetes por defeito genético relacionado a ação da insulina como resistência à insulina do tipo A, síndrome de Rabson-Mendenhall, entre outras. Diabetes também pode estar relacionada com outras doenças pancreáticas como: pancreatites, traumas, pancreatectomia e neoplasias, fibrose cística, hemocromatoses, fibrocálculos pancreatopáticas, endocrinopatias como acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, hipertiroidismo, somatostatinoma e aldosteronoma (A.D.A, 2006)

1.1.1-Consequências epidemiológicas e econômicas do diabetes

A incidência de diabetes *mellitus* na atualidade atinge proporções epidêmicas, demandando um alto custo tanto econômico quanto social, sendo que os custos totais para o tratamento e prevenção chegam a 10% do total do orçamento empenhado para a saúde em vários países (Thompson, 2001).

Somente nos Estados Unidos, em 2004, havia cerca de 13 milhões de pessoas diagnosticadas com diabetes do tipo I ou do tipo II. Somando a estes dados, ainda estão os portadores não diagnosticados (Lucas et al., 2004) e este número tende a dobrar até 2030, segundo dados da organização mundial de saúde (Boyle et. al.,2001; Wild et al., 2004).

No Brasil, a situação não é menos alarmante uma vez que segundo projeções, em 2030 haverá cerca de 70 milhões de portadores da doença em todo território nacional (Yach et al., 2006).

O diabetes é, portanto, um problema sério de saúde pública uma vez que os pacientes diabéticos apresentam um elevado índice de mortalidade e

uma baixa expectativa de vida sendo a sexta maior causa de morte entre os americanos (Arias et al., 2003). Embora a elevada prevalência e o alto custo envolvidos com o tratamento dos diabéticos sejam aspectos relevantes, deve se ressaltar que a maior preocupação necessária é para com a saúde individual dos acometidos. Neste sentido, dois aspectos tornam-se extremamente importantes. O primeiro é a morbidade causada pelas complicações crônicas decorrentes do diabetes e o segundo é a mortalidade proporcional entre as demais doenças que possuem características epidêmicas como, por exemplo, a hipertensão arterial.

Devido à gravidade e ao enorme impacto sócio econômico do diabetes e tamanha complexidade envolvida na sua gênese e de suas complicações é de extrema importância a busca de informações que contribuam para um melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia das complicações decorrentes do diabetes que representam as maiores causas de mortes para estes pacientes.

1.1.2-Diabetes e as complicações vasculares:

Diabetes *mellitus* é um importante fator de risco para o aumento da pressão sanguínea e o desenvolvimento de aterosclerose (Wadwa, 2006; Wilbert & Aronow, 2008). O aumento do tônus vascular possui um importante papel na fisiopatologia da hipertensão arterial (Bohr et al., 1991), aterosclerose (Dzau, 1990) e diabetes (Arikawa et al., 2001; Piercy & Taylor, 1998; Lagaud, 2001; Mayhan, 1999; Okon et al., 2003) contribuindo de forma bastante expressiva para o aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes acometidos por estas doenças.

Entre os pacientes diabéticos, a maioria das mortes e incapacidade é devida a complicações vasculares que podem tanto envolver alterações microvasculares, que compreendem principalmente as retinopatias e nefropatias diabéticas quanto alterações macrovasculares representada principalmente pela aterosclerose que se manifesta clinicamente através da cardiomiopatia diabética, doença arterial periférica e doenças cerebrovasculares (Daneman, 2006 Nuzum et al., 2009; Di Marzio et al., 2006; Orasanu et al., 2009; Eckel et al., 2002; Nuzum , 2009). Alterações de grandes vasos como a artéria aorta no diabetes assumem um papel importante na

fisiopatologia das complicações cardiovasculares no diabetes tendo em vista que o paciente diabético apresenta com freqüência problemas de insuficiência cardíaca (Takeda, 2009; Karnik et al., 2007). A insuficiência cardíaca associada a um aumento da resistência da artéria aorta piora expressivamente a função cardíaca destes pacientes.

Diante do exposto, há uma necessidade crescente de se esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações vasculares do diabetes, que representam uma ameaça efetiva de morte para o paciente diabético.

As causas das alterações vasculares no diabetes podem ser as mais diversas, incluindo fatores bioquímicos e metabólicos que levam a alterações estruturais e funcionais dos leitos vasculares. A origem de tais alterações pode ser tanto no endotélio vascular, que possui uma estrutura de sinalização intracelular complexa responsável pela produção e secreção de diversos fatores vasoativos, como também podem ter origem na própria musculatura lisa vascular (Bertoluci et al., 2008; Creager et al., 2003; Vriese et al., 2000).

A investigação destas disfunções se torna um desafio uma vez que podem coexistir disfunções tanto de origem endotelial quando de origem muscular envolvendo diversos segundos mensageiros, canais iônicos receptores de membrana entre outros que possuem ações de extrema importância no controle da fisiologia vascular. Nos tópicos a seguir os mecanismos de controle da reatividade vascular com origem no endotélio vascular e da musculatura lisa vascular serão abordados, pois são alvos potenciais para a patogênese das alterações vasculares no diabetes.

1.1.2.1-Diabetes e a disfunção endotelial:

A disfunção endotelial em alguns casos possui um papel chave na patogênese da doença vascular no diabetes. O endotélio controla o tônus da musculatura lisa vascular subjacente através da produção de mediadores vasoativos relaxantes e contráteis (Figura 1). Os fatores relaxantes derivados do endotélio compreendem o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Alterações destes, podem ser responsáveis por uma resposta vasodilatadora prejudicada em vários leitos de modelos animais de diabetes e também em humanos tanto com o tipo I quanto com o diabetes do tipo II (Vriese et al., 2000).

Vários mecanismos envolvidos da disfunção endotelial no diabetes têm sido relatados, incluindo alterações nos mecanismos intracelulares de transdução de sinais e na biodisponibilidade de substratos (Figura 1). Uma diminuição na produção ou um aumento na degradação de fatores relaxantes derivados do endotélio, um aumento da liberação de fatores contráteis derivados do endotélio e também uma diminuição da sensibilidade do leito vascular a estes fatores podem estar envolvidos na alteração vascular no diabetes (Ding et al. 2005; Griendling et al., 2001). Estas alterações podem ser diferentes de acordo com o leito vascular estudado, tipo de diabetes, tempo de instalação da doença ou modelo experimental utilizado características estas que podem explicar a divergência dos resultados encontrados em diferentes modelos de diabetes.

No entanto, o óxido nítrico tem sido, geralmente, considerado o principal mediador responsável pela disfunção endotelial no diabetes.

A biossíntese do NO no endotélio vascular e em outros tecidos ocorre através da ação de uma enzima dimérica chamada de óxido nítrico sintase (NOS) de extrema importância para a resposta relaxante vascular. Este NO produzido no endotélio pela isoforma endotelial da NOS (eNOS) a partir da L-arginina, promove o relaxamento vascular por estimular a enzima guanilil ciclase solúvel com o consequente aumento da produção de GMP cíclico. Este, por sua vez, estimula a cinase dependente de GMPc (PKG) que por diversos mecanismos promove o relaxamento da musculatura lisa vascular (Alderton 2001).

Alterações tanto na biobisponibilidade quanto no transporte e no metabolismo do substrato L-arginina podem ter papel crítico na gênese da disfunção endotelial no diabetes. Reduções marcantes no conteúdo plasmático de L-arginina tem sido relatadas no diabetes. (Pieper & Peltier, 1997; Heygate et al., 1995; Mayhan et al., 1997).

A produção aumentada de fatores contráteis derivados do endotélio também é bastante comum como causa da disfunção endotelial no diabetes. Diversos trabalhos apontam para uma produção excessiva destes fatores, sendo que os prostanóides contráteis são os grandes responsáveis pelas alterações vasculares observadas tanto *in vivo* (Mayhan et al., 1991) quanto em vaso isolado (Shimizu et al., 1993; Tesfamariam et al., 1989).

Outro mecanismo já relatado no diabetes refere-se ao estresse oxidativo, onde o tratamento dos vasos com a enzima superóxido dismutase (SOD) foi capaz de restaurar o padrão da resposta vasodilatadora em vasos diabéticos, sugerindo uma inativação dos fatores relaxantes derivados do endotélio por espécies reativas de oxigênio (Pieper et al., 1992). As espécies reativas de oxigênio podem ser formadas através de um mau funcionamento da NOS por alterações de disponibilidade de tetrahidrobiopterina, que é um fator crítico para o funcionamento desta enzima na produção de NO. Este mecanismo tem sido proposto em diversos modelos de diabetes e em outras patologias como causa principal de complicações vasculares em diversos leitos vasculares (Harrison, 1997).

Problemas de modificação estrutural e quantitativa da expressão de proteina G, também foram relatados em vasos da retina de ratos diabéticos resultando em modificações do controle vascular (Sobrevia & Mann, 1997) ou alterações na sensibilidade ao Ca^{2+} (Cameron & Cotter, 1992; Fukao et al., 1997) contribuindo para a gênese da disfunção endotelial.

No entanto, apesar da evidente ligação patogênica entre o aumento da concentração sanguínea de glicose e o surgimento das complicações vasculares no diabetes, os mecanismos que envolvem as manifestações clínicas do diabetes, a hiperglicemia e a disfunção vascular ainda continuam sendo matéria de grande controvérsia, sendo que alguns modelos de diabetes não apresentam alterações do funcionamento endotelial, porém, possuem alterações funcionais importantes na funcionalidade da musculatura lisa vascular.

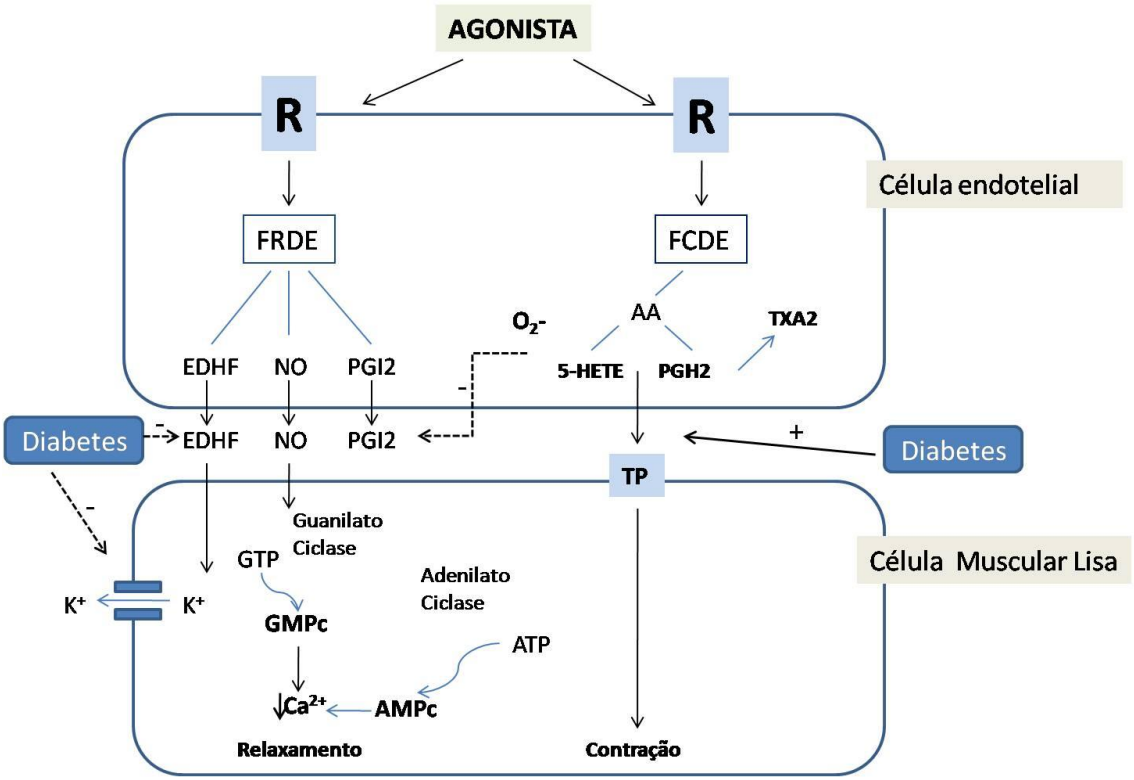


Figura 1: Mecanismo da disfunção endotelial no diabetes. R, receptor; FRDE Fatores relaxantes derivados do endotélio; EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio); FCDE, Fatores contráteis derivados do endotélio; TXA_2, thromboxano A_2; PGH_2, prostaglandina H_2; 5-HETE, ácido 5-hidroxieicosatetraenóico; TP, receptor TP de prostanóides; O_2^-, ânion superóxido. O diabetes está envolvido tanto com um prejuízo da ação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDHF; NO e PGI_2) quanto de um aumento de fatores contráteis derivados do endotélio (FCDE) como prostaglandina PGH_2 ou por estresse oxidativo por aumentar radicas livres como O_2^-. (Modifica de De Vriese et al, 2000)

1.1.2.2-Diabetes e alterações funcionais da musculatura lisa vascular.

O evento chave na regulação da contratilidade da musculatura lisa vascular é a fosforilação e a desfosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) catalisada respectivamente por uma cinase, a cinase da miosina de cadeia leve (MLCK) que é dependente do complexo formado pelo cálcio e pela calmodulina (CaM). Outra molécula importante no processo de contração é a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), responsável pela desfosforilação da miosina e reversão do processo de contração. O grau de fosforilação da MLC e a consequente produção de força, depende do balanço entre a atividade da MLCK e da MLCP (Akata, 2007 a e b; Crotty, 1999).

O processo que resulta no controle da resposta contrátil não é simples sendo que tanto o controle da atividade da MLCK e da MLCP ocorre através da ativação de um complexo sistema de sinalização intracelular que envolve diversas proteínas cinases e canais iônicos que são de extrema importância para o processo contrátil (Hirano, 2007).

A ativação da musculatura lisa vascular por diferentes agonistas e por despolarização elétrica aumenta rapidamente a concentração intracelular de íons Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$, seja por um influxo de Ca^{2+} do meio extracelular ou por mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. O Ca^{2+}, então, se liga a calmodulina formando um complexo formado pela calmodulina mais 4 íons Ca^{2+}, sendo este complexo responsável pela ativação da MLCK que fosforila a MLC, predominantemente no resíduo de serina na posição 19 (ser19). Esta fosforilação resulta na interação das fibras contráteis e na contração da musculatura lisa vascular. Todo este processo, no entanto, pode sofrer influência de proteínas cinases tais como proteína cinase C (PKC), Rho/Rho cinase, PI3K/AKT uma vez que estas controlam o grau de fosforilação da MLC agindo tanto no controle da ($[Ca^{2+}]_i$, como também sobre o próprio grau de fosforilação da MLC, por uma via independente da ação direta do Ca^{2+} (Hirano, 2007; Pfitzer, 2001; Dimopoulos et al., 2007).

Em alguns estados patológicos como no diabetes, estas cinases podem ter sua função alterada e contribuir de forma anômala para o processo de contração da musculatura lisa vascular (Kobayashi, 2005).

Cinases como a PKC, podem estar envolvidas no desenvolvimento das complicações vasculares no diabetes (Das Evcimen & King, 2007; Ishii et al., 1998). Quanto aos mecanismos envolvidos na gênese de tais alterações, podemos dizer que estes são bastante variados conforme o modelo estudado, envolvendo alterações na própria célula da musculatura lisa vascular, onde participa da via de controle do grau de fosforilação das fibras contráteis por ter ações inibitórias sobre a CPI-17, proteína que inibe de forma fisiológica a ação da fosfatase da miosina de cadeia leve MLCP (Pelligrino et al., 1994).

Outro sistema envolvido na disfunção vascular no diabetes é a Rho/Rho cinase (Xie Z et al., 2006). Rho é uma pequena proteína G monomérica que recentemente tem sido relacionada ao controle da resposta contrátil da musculatura lisa vascular por inibir a atividade da fosfatase da miosina de

cadeia leve, MLCP, através do seu efetor Rho cinase. Esse processo envolve a fosforilação direta da MYPT, subunidade regulatória da MLCP, que é o sítio de ligação da Rho cinase. A Rho cinase também pode fosforilar indiretamente a MYPT através da ativação da CPI-17. A ativação da MYPT aumenta o grau de fosforilação da MLC e consequentemente proporciona um aumento da resposta contrátil.

Existem também indícios da ação da Rho cinase sobre canais de Ca^{2+} ampliando assim a contribuição desta cinase para a modulação da resposta contrátil na musculatura lisa vascular. (Villalba et al., 2008).

A ação destas cinases é ainda mais complexa, pois interações entre suas vias de atuação podem existir como o que ocorre em alguns casos onde a ativação da Rho A está associada com a ativação da via da PI3K (Miao et al. 2002).

A PI3K que inicialmente foi descrita por suas ações sobre processos inflamatórios, de uma forma mais recente esta sendo envolvido no controle da musculatura lisa vascular em vários leitos vasculares de diferentes modelos experimentais. As vias pelas quais a PI3K modula a musculatura lisa ainda é motivo de intensa investigação de diversos grupos de pesquisa.

1.2-PI3 cinase(phosphatidilinositol-3-cinase) e o controle do tônus vascular

Fosfatidilinositol-3-cinases (PI3Ks) é uma família de proteínas que catalisa a fosforilação do grupamento inositol da molécula lipídica fosfatidilinositol (Figura 2) levando a produção de fosfatidilinositol(3)-fosfato, fosfatidilinositol(3,4)-bisfosfato e fosfatidilinositol(3,4,5)-trifosfato (Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999; Kapeller et al., 1994).

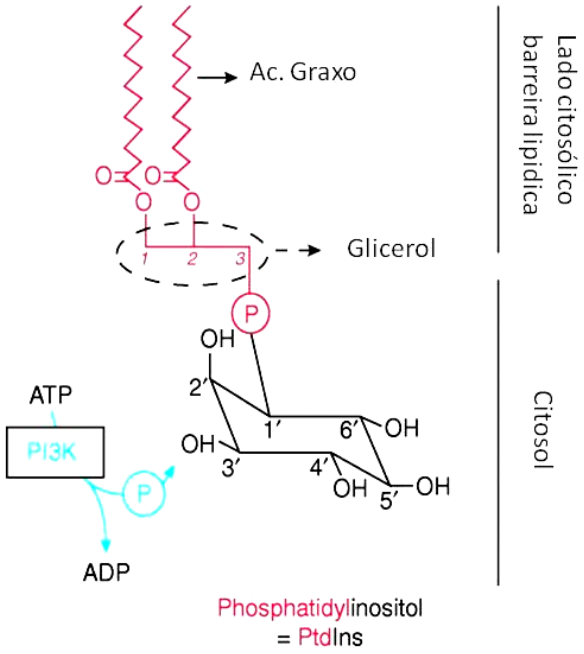


Figura 2: Ações bioquímicas da PI3K. A PI3K fosforila a posição 3´ do anel inositol da molécula de fosfatidilinositol levando a produção de lipídios de membrana que agem como segundos mensageiros. Fonte: http://www.biochemj.org/bj/346/0561/bj3460561.htm

As PI3Ks podem ser divididas em três classes principais de acordo com sua especificidade pelo substrato, estrutura e principalmente pelo seu modo de ativação (Figura 3). As PI3Ks da classe I são heterodímeros constituídos de uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade regulatória e estão presentes no citosol da célula (Cantrell, 2000, Anderson et al., 1999). Essa classe pode ser subdividida em duas subclasses: a classe IA que consiste de PI3Ks ativadas principalmente por tirosinas-cinases e são constituídas de uma subunidade catalítica p110α, p110β ou p110δ) e uma subunidade regulatória, p85α ou β ou p55γ. A classe IB (PI3Kγ) que é estimulada pela subunidade βγ da proteína G e está associada a uma única subunidade regulatória, a p101γ. Ainda, existem as PI3Ks da classe II e PI3Ks da classe III que possuem ações menos conhecidas até então (Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999; Kapeller & Cantley, 1994).

No endotélio, é bem estabelecido que a PI3K está relacionada ao mecanismo de produção de NO por uma via independente de Ca^{2+} (Figura 4) que se processa pela ativação da PI3K através de receptores tirosina cinase ou de receptores acoplados a proteína G. Uma vez ativada, a PI3K é responsável

pela fosforilação de outra cinase chamada AKT ou PKB que possui a capacidade de fosforilar e ativar diretamente a eNOS e promover a produção de NO, dessa forma podendo controlar o tônus vascular(Fulton et al.,1999). No diabetes esta via pode, em alguns casos, estar alterada resultando em uma produção prejudicada de NO o que resulta em modificações da resposta vasorelaxante (Kobayashi et al., 2004).

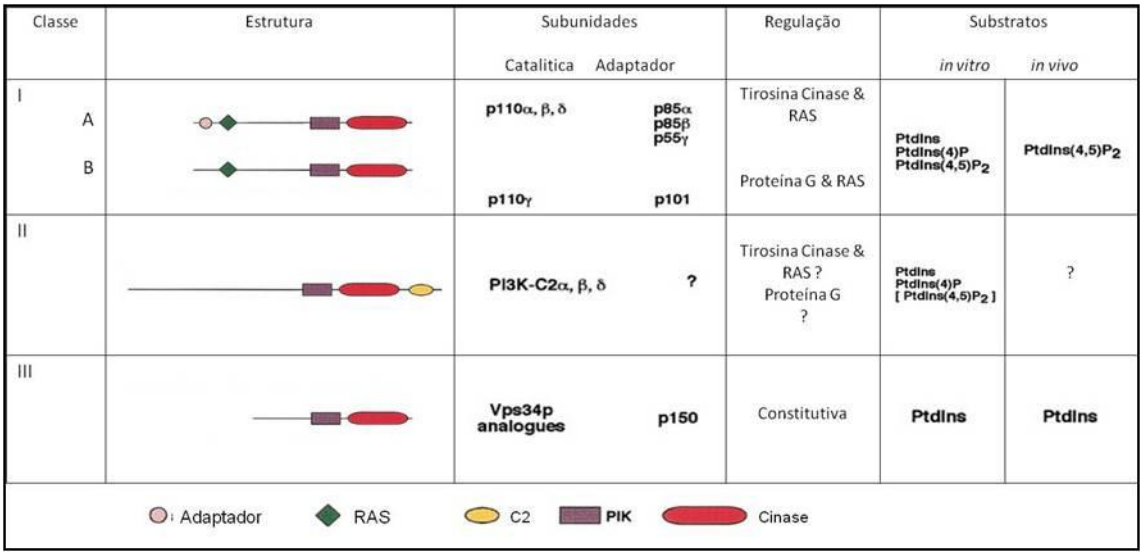


Figura 3: Diferentes classes de PI3Ks. Nesta figura podemos observar esquematicamente a estrutura da PI3K da classe IA e IB, II e III com suas subunidades catalíticas e regulatórias, sua forma de ativação e os seus respectivos substratos lipídicos.(Modificado de Vanhaesebroeck. &. Waterfield, 1999)

Nos últimos anos, apesar das divergências da literatura, a PI3K vem assumindo um papel importante no controle direto da musculatura lisa vascular (Kawanabea et al., 2004; Kim et al.,2006; Morello et al.,2009) (Figura 5). As vias pelas quais a PI3K atua na modulação da contratilidade da musculatura lisa vascular, apesar de ainda não completamente esclarecidas, pode envolver a ação desta cinase sobre canais para Ca^{2+} voltagem dependente (Le Blanc et al., 2004; Macrez et al, 2001; Viard et al., 1999,) resultando em uma maior concentração intracelular deste íon e consequentemente um aumento de força contrátil por uma atividade aumentada da MLCK dependente do complexo Ca^{2+} calmodulina. A PI3K também pode agir modificando diretamente o grau de fosforilação das fibras contráteis (Yu Wang et al., 2006).

Vários trabalhos têm demonstrado que a inibição da PI3K reduz a força na musculatura lisa vascular seja por um aumento de AMP_C ou por ativar efetores como Rho cinase que possuem a capacidade de inibir a atividade da MLCP (Komalavilas et al., 2001; Northcott et al., 2002; Su et al., 2004).

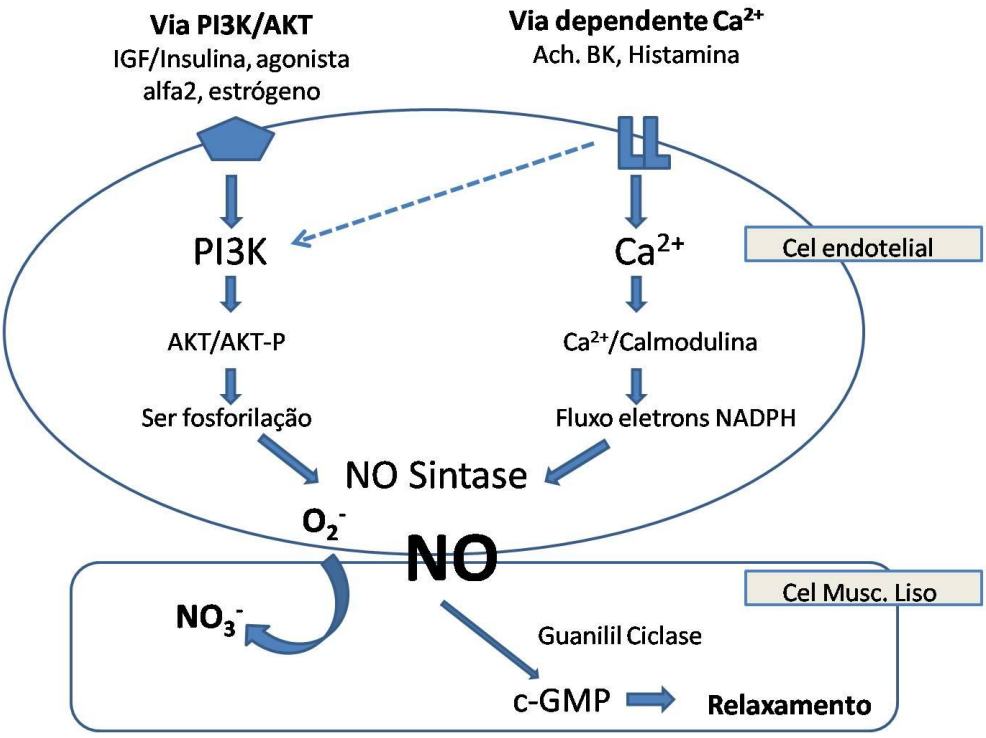


Figura 4: Mecanismo de ação da PI3K no endotélio vascular. A via mais conhecida de produção de NO ocorre a partir do estímulo do endotélio vascular por agonistas que aumentam a $[Ca^{2+}]_i$ resultando na produção de NO pela ativação da NOS. Já a PI3K estimula a NOS de uma forma independente do Ca^{2+} onde o estímulo do endotélio por IGF, agonista alfa 2 adrenérgico ou estrógeno promovem a fosforilação da AKT e estimula a óxido nítrico sintase (NOS) e, consequentemente, leva a um aumento do NO (Modificado de Kobayashi, 2005).

Apesar das PI3Ks α e β serem ampla e abundantemente descritas como expressas no sistema vascular, a expressão das isoformas γ e δ é mais restrita a leucócitos. Entretanto, recentemente, a expressão destas isoformas também foi descrita em vários tecidos do sistema cardiovascular incluindo coração, vasos sanguíneos e plaquetas (Morello, 2009).

As PI3Ks têm sido envolvidas na patogênese da hipertensão arterial. Watts e colaboradores (2003) mostraram que um aumento da expressão da PI3K está relacionado a um aumento do tônus vascular em ratos DOCA-sal

quanto em ratos hipertensos por N-nitro-L-Arginina (L-NNA) (Northcott et al., 2002, 2004).

Estes e outros trabalhos, portanto, ressaltam a importância da PI3K no controle da contratilidade vascular e no desenvolvimento de disfunções vasculares em patologias. No entanto, o envolvimento da PI3K na disfunção contrátil no diabetes com origem na musculatura lisa vascular, ainda é desconhecido. O conhecimento da participação desta via na fisiopatologia do diabetes é de extrema importância, uma vez que propicia o surgimento de novos alvos terapêuticos no tratamento da disfunção vascular no diabetes.

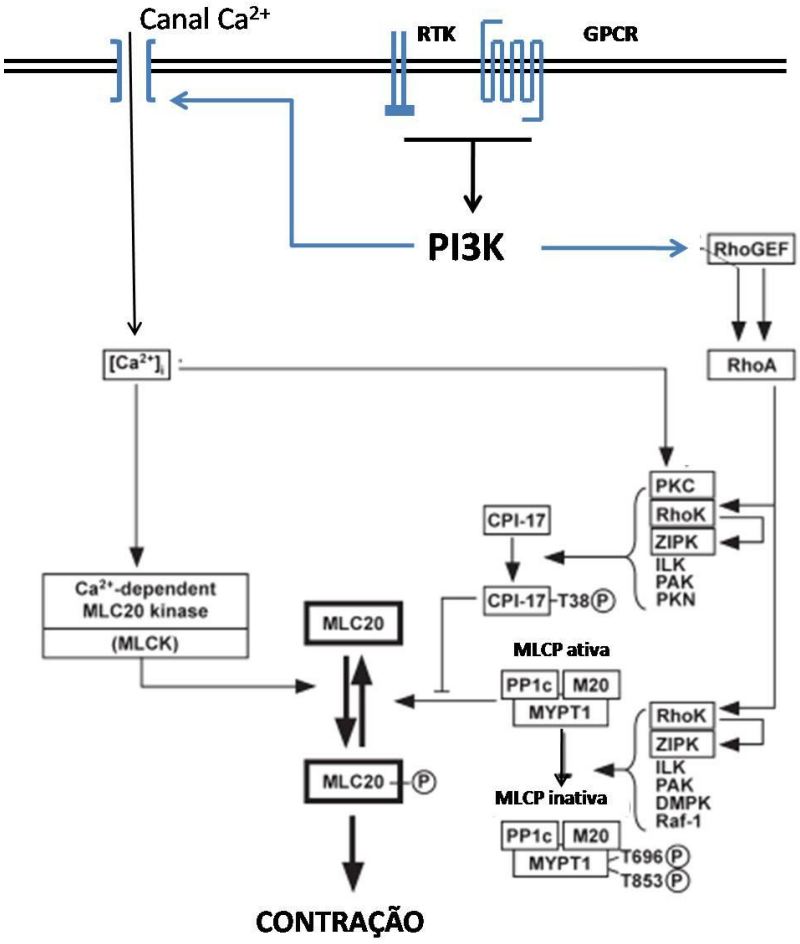


Figura 5: Mecanismo de ação da PI3K na musculatura lisa vascular. A estimulação de receptores acoplados a proteína G (GPCR) ou tirosina cinase podem levar a um aumento da atividade da PI3K. A PI3K pode modular a atividade de canais iônicos como os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem ou modular o grau de fosforilação das fibras contráteis através de um complexo sistema de sinalização intracelular que envolve MLCK, MLCP e diversas cinases como Rho/Rho cinase, proteína cinase C, entre outras.

OBJETIVOS

2.1-OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a origem da disfunção vascular no modelo de diabetes tipo I induzido por streptozotocina em camundongo e estudar os mecanismos implicados nesta disfunção.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os aspectos moleculares envolvidos nas alterações vasculares observadas neste modelo de diabetes, através da análise das seguintes vias envolvidas no controle vascular:

- Avaliar a possível existência de alterações funcionais do endotélio vascular na resposta vasodilatadora;
- Estudar a participação dos mediadores endoteliais na resposta contrátil do animal diabético;
- Avaliar a participação da musculatura lisa vascular na alteração da função vascular;
- Estudar a participação da via da proteína cinase C na resposta contrátil do animal diabético;
- Estudar a via da PI3K na resposta contrátil do animal diabético;
- Estudar a possibilidade de alterações morfológicas do músculo liso vascular neste modelo de diabetes.

MATERIAIS E METODOS

3-MATERIAIS E METODOS

3.1-Animais:

Neste estudo foram utilizados camundongos machos C57Bl/6J, com idade de 3 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFMG. Os camundongos tiveram livre acesso à ração e água sendo mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h) com temperatura variando entre 25 ± 2,0 ^{o}C.

3.2-Comitê de Ética:

Projeto de pesquisa submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob protocolo de nº 068/07.

3.3-Preparação do modelo experimental:

Neste trabalho utilizamos um modelo de diabetes já bem estabelecido na literatura que é o diabetes do tipo I induzido pela streptozotocina (Bolzán & Bianchi, 2002; Karabatas et al.,2005). Inicialmente foi realizado controle do peso e glicemia dos animais recém chegados do centro de bioterismo da UFMG. Após este controle inicial os animais, com 3 semanas de vida, foram tratados com injeção (i.p.) de streptozotocina (Sigma Aldrich) em dose única na concentração de 120mg/kg em tampão citrato 0,01 M, pH 5,0, com os animais em jejum de 12h. Após uma semana de tratamento, foi realizado novo controle de peso e glicemia com os animais em jejum de 12 horas. Caso estes não apresentem uma glicemia igual ou superior a 300 mg/dl foi realizada nova injeção de streptozotocina na mesma dose inicial. Os animais controles foram tratados com injeção única (i.p.) de 100µL de tampão citrato a 0,01 M, pH 5,0 e foram submetidos ao mesmo controle de peso e glicemia dos demais animais. Após 10 semanas de tratamento os animais foram novamente submetidos ao controle de peso e glicemia e foram sacrificados para a montagem dos vasos como descrito a seguir.

3.4-Montagem da aorta:

Os animais foram sacrificados por decapitação. Após esse procedimento, a aorta torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. O material biológico foi posteriormente transferido para uma placa de *Petri* contendo solução nutridora de *Krebs-Henseleit* (mM): NaCl 118.3, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $CaCl_2$ 2.5, $NaHCO_3$ 25.0 and glucose 11.1. A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Para obtenção do registro de tensão isométrica, esses anéis foram montados em cubas de 10 ml, contendo solução de Krebs-Henseleit, aerada continuamente com mistura carbogênica(95% O_2 e 5%CO_2) mantida à temperatura de 37 $\pm$ 1 °C e pH de 7,4. Duas hastes metálicas triangulares foram passadas através do lúmen do vaso. Um dos triângulos foi fixado, e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutridora foi trocada a cada 15 minutos, objetivando-se, dessa forma, evitar o acúmulo de metabólitos, como também à restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular.

Foram realizados teste de viabilidade vascular e endotelial com o estimulo dos anéis de aorta com Fen na concentração de $3x10^{-7}$ M e após a contração os mesmos foram estimulados com ACh 10^{-5} M. Os anéis de aorta que apresentaram um relaxamento superior a 70% da contração máxima á Fen foram considerados com endotélio funcional e os anéis que não apresentaram relaxamento diante do estímulo por ACh foram considerados desprovidos de endotélio funcional.

Os registros experimentais foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica, conectados a um amplificador, sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital. Utilizando-se o programa Windaq (Dataq) para aquisição e análise dos dados experimentais.

3.4.1-Avaliação do papel do endotélio e dos seus mediadores na resposta vascular.

Para testar a participação do endotélio no efeito relaxante, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas relaxantes com a acetilcolina (10^{-9}-10^{-3} M) nos vasos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina ($3x10^{-7}$ M). As curvas obtidas nos animais controles foram comparadas com os obtidos em animais diabéticos.

A eventual participação de mediadores endoteliais na contração vascular dos animais diabéticos foi avaliada através do seguinte protocolo. Curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas com a fenilefrina (10^{-9} - 10^{-4} M) na ausência e na presença de dois inibidores não seletivos de ciclooxigenase, indometacina (10μM) ou ibuprofeno (10μM) e do antagonista do receptor de endotelina, bosentano (10μM), em vasos contendo endotélio funcional. As curvas foram comparadas tanto nos animais controles como nos animais diabéticos. .

3.4.2-Papel da musculatura lisa no processo de contração vascular:

Para avaliação de possíveis alterações na funcionalidade da musculatura lisa vascular, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas com a fenilefrina (10^{-9}-10^{-4} M) nos vasos de animais controles e diabéticos, na presença e na ausência de endotélio funcional e as curvas foram comparadas entre si. A resposta contrátil induzida por despolarização também foi avaliada através da realização de curvas concentração-resposta cumulativas com KCl (10-100 mM), em vasos desprovidos de endotélio funcional.

3.4.3-Avaliação da participação das vias da proteína cinase C e PI3K na disfunção vascular no diabetes.

A participação de sistemas como o da PKC e da PI3K na função vascular foi avaliada através da construção de curvas concentração-resposta cumulativas com a fenilefrina (10^{-9}-10^{-4} M) na ausência ou presença de: calphostin-C (1μM; inibidor da PKC) e wortimannim (0,3 μM) e LY294002 (20 μM), inibidores inespecíficos das isoformas da PI3K, AS 605240 (10μM) e IC 87114 (10μM) (inibidores respectivos das isoformas gamma e delta, da PI3K)

em segmentos de vasos desprovidos de endotélio funcional. As curvas foram, em seguida, comparadas.

3.5-Avaliação de aspectos morfológicos da musculatura lisa vascular em anéis de aorta.

Aortas de camundongo foram dissecadas, cortadas em anéis e imersas em solução de paraformaldeido a 4%, por 6hs. Após este período, os segmentos de aorta foram fixados, desidratados através de solução de etanol(70-100%), incluídos em parafina e seccionados em cortes no plano transversal de 6 μm. Finalmente, os cortes da aorta foram corados com hematoxilina e eosina para análise da camada muscular lisa vascular. Foram avaliados a espessura da camada média da musculatura lisa vascular para a possível caracterização de hipertrofia e o número de células musculares por campo para a caracterização de possível ocorrência de hiperplasia vascular.

3.6-Determinação da expressão protéica das diferentes isoformas de PI3K (α, β, γ, δ) por Western blot.

Os tecidos congelados foram preparados em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão de lise (Gyorke) acrescido de 0,1% de nonidet P40, 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e um coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). Foi utilizado um inibidor de fosfatases (NaF 20 mM) para a determinação das proteínas fosforiladas. Foi utilizada a proporção de 25 mg de tecido para 100 μl de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 3584 g por 10 minutos. O sobrenadante foi aliquotado e congelado a -70ºC para posterior utilização. A concentração de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1954).

Posteriormente, as amostras foram diluídas em tampão da amostra (4Xtris HCl/SDS pH=6,8-3% glicerol, 1% SDS, 0,6% β-mercaptoetanol, azul de bromofenol). Para separação, foram aplicados 60 μg de proteína em gel de SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio e gel de poliacrilamida na concentração de 7,5% ou 10%). Após serem separadas em gel, as proteínas foram

transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore®, USA) com poro de 0,45 µm. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi, então, lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% com 2,5% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria (6-8ºC) com o anticorpo primário específico. Os seguintes anticorpos primários forão utilizados: PI3K p110α; PI3K p110γ; PI3K p110δ, PI3K p110β(1:200 para todas isoformas), - Santa Cruz, CA, EUA. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:2000 para todas as isoformas), anti-cabra IgG-HRP e anti-coelho IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA). Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas protéicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitomérica através do software ImageQuant ™. Foi utilizado o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, ambos da BIO-RAD (CA, USA).

3.7-Silenciamento *in vivo* da PI3-kinase p110δ

Para silenciar a isoforma da PI3K p110δ**,** nós utilizamos a técnica de oligodeoxinucleotídeos antisense (AS-ODNs) fosforosulfatados (fosforotiolados) nas 21 bases, construído com base na sequência para as isoformas do camundongo. Camundongos machos C57Bl/6J, com idade de 13 semanas receberam 2 nmoles dos AS-ODNs ou ou 2 nmoles de uma sequência obtida a partir da adição aleatória dos ODNs,-MM-ODN (controle negativo) através da veia peniana 12 hs, antes dos experimentos conforme descrito pelo nosso grupo (Capettini et. al. 2008). A eficiência dos aODNs em bloquear a expressão e a ação da PI3K p110δ foi avaliada por Western blot e por ensaios funcionais.

Nós utilizamos a seguinte seqüência: (5'-TAG.GCA.CCT.GCA.GAT. GTA.CTG-3') acessada no banco genético pelo número NM-008840.2 adquirida da Eurogentech North America Inc. (San Diego, CA, USA) específica para inibir a ação PI3K p110δ. ODNs ineficazes em alterar a expressão proteica (MM-

ODNs), possuindo a seguinte composição de bases 5'-CCT.TCG.TAC.CCT.TTT.TCC-3' foram utilizados como controle negativo.

3.8-Análises estatísticas e expressão dos resultados:

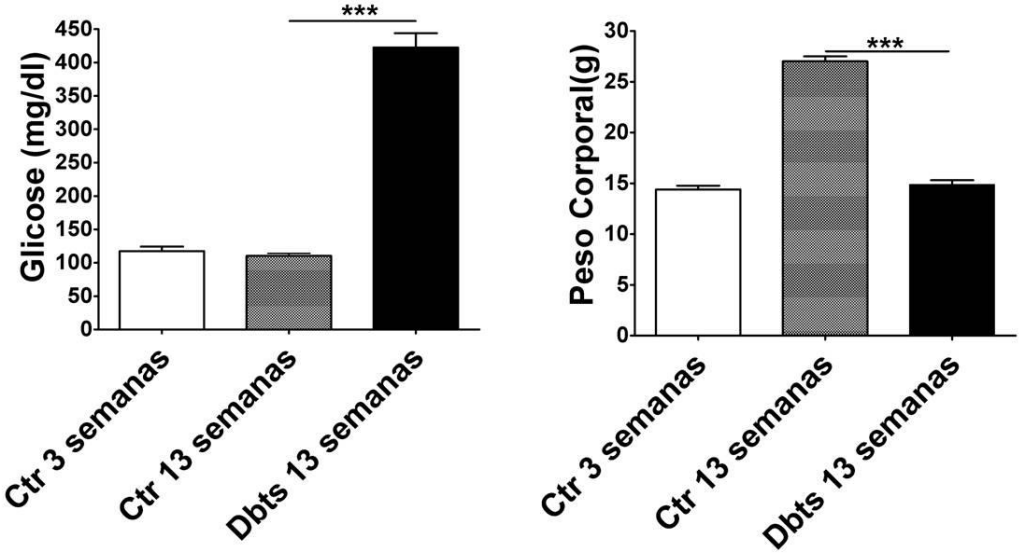
Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0. Os dados de contração vascular representam o percentual da contração em reposta a fenilefrina. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo BONFERRONI. A análise estatística referente as áreas sob a curvas concentração-resposta cumulativas, Western blot e histologia foi realizada pelo teste t. Todos os resultados foram expressos como média ± EPM e considerados significativos os valores de $p<0,05$.

RESULTADOS

4-RESULTADOS

4.1-Alterações de glicose e peso corporal que caracterizam nosso modelo.

Nossos animais diabéticos apresentaram um valor de glicemia em torno de 422,6±21,4 mg/dl após 10 semanas da injeção de STZ enquanto os animais controles apresentaram uma glicemia em torno de 110,3±3,6mg/dl como mostra o gráfico da figura 6A. O peso dos animais diabéticos apresentou um valor bastante reduzido 14,87±0,4g em relação aos animais controles 27,03±0,4g conforme demonstrado no gráfico da figura 6B após 10 semanas da injeção de STZ.



Fígura 6: Peso e glicemia dos animais diabéticos(Dbts) comparados com os animais controles(Ctr). Em (A) podemos observar que a glicemia dos animais diabéticos (Dbt; em preto) está significativamente aumentada após 10 semanas da injeção da STZ, ou seja, na 13 semana de vida, quando comparados aos animais controles (Ctr, em cinza), de mesma idade. Em (B) é representado a diferença de peso corporal dos animais diabéticos em relação aos animais controles após 10 semanas da aplicação da STZ. Os dados são expressos como média±EPM. ***p<0,001

4.2-A resposta contrátil na aorta dos animais diabéticos esta aumentada

Os animais diabéticos não apresentaram diferença na resposta vasodilatadora induzida pela ACh em relação aos animais controles (figura 7A), sugerindo uma ausência de disfunção endotelial. Entretanto, a resposta contrátil à fenilefrina na aorta dos animais diabéticos foi drasticamente

aumentada em relação aos animais controles tanto, em segmentos de vasos contendo endotélio funcional quanto em anéis desprovidos de endotélio funcional (figura 7B), sugerindo a ausência de participação do endotélio neste aumento da resposta contrátil. Para dar suporte a esta hipótese, investigamos também duas importantes vias envolvidas na contração vascular dependente do endotélio: a via das ciclooxigenases (COX) e a via da endotelina. Dois inibidores não-seletivos de COX, a indometacina (10µm; figura 7C) e o ibuprofeno (10µM; figura7D), não alteraram o padrão da resposta contrátil dos animais diabéticos. Além disso, o antagonista do receptor de endotelinas, o bosentano (10µM; figura 7E) não foi capaz de restaurar o padrão da resposta contrátil dos animais diabéticos para o nível dos animais controles. Juntos estes resultados mostram que a participação do endotélio no aumento da resposta contrátil induzida pela fenilefrina era pouco provável.

O próximo passo foi avaliar se este aumento deveu-se a um aumento na sensibilidade dos receptores α-adrenérgicos da fenilefrina ou alterações estruturais e/ou funcionais da musculatura lisa vascular. Nossos resultados mostram que a resposta contrátil ao KCl foi também muito maior nos animais diabéticos quando comparados ao controle (figura 7F). Em síntese os resultados acima apontam para uma provável disfunção na célula muscular lisa da aorta dos camundongos diabéticos.

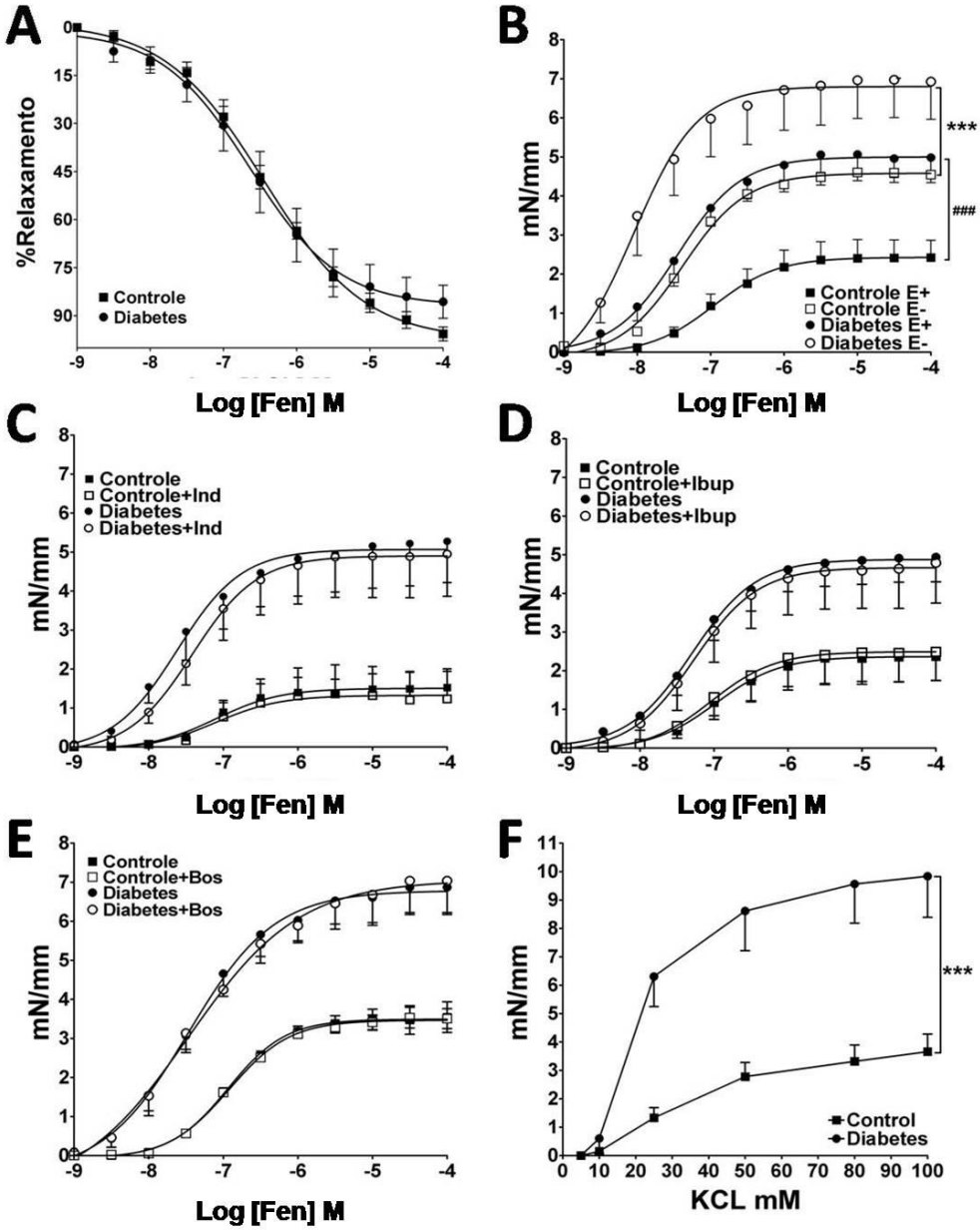


Figura 7. Curva concentração resposta para acetilcolina (ACh), fenilefrina(Fen) e KCl em anéis de aorta de animais diabéticos e controles..Os dados representam a media ± EPM de pelo menos cinco experimentos realizados de forma independentes (n=5-7 animais). (**A**) Curva concentração resposta para ACh em anéis de aorta com endotélio funcional de animais diabéticos e controles (**B**) resposta contrátil à Fenilefrina (Fen) em anéis de aorta com endotélio funcional (E+) ou desprovidos de endotélio funcional (E-) ***p<0.001 (**C**) curva concentração resposta para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio funcional na presença de indometacina (10μM) ou (**D**) Ibuprofeno (10μM), ambos inibidores da ciclooxigenase ou (**E**) bosentano (10μM), um antagonista de receptor de endotelina-1. (**F**) Curva concentração resposta de KCl em anéis de aorta desprovidos de endotélio funcional, mostrando um aumento da resposta contrátil da aorta dos animais diabético.***p<0.001.

4.3-Análise morfológica

Diante de resultados que apontam para possíveis alterações na musculatura lisa vascular, o primeiro ponto a ser investigado foi a possibilidade de alterações morfológicas que pudessem justificar o aumento da resposta contrátil tanto à fenilefrina quanto ao KCl. Os estudos morfológicos mostraram que a aorta dos animais diabéticos possuem uma pequena redução na espessura da camada média (figura 8B e C) e do número de células por campo (figura 8B e D) dos animais diabéticos, em relação aos controles(figura 8A). Estas alterações não caracterizam nenhuma hipertrofia e/ou hiperplasia da musculatura lisa da aorta que possa justificar as alterações contráteis observadas nos animais diabéticos.

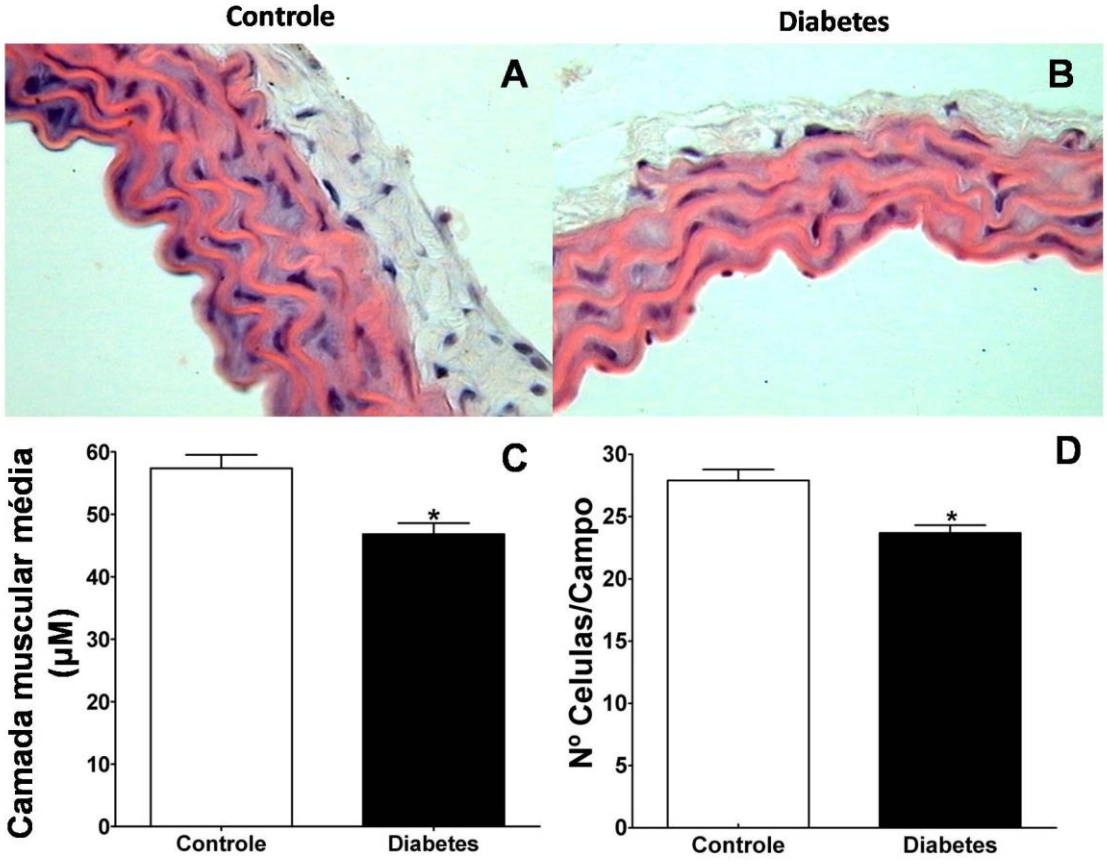


Figura 8. Análise morfológica da camada média dos anéis de aorta dos animais diabéticos e controles. Espessura da camada média e número de células por campo da aorta dos animais controles (**A**) e diabéticos **(B)**. Gráfico da diferença **(C)** da espessura da camada média e **(D)** do número de células por campo entre os animais controles e diabéticos. Dados são representados como média ± EPM de 6-7 experimentos realizados independentemente com um total de 5 animais (em cada grupo); *p<0.05. Barras representativas na figura = 10 μm

4.4-Participações de cinases no aumento resposta contrátil do animal diabético.

Diversas cinases são conhecidas por suas ações modulatórias sobre a musculatura lisa vascular. Dentre estas, a Proteína Cinase C (PKC) é bem conhecida em modular a atividade musculatura lisa vascular (Crozatier et al, ANO). No entanto, o calphostin C, um inibidor da PKC, não modificou o padrão da resposta contrátil da aorta induzida pela fenilefrina (figura 9) tanto do animal controle quanto do animal diabético, mas inibiu as contrações induzidas pelo éster de forbol um conhecido ativador da PKC (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que a PKC não está envolvida no controle da contratilidade da aorta de camundongo.

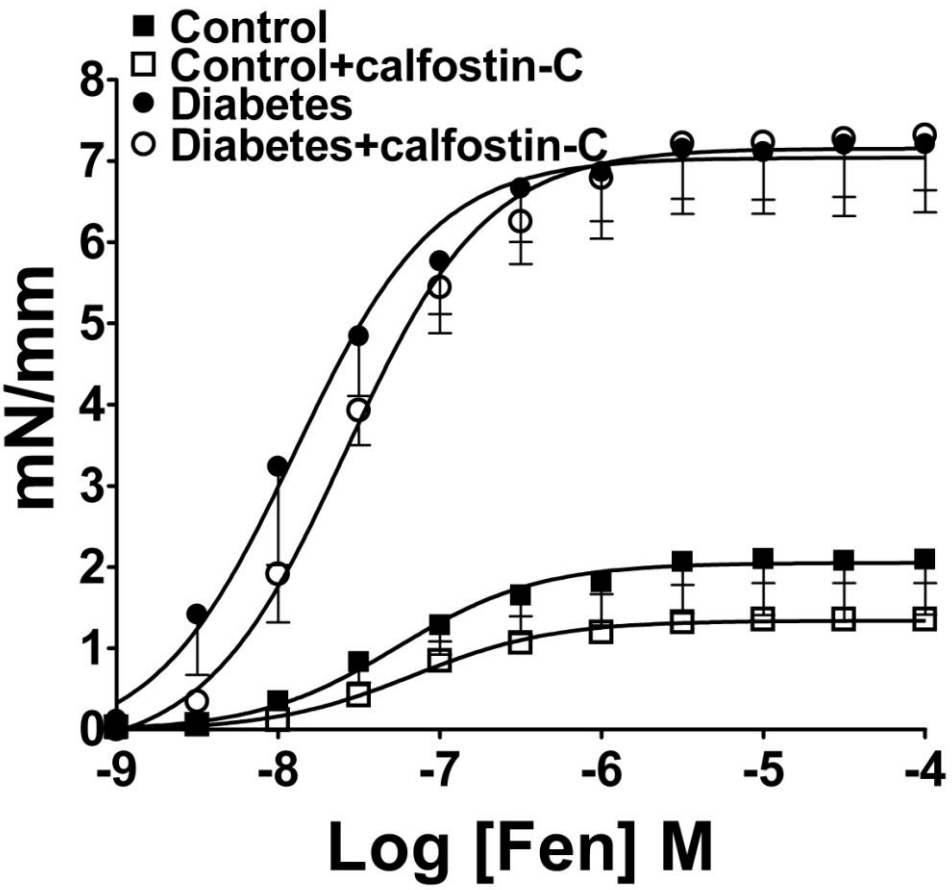


Figura 9: Curvas concentração-resposta cumulativas em resposta a fenilefrina (Fen) na presença e na ausência de calfostin C um inibidor da PKC. Não se observa nenhuma alteração da resposta contrátil tanto do animal diabético quanto o animal controle na presença deste inibidor. Os dados representam a media ± EPM de pelo menos cinco experimentos realizados de forma independentes (n=5 animais)

A seguir avaliamos a participação da PI3K no aumento da resposta contrátil observada do animal diabético. Para tal, utilizamos inicialmente ferramentas farmacológicas como o LY204002 (20µM) e o wortimannim (0,3µM) que são ambos inibidores não-seletivos da PI3K. Tanto o LY204002 (figura 10A e B) quanto o wortimannim (figura 10 C e D) foram capazes de reduzir a resposta contrátil induzida pela fenilefrina tanto nos animais diabéticos quanto dos animais controles. Os gráficos que representam os deltas das áreas sob as curvas da fenilefrina (figura 10 B e D) mostram que os efeitos inibitórios do LY204002 e do wortimannim são maiores nos anéis de aorta do animal diabético em relação ao controle. Estes dados sugerem, portanto, que a PI3K possui um papel fisiológico sobre a resposta contrátil da musculatura lisa vascular da aorta de camundongo e que tem uma participação no aumento da resposta contrátil encontrada nos animais diabéticos.

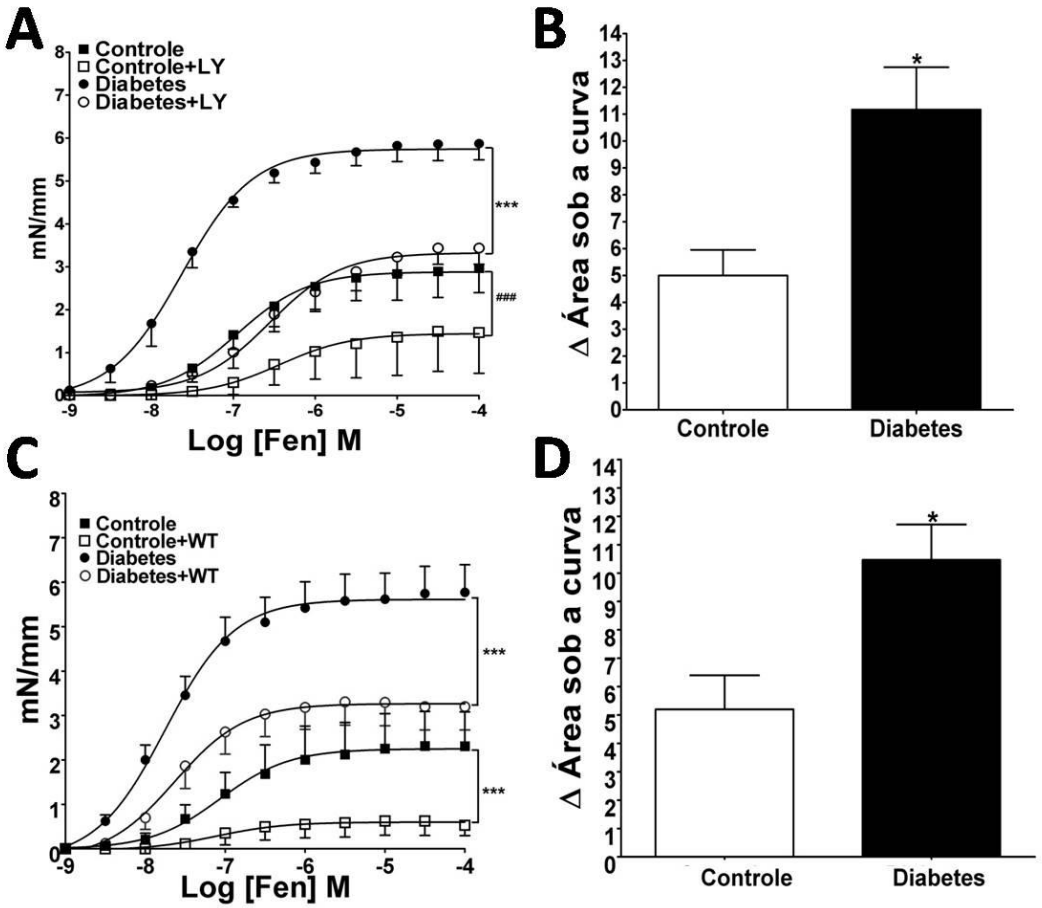


Figura. 10: (A e C) Curvas concentração-resposta cumulativas em resposta a Fenilefrina (Fen). Diabetes versus diabetes+LY ***p<0.001 e controle versus controle+LY $^{###}$p<0.001. **(B e D)** Cálculo da diferença entre os (∆) das áreas sob as curvas concentração resposta na presença dos inibidores da PI3K, LY 294002 (20 µM) e wortimannim (0,3 µM) em anéis de aorta de

animais diabéticos e controles; *p<0.05.Os dados representam a media ± EPM de pelo menos cinco experimentos realizados de forma independentes (n=5 animais).

Uma vez caracterizada a participação da PI3K no aumento da resposta contrátil do animal diabético nós realizamos análise da expressão protéica das isoformas da PI3Ks por Western blot na aorta destes animais, onde pudemos observar um aumento da expressão da isoforma delta (figura 11A) na aorta do animal diabético enquanto as outras isoforma mostraram-se inalteradas ou discretamente reduzidas (figura 11 B, C e D).

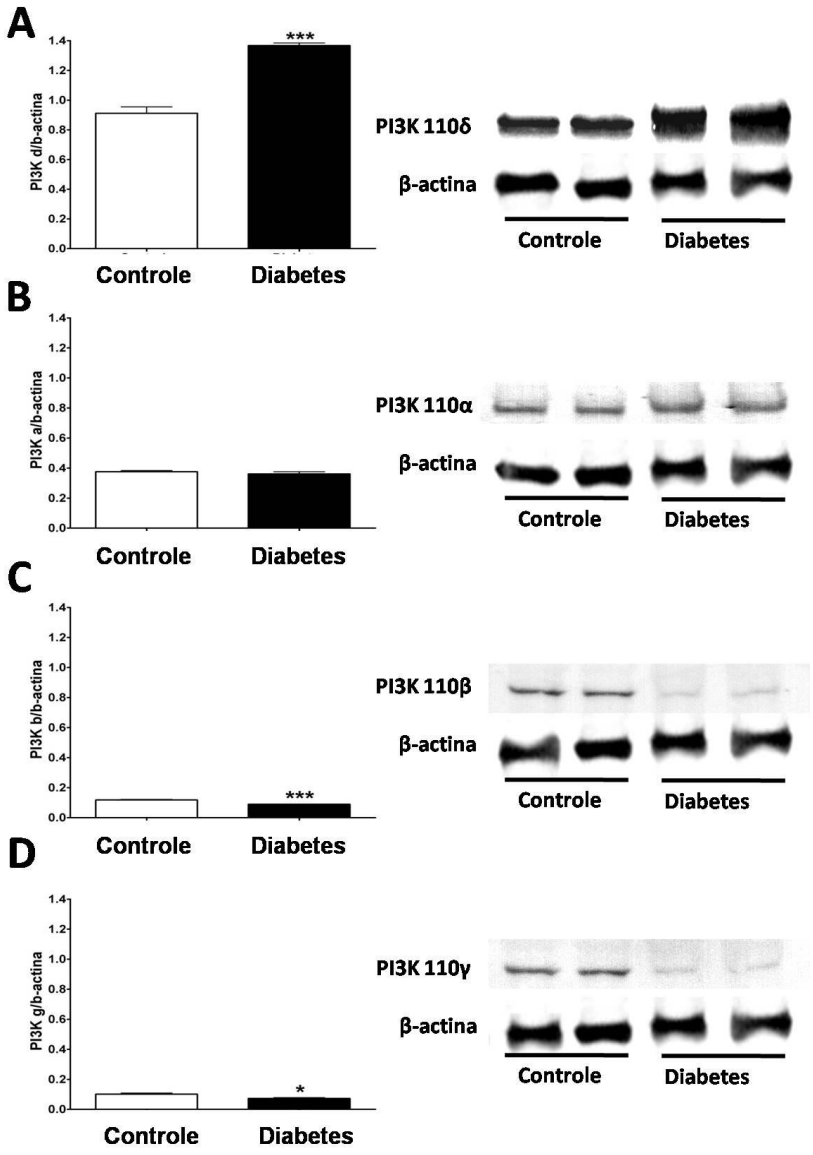


Figura.11 Análise da expressão das isoformas das PI3Ks por Western blot da aorta dos animais controles e diabéticos. Na esquerda são mostrados os valores médios ± EPM de 3 diferentes experimentos realizados com 15 animais e na direita são mostrados géis representativos Resultados foram normalizados

por β-actina. **(A)** PI3Kδ; **(B)** PI3Kα; **(C)** PI3Kβ e **(D)** PI3Kγ ***p<0.001 e *p<0.05.

Para confirmar a participação da isoforma δ da PI3K na alteração contrátil no nosso modelo nós utilizamos o IC87114, um inibidor seletivo desta isoforma. Conforme mostra a figura 12, o IC87114 (10 μM) que foi capaz de restaurar a resposta contrátil induzida pela fenilefrina no animal diabético a níveis encontrados no animal controle. Estes resultados apontam para um importante papel da PI3Kδ na patofisiologia da doença vascular do camundongo diabético induzido por STZ.

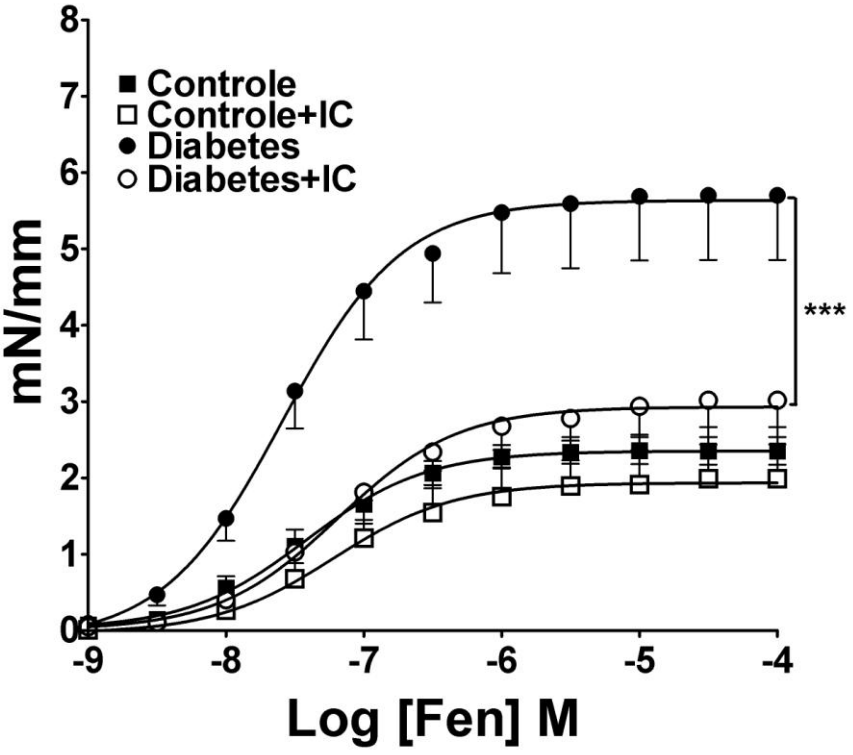


Figura 12: Curvas concentração resposta para Fenilefrina (Fen) na presença de IC87114 (10μM), inibidor seletivo da isoforma delta da PI3K. Diabetes versus diabetes+IC ***p<0.001. Os dados representam a media ± EPM de pelo menos 8-9 experimentos realizados de forma independentes (n=8-9 animais)

Um importante suporte para a hipótese acima foi conseguido pela realização do bloqueio da expressão da PI3Kδ através da técnica de oligodeoxinucleotideos antisense (AS-ODN) *in vivo.* A eficiência do antisense em bloquear a expressão da PI3Kδ foi avaliada por Western blot (figura 13) e

por experimentos de reatividade vascular (figura 14 A e B). O mais baixo nível de expressão protéica para a isoforma δ da PI3K (86% de redução no animal controle e 90% no animal diabético) foi conseguido após 12h da injeção do antisense. O tratamento com uma seqüência aleatória não especifica para PI3K (MM-ODN) não teve efeito (figura 13). A aplicação do antisense não alterou a expressão das demais isoformas da PI3Ks (Figura 15)

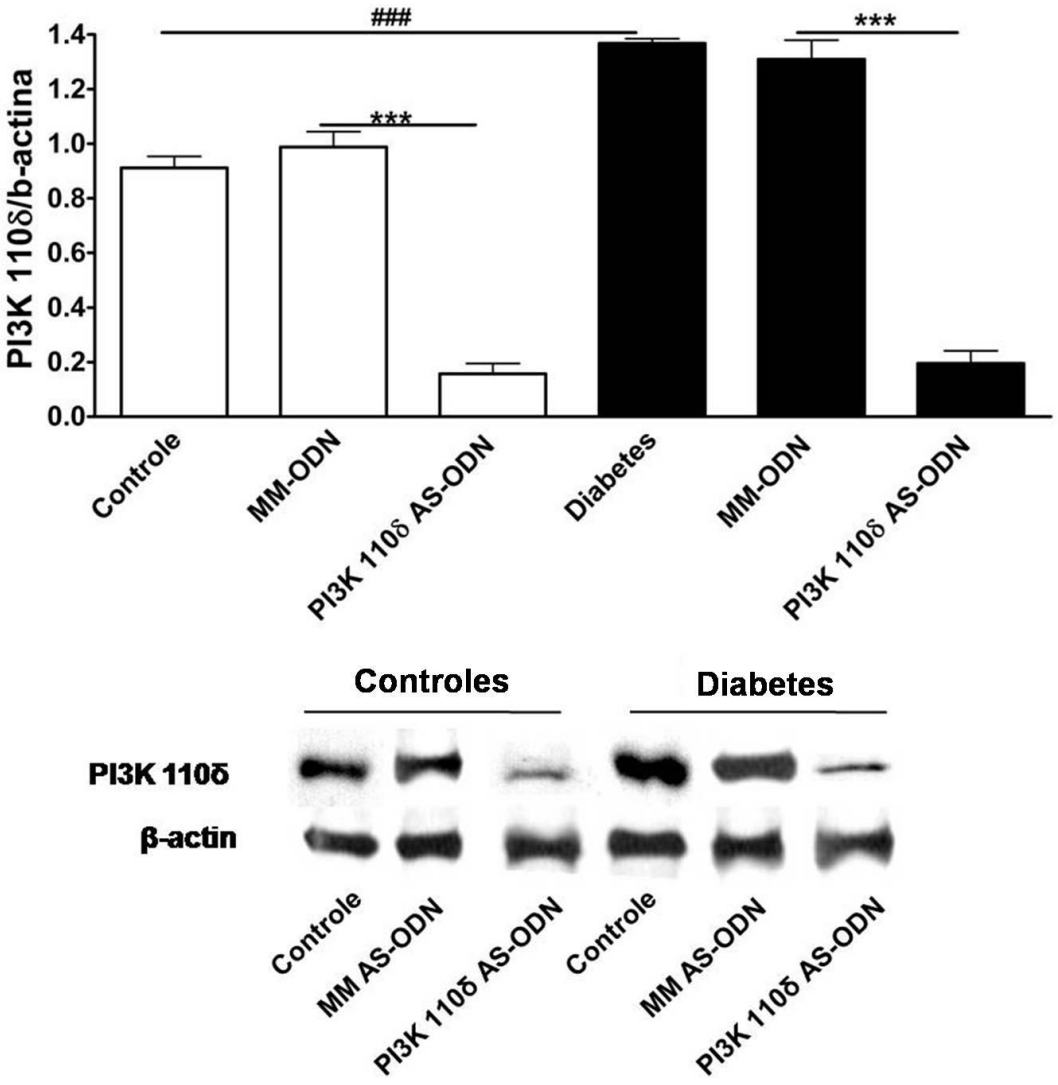


Figura 13: Análise da eficiência AS-ODN em bloquear a expressão da PI3kδ por Western blot na aortas dos animais controles e diabéticos. Controle versus diabetes $^{###}p<0.001$, controle MM-ODN versus controle AS-ODN e diabetes MM-ODN versus diabetes AS-ODN ***p<0.001. Na esquerda são mostrados os valores médios ± EPM de 3 diferentes experimentos realizados com 15 animais e na direita são mostrados géis representativos.

Foi observado nos experimentos de reatividade vascular que o antisense foi capaz de prevenir o aumento da resposta contrátil na aorta do animal diabético na mesma proporção que o inibidor farmacológico da PI3Kδ, IC87114 (figura 14A). O antisense também foi capaz de prevenir a resposta contrátil aumentada por estímulo despolarizante com o KCl (figura 14B). Este conjunto de dados nos fornece evidências substanciais de que a via de sinalização da PI3Kδ está aumentada na aorta do animal diabético e isto claramente esta envolvida com o aumento da resposta contrátil observada nestes animais.

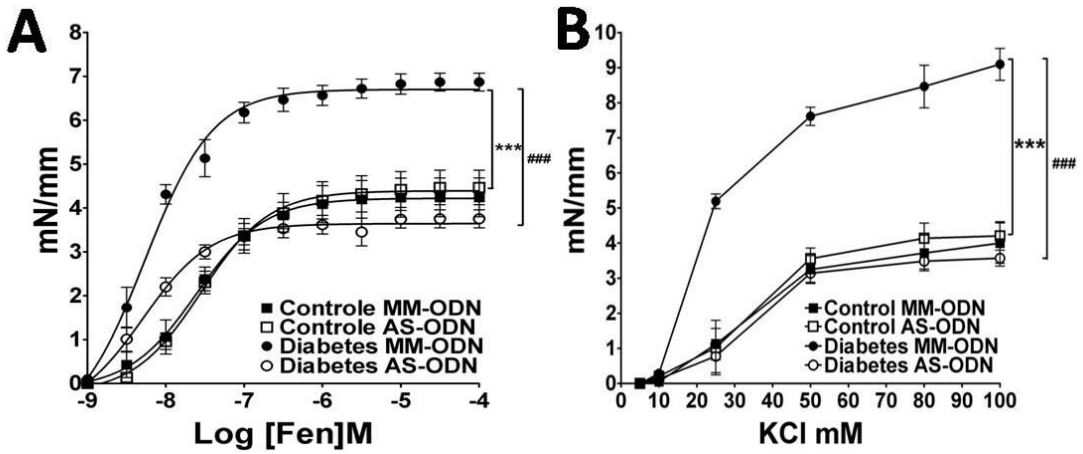


Figura 14: Curva concentração resposta para fenilefrina(Fen) e KCl em anéis de aorta de animais diabéticos e controles na presença de AS-ODN ou MM-ODM. (A) Efeito do AS-ODN e MM-ODN na curva concentração resposta de fenilefrina em anéis de aorta dos animais diabéticos e controle. Controle MM-ODN versus diabetes MM-ODN ***p<0,001 e diabetes MM-ODN versus diabetes AS-ODN $^{###}$p<0,001. **(B)** Resposta contrátil ao KCl em anéis de aorta desprovidas de endotélio funcional de animais diabéticos e controles Diabetes MM-ODN versus controle MM-ODN ***p<0,001 e diabetes MM-ODN versus diabetes AS-ODN $^{###}$p<0,001 Os dados representam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos realizados de forma independentes (n=5 animais)

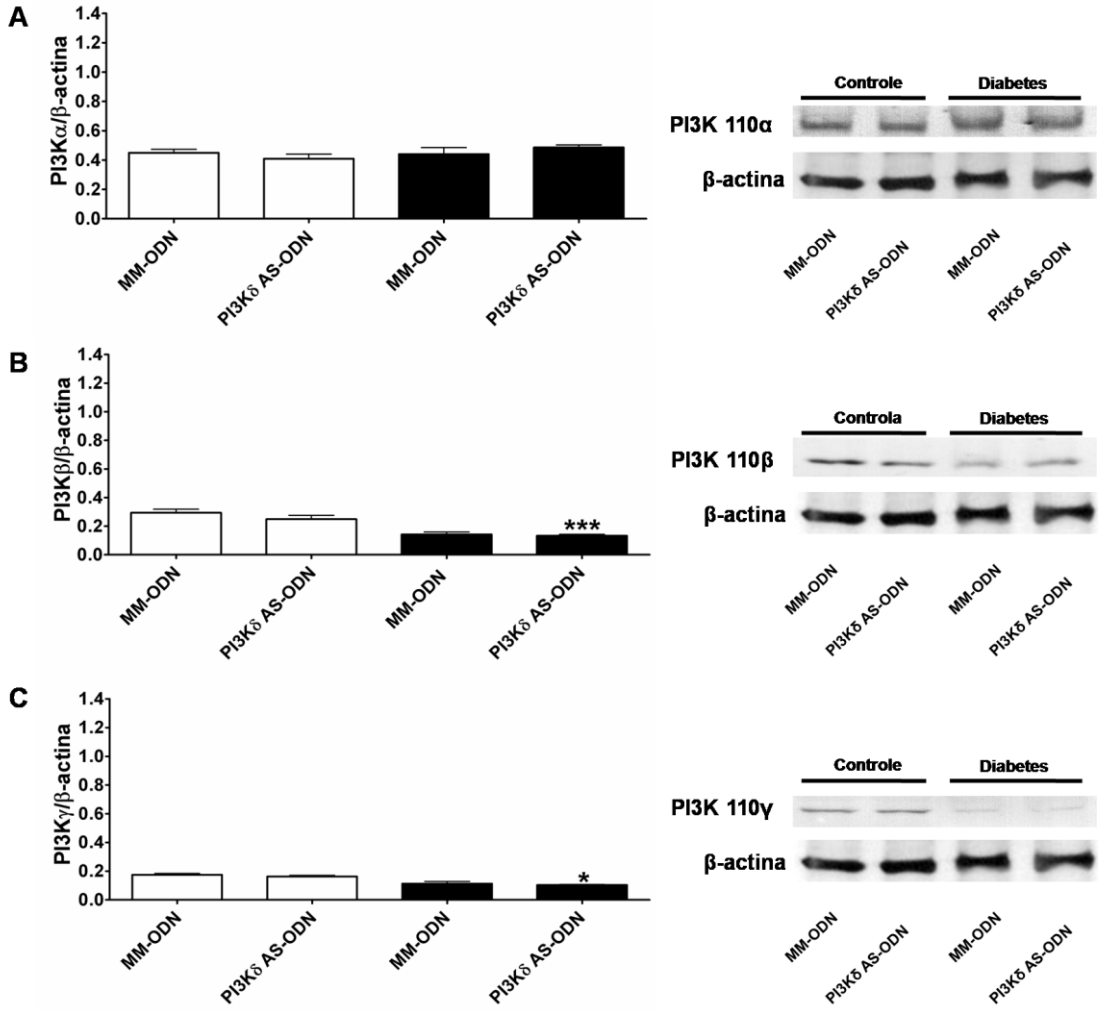


Figura 15 Análise da influência da aplicação de AS-ODN para PI3K δ sobre a expressão protéica das outras isoformas da PI3K. Após o tratamento dos animais com AS-ODN para PI3K δ não foi observada alterações na expressão das demais isoformas da PI3K **(A)** PI3Kα; **(B)** PI3Kβ e **(C)** PI3Kγ respectivamente. Na esquerda são mostrados os valores médios ± EPM de 3 diferentes experimentos realizados com 15 animais e na direita são mostrados géis representativos Resultados foram normalizados por β-actina. Controle AS-ODN versus diabetes AS-ODN *p<0,01, Controle AS-ODN versus diabetes AS-ODN ***p<0,001

DISCUSSÃO

5-DISCUSSÃO

O principal resultado encontrado neste trabalho foi a participação da via de sinalização da PI3Kδ no aumento da resposta contrátil na aorta do animal com diabetes tipo I.

Alterações macro e micro vasculares representam a principal causa de morte entre os pacientes portadores de diabetes tanto do tipo I quanto do tipo II. (Daneman, 2006, Nuzum et al., 2009; Di Marzio et al., 2006; Orasanu et al., 2009; Eckel et al., 2002). Uma resposta vascular anormal pode ser devido tanto a uma diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, quanto de alterações da funcionalidade da musculatura lisa vascular. Estes tipos de alterações já foram relatados em diferentes leitos vasculares de diferentes modelos animais de diabetes e também um humanos (Matsumoto et al., 2003, 2004; Kamata et al., 1988, 1889)

Nós mostramos neste trabalho que a resposta contrátil a fenilefrina e ao KCl da aorta do camundongo diabético induzido por streptozotocina apresentou um aumento bastante expressivo na reposta contrátil comparado aos animais controles. A compreensão dos mecanismos envolvidos nesta resposta contrátil aumentada é crucial uma vez que ela pode piorar ainda mais a função cardíaca do diabético que frequentemente apresenta-se comprometida, contribuindo desta forma para o aumento da mortalidade destes pacientes.

O aumento do tônus vascular no diabetes como já citado anteriormente pode ser secundário a uma resposta anormal da musculatura lisa vascular (Kamata et al., 1988; Taylor et al., 1994) ou do endotélio vascular (Hattori et al., 1991; Pieper et al., 1992, 1997; Tesfamariam, 1994; Keaney & Vita, 1995). Os resultados apresentados aqui neste trabalho mostram que o aumento da resposta contrátil observado na aorta dos nossos camundongos não é decorrente de nenhuma alteração da função do endotélio vascular. As seguintes observações experimentais suportam a hipótese acima: 1) não foi observada nenhuma alteração da resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina nos animais diabéticos em relação ao controle; 2) A resposta contrátil aumentada dos animais diabéticos se manteve mesmo após a remoção da camada de células endoteliais da aorta; 3) O uso de inibidores de

fatores contráteis derivados do endotélio como prostaglandinas ou endotelina não foram capazes de reverter o padrão da resposta contrátil dos animais diabéticos.

A resposta contrátil aumentada associada ao diabetes foi relatada na literatura (Okon et al., 2003, Taylor et al., 1994, White & Carrier, 1990, Kamata et al., 1988;). No entanto, outros trabalhos mostram uma diminuição da resposta contrátil (Cameron & Cotter et al., 1992). Além disso, alguns trabalhos mostram que o aumento da resposta contrátil no diabetes pode ser consequência do aumento da produção de fatores contráteis derivados do endotélio (Bagi et al, 2005; Quilley & Chen, 2003) ou de uma vasodilatação deficiente (Ding et al, 2005; Kobayashi, 2005). Estes resultados aparentemente contraditórios da literatura são, provavelmente, devido a diferentes modelos de diabetes utilizados, assim como diferentes leitos vasculares empregados no estudo e a duração do diabetes.

Afastada a possibilidade de alterações de origem endotelial, a possibilidade de alterações morfológicas da musculatura lisa vascular foi estudada. No entanto, os animais não mostraram qualquer hipertrofia e/ou hiperplasia que justificasse um aumento da contratilidade da musculatura lisa vascular. A discreta redução da espessura da camada média e do número de células da musculatura lisa vascular dos animais diabéticos pode ser explicada pela característica do animal diabético que possui um peso corporal que é praticamente metade do peso do animal controle. Diante de mais esta evidência, nossos resultados apontam para um problema na funcionalidade da célula muscular lisa vascular.

Um número crescente de trabalhos têm mostrado a participação da via de sinalização da PI3K no controle da resposta contrátil em diversos modelos (Vecchione et al., 2005). Dessa forma, uma série de experimentos foram feitos com o objetivo de investigar o papel da PI3K na disfunção contrátil do nosso modelo.

Dois inibidores da PI3K, o LY294002 e o wortimannim, diminuíram a resposta contrátil induzida pela fenilefrina tanto no animal diabético quanto no animal controle, indicando que a PI3K tem um papel importante na vasoconstrição induzida por agonista α_1 adrenérgico. Estes dois inibidores produziram uma inibição da resposta contrátil muito maior sobre o animal

diabético como foi mostrado nos gráficos que representam a diferença das áreas sob as curvas concentração resposta para fenilefrina. Este efeito inibitório maior sobre os animais diabéticos sugere que, de certa forma, a PI3K tem um atividade superior no controle da resposta contrátil no animal diabético. O inibidor seletivo para isoforma δ da PI3K, IC87114 foi capaz de normalizar a resposta contrátil da aorta dos animais diabéticos. Estes dados foram posteriormente confirmados com a utilização do bloqueio *in vivo* da expressão da PI3Kδ pela técnica de oligodesoxinucleotídeos antisense onde os animais diabéticos tratados com o antisense apresentaram um nível de resposta contrátil à fenilefrina exatamente igual ao animal controle. Portanto, o conjunto dos nossos resultados mostram claramente que a isoforma δ da PI3K está envolvida no aumento da resposta contrátil da aorta neste modelo de diabetes induzido por STZ.

O bloqueio da expressão da PI3K δ também normalizou a resposta contrátil ao KCl. Como o KCl promove o estímulo da resposta contrátil por despolarizar a membrana celular e promover influxo de Ca^{2+} por canais dependentes de voltagem, podemos sugerir um possível envolvimento destes tipos de canais para Ca^{2+} no aumento da resposta contrátil do animal diabético com o envolvimento da PI3kδ. No entanto, estudos mais adequados utilizando a técnica de eletrofisiologia são necessários para confirmar esta hipótese.

É bem estabelecido que o único membro da classe IB das PI3K, PI3Kγ é ativado por receptores acoplados a proteína G (GPCRs), e a classe IA representada pelas PI3kα, β, δ, são ativados classicamente por receptores tirosina cinase (Foster et al., 2003, Cantley, 2002; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999). No entanto, esta forma de classificação das PI3Ks vem sofrendo questionamento uma vez que foi descrito que a PI3Kβ (Maier et al., 1999; Kurosu et al., 1997), mas não a α (Maier et al., 1999; Kurosu et al., 1997) ou a δ (Maier et al., 1999) pode ser diretamente ativada pela subunidade G $\beta\gamma$ *in vitro*. Então, como explicar a ativação da PI3Kδ através de um receptor α_1 adrenérgico? É consenso na literatura que agonistas que atuam através de GPCRs são também capazes de ativar tirosina cinases (Daub et al., 1996; Luttrell et al., 1996; Rakotoarisoa et al., 2006). Consistente com estes dados, Hu et al. (1996) mostraram que a estimulação do receptor α_1 adrenérgico ativa

a PI3K em células musculares lisas de vasos humanos e que este estímulo está associado a um aumento da atividade da Ras-GTP e indução da fosforilação da tirosina cinase. Isto poderia, então, explicar como o estimulo do receptor α_1 adrenérgico está acoplado com a ativação da PI3Kδ.

Uma possível explicação para o fato da via da PI3Kδ estar mais ativa no animal diabético em relação ao controle poderia ser um aumento na sua expressão protéica. Os nossos dados de Western blot mostram que a aorta de camundongo expressa, principalmente, a isoforma de PI3Kδ e apenas uma quantidade muito pequena de α, β e γ. A subunidade catalítica p110δ foi a única que teve a sua expressão aumentada. A expressão da isoforma α não foi alterada e as isoformas β e γ apresentaram uma discreta redução de expressão. Estes resultados, vão no mesmo sentido dos publicados por Northcott et al (2002, 2004, 2005) que mostraram que a aorta de ratos espontaneamente hipertensos, DOCA-sal e L-NNA hipertensos apresentaram um aumento da expressão de PI3Kδ e que este aumento de expressão está relacionado ao aumento do tônus espontâneo apresentado nestes modelos de hipertensão.

A razão pela qual há uma redução das isoformas β e γ não é clara e merece futuras investigações. No entanto, fica claro que estas isoformas não estão envolvidas no aumento da resposta contrátil observada no animal diabético.

Em suma, os nossos resultados mostram claramente que a isoforma δ da PI3K está diretamente envolvida com o aumento da resposta contrátil na aorta do animal diabético. Tendo em vista que a inibição seletiva da PI3Kδ parece ser altamente eficaz em bloquear o aumento de contratilidade vascular no diabetes tipo 1, a PI3Kδ pode representar um novo alvo terapêutico para expandir as estratégias terapêuticas para o tratamento de desordens vasculares que representam a principal causa de morte entre os pacientes portadores de diabetes.

CONCLUSÃO

6-CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1) A aorta de animais diabéticos tipo I induzida por estreptozotocina apresenta uma disfunção vascular caracterizada por aumento da contratilidade, em resposta a estimulação de receptores acoplados a proteína G ou por despolarização.

2) O aumento da contratilidade não é decorrente de disfunções endoteliais ou alterações morfológicas como hipertrofia ou hiperplasia da camada média, mas sim, por um problema na funcionalidade das células musculares lisas vasculares.

3) A PKC não está envolvida no aumento de contratilidade vascular do animal diabético

4) A PI3Kδ, mas não a PI3Kα, a PI3Kβ e a PI3Kγ, encontra-se superexpressa na aorta dos animais diabéticos;

5) A isoforma δ da PI3K está diretamente envolvida com o aumento da resposta contrátil na aorta do animal diabético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akata T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone.Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth* v.21, p.232–242. 2007.

2. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. v.357, p.593–615. 2001.

3. American Diabetes Association (A.D.A.) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v.29, Sup. 1. 2006.

4. American Diabetes Association. "All About Diabetes" 2009. http://www.diabetes.org/about-diabetes.jsp

5. Anderson R.A., Boronenkov I.V., Doughman S.D., Kunz J. & Loijens J.C. Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *J Biol Chem*. v.274, p.9907–9910. 1999.

6. Arias E., Anderson R.N., Hsiang-Ching K, Murphy S.L., Kochanek K.D. Deaths: final data for 2001. *National Vital Statistics Reports*. v.52. 2003.

7. Arikawa E., Verma S., Dumont A.S. & McNeill J.H. Chronic bosentan treatment improves renal artery vascular function in diabetes. *J Hypertens*. v.19, p.803–812. 2001.

8. Bagi Z, Erdei N., Toth A., Li W., Hintze T.H., Koller A. & Kaley G. Type 2 Diabetic Mice Have Increased Arteriolar Tone and Blood Pressure. Enhanced Release of Cox-2-Derived Constrictor Prostaglandins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v.25, p.1610-1616. 2005.

9. Bertoluci M.C., Vissoky Cé G., Silva A.M.V., Puñales M.K.C. Endothelial Dysfunction in Type 1 Diabetes. *Arq Bras Endrocrinol Metab.* v.52, p.2. 2008.

10. Bohr D. F., Dominiczak A. F & Webb R. C.. Pathophysiology of the vasculature in hypertension*. Hypertension*. v.18, p.69-75. 1991.

11. Bolzán A.D., Bianchi M.S. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research, V.*512, p. 121–134. 2002.

12. Boyle J.P., Honeycutt A.A., Narayan K.M., Hoerger T.J., Geiss L.S., Chen H., Thompson T.J. Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *Diabetes Care.* v.24, p.1936–1940. 2001.

13. Cameron N. E. & Cotter M. A. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia*. v.35, p.1011–1019. 1992.

14. Cantley L.C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science.* v.296, p.1655. 2002.

15. Cantrell D.A. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *J.Cell.Sci*. v.114, p.1439–1445. 2000.

16. Capettini, L. S. A.; Cortes S. F., Gomes M. A.; Silva G.A.B., Pesqueiro J.L.,. Lopes M.J, Teixeira M.M. & Lemos V.S. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* v.295, p.H2503-H2511. 2008.

17. Creager M.A., Lüscher T.F., Cosentino F. & Beckman J.A.. Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. *Circulation* v.108, p.1527–1532. 2003;

18. Crotty T.P. Contraction in the smooth muscle cell *Medical Hypotheses.* v.53, p.432–446. 1999.

19. Daneman D. Type 1 diabetes*. Lancet*. v.367, p.847–58. 2006.

20. Das Evcimen N., King G.L. LinksThe role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res.* v.55, p.498–510. 2007.

21. Daub H., Weiss F.U., Wallasch C.& Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. v.6565, p.557–560. 1996.

22. De Vriese A.S., Verbeuren T.J., Voorde JV., Lameire N.H. &. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal of Pharmacology,* v.130, p.963 – 974. 2000.

23. Di Marzio D., Mohn A., Martino M. & Chiarelli F. Macroangiopathy in Adults and Children with Diabetes: Risk Factors (Part 2). *Horm. Metab. Res*. v.38, p.706–20. 2006.

24. Dimopoulos G.J., Semba S., Kitazawa K., Eto M., Kitazawa T. Ca2 - Dependent Rapid Ca2 Sensitization of Contractionin Arterial Smooth Muscle *Circ. Res*. v.100, p.121–129. 2007.

25. Ding H., Hashem M, Wiehler W.B., Lau W., Martin J., Reid J. & Triggle C. Endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse. *British Journal of Pharmacology,* V.146, p.1110–1118. 2005.

26. Ding H., Hashem M., Wiehler W.B., Lau W., Martin J., Reid J. & Triggle C.. Endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse. *British Journal of Pharmacology.* v.46, p.1110–1118. 2005.

27. Dzau V.J. Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. v.15, p.S59–S64. 1990.

28. Eckel R.H., Wassef M., Chait A., Sobel B., Barrett E., King G., Lopes V.M., Reusch J., Ruderman N., Steiner G. & Vlassara H.. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease. *Writing Group II: pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. Circulation*. v.105, p.e138–e143. 2002.

29. Foster F.M., Traer C.J., Abraham S.M. & Fry M.J. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *Journal of Cell Science*. v.16, p.3037–3040. 2003.

30. Fukao M., Hattori Y., Kanno M., Sakuma I. & Kitabatakea A. Alterations in endothelium-dependent hyperpolariza-tion and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol*. v.121, p.1383–1391. 1997.

31. Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A. & Sessa W.C.. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* v.399, p.597–601. 1999.

32. Griendling K., Harrison D.G., Forstermann U. & Skatchkov T.M.M., Thaiss F., Stahl R. A.K., Warnholtz A., Meinertz T., Li U.H.H., Mollnau H., Oelze M., Edi Matheis, Hartmann M. Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ. Res*. v.88, p.e14–e22. 2001.

33. Gross J.L., Nehme M. Detection and treatment of chronic complications of diabetes mellitus: Consensus of the Brazilian Diabetes Society and the Brazilian Ophthalmology Council. *Rev Assoc Med Bras*. v..45, p.279–84. 1999.

34. Harrison D.G. Cellular and Molecular Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction. *J. Clin. Invest.* v.100, p.2153–2157. 1997.

35. Hattori Y., Kawasaki H., Abe K. & Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am. J. Physiol*. v..261, p.H1086–H1094. 1991.

36. Heygate K.M., Lawrence I.G., Bennet M.A. & Thurston H. Impaired endothelium-dependent relaxation in iso-lated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br. J.Pharmacol.* v.116, p. 3251–3259. 1995.

37. Hirano K., Current Topics in the Regulatory Mechanism Underlying the Ca^{2+} Sensitization of the Contractile Apparatus in Vascular Smooth Muscle. *J Pharmacol Sci.v.*104, p.109–115. 2007.

38. Hu Z.W., Shi X.Y., Lin R.Z. & Hoffman B.B. The alfa-1 Adrenergic Receptors Activate Phosphatidylinositol 3-Kinase in Human Vascular Smooth Muscle Cells Rolein Mitogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. v.271, p.8977–8982. 1996.

39. Ishii H, Koya D, King GL LinksProtein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* v.761, p.:21-31. 1998.

40. Kamata, K., Miyata N. & Kasuya K. Mechanisms of increased responses of the aorta to α-adrenoceptor agonists in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacobio-Dyn*. v.11, p.707–713. 1988.

41. Kamata, K., Miyata N. & Kasuya Y.. Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol*. v.7, p.614–618. 1989.

42. Kapeller, R. & Cantley, L.C. Phosphatidylinositol 3-kinase. Bioessays v.6, p.565-576. 1994.

43. Karabatas L.M., Pastorale C., Bruno L.F., Maschi F., Pivetta O.H., Lombardo Y.B., Chemes H. & Basabe J.C. Early Manifestations in Multiple-low-dose Streptozotocin-induced Diabetes in Mice. *Pancreas.* v.30, n 4. 2005.

44. Karnik A. A., Fields A. V. & Shannon R. P., Diabetic Cardiomyopathy *Current Hypertension Reports*, v.9, p.467–473. 2007.

45. Kawanabea Y, Hashimotoa N. & Masaki T. Effects of phosphoinositide 3-kinase on endothelin-1-induced activation of voltage-independent Ca^{2+} channels and vasoconstriction. *Biochemical Pharmacology*. v.8, p.215–221. 2004.

46. Keaney J.F.Jr. & Vita J.A.. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog. Cardiovasc. Dis*. v.38, p.129–154. 1995.

47. Kim J., Lee C.K., Park H.J., Kim H.J., So H.H., Lee K.S., Lee H.M.,. Roh H.Y, Choi W.S., Park T.K. & Kim B. Epidermal Growth Factor Induces Vasoconstriction Through the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Hypertensive Rats. *J Pharmacol Sci.* v.101, p.135-143. 2006.

48. Kobayashi T., Matsumoto T. & Kamata K. The PI3-K/Akt pathway: roles related to alterations in vasomotor responses in diabetic models *J. Smooth Muscle Res.* v.41, p.283–302. 2005.

49. Kobayashi, T., Taguchi K., Takenouchi Y., Matsumoto T. & Kamata, K.. Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. *Hypertension.* v.44, p.956–962. 2004

50. Komalavilas P., Mehta S., Wingard C.J., Dransfield D.T., Bhalla J., Woodrum J.E., Molinaro J.R. & Brophy C.M. PI3-kinase/Akt modulates vascular smooth muscle tone via cAMP signaling pathways. *J. Appl. Physiol*. v.91, p.1819–1827. 2001.

51. Kurosu H., Maehama T., Okada T., Yamamoto T., Hoshino S., Fukui Y., Ui M., Hazekii O. & Katada T. Heterodimeric Phosphoinositide 3-Kinase Consisting of p85 and p110β Is Synergistically Activated by the βϒ Subunits of G Proteins and Phosphotyrosyl Peptide. *The Jounal of Biological Chemistry*. v.272, p. 24252–24256. 1997.

52. Lagaud G.J.L., Masih-Khan E., Kai S., Breemen C.V. & Dubé G.P. Influence of type II diabetes on arterial tone and endothelial function in murine mesenteric resistance arteries. *J. Vasc. Res*. v.38, p.578–589. 2001.

53. Le Blanc C., Mironneau C., Barbot C., Henaff M., Bondeva T., Wetzker R. & Macrez N. Regulation of Vascular L-type Ca2+ Channels by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *Circ. Res*. v.95, p.300–307. 2004.

54. Lucas J.W., Schiller J.S., Benson V. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2001: National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat.* v.10, p.218. 2004.

55. Luttrell L.M., Hawes B.E., Biesen T.V., Luttrell D.K., Lansing T.J. & Lefkowitz R.J. Role of c-Src Tyrosine Kinase in G Protein-coupled Receptor and Gbeta gamma Subunit-mediated Activation of Mitogen-activated Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. v.271, p.19443–19450. 1996.

56. Macrez N., Mironneau C., Carricaburu V., Quignard J.F., Babich A., Czupalla C., Nurnberg B. & Mironneau J. Phosphoinositide 3-kinase

isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca^{2+} channels. *Circ. Res*. v.89, p.692–699. 2001.

57. Macrez, N., Mironneau, C., Carricaburu, V., Quignard, J.F., Babich, A., Czupalla, C., Nurnberg, B. & Mironneau, J. Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca^{2+} channels. *Circ. Res*. v.89, p.692–699. 2001.

58. Maier U., Babich A. & Nürnberg B. Roles of Non-catalytic Subunits in Gbeta-gamma induced Activation of Class I Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms beta and gamma. *The Jounal of Biological Chemistry*. v.274, p.29311–29317. 1999.

59. Matsumoto T., Kobayashi T. & Kamata K.. Alterations in EDHF-type relaxation and phosphodiesterase activity in mesenteric arteries from diabetic rats. *Am. J. Physiol.* v.285, p.H283–H291. 2003.

60. Matsumoto T., Kobayashi T. & Kamata K.. Alterations in vascular endothelial function in the aorta and mesenteric artery in type II diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* v.82, p.175–182. 2004.

61. Mayhan W.G. Superoxide dismutase partially restores impaired dilatation of the basilar artery during diabetes mellitus. *Brain. Res*. v.760,p.204–209. 1997.

62. Mayhan, W.G., Irvine S.D. & Sharpe G.M.. Constrictor responses of resistance arterioles during diabetes mellitus. Diabetes *Res. Clin. Pract*. v.44, p.147–156. 1999.

63. Mayhan, W.G., Simmons L.K. & Sharpe, G.M. (1991). Mechanisms of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol*. v.260, p. H319–H326.

64. Miao L., Dai Y. & Zhang J. Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1- induced contraction in rabbit basilar artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* v.283, p.H983–H989. 2002.

65. Morello F., Perino A. & Hirsch E.. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovascular Research*. v.82, p.261–271. 2009.

66. Northcott C.A., Hayflick J. & Watts S.W. Upregulated function of phosphatidylinositol-3-kinase in genetically hypertensive rats: a moderator of arterial hypercontractility. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. v.32, p.851–858. 2005.

67. Northcott C.A., Poy M.N., Najjar S.M. & Watts. S.W. Phosphoinositide 3-kinase mediates enhanced spontaneous and agonist-induced contraction in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Circ. Res*. v.91, p.360–369. 2002.

68. Northcott, C.A., Hayflick J.S. & Watts S.W. PI3-kinase upregulation and involvement in spontaneous tone in arteries from DOCA-salt rats: is p110delta the culprit? Hypertension v.43, p.885–890. 2004.

69. Nuzum D.S. & Merz T. Macrovascular Complications of Diabetes Mellitus *Journal of Pharmacy Practice.* v 22, p.35. 2009.

70. Nuzum D.S., Merz T. & Pharm D. Macrovascular Complications of Diabetes Mellitus. *Journal of Pharmacy Practice*. v.22, p.135–148. 2009.

71. Okon E.B., Szado T., Laher I., Mcmanus B. & Van Breemen C. Augmented Contractile Response of Vascular Smooth Muscle in Diabetic Mouse model. *J. Vasc Res.* v.40, p.520–530. 2003.

72. Orasanu G & Plutzky J. The Pathologic Continuum of Diabetic Vascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. v.3, p.S35–S42. 2009.

73. Pelligrino D.A., Koenig H.M., Wang Q. & Albrecht R.F. Protein kinase C suppresses receptor-mediated pial arteriolar relaxation in the diabetic rat. *Neuro Report. v.*5, p.417–420. 1994.

74. Pfitzer G.. Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol.* v.91, p.497–503, 2001.

75. Pieper G.M., Mei D.A, Lamgemstroer P. & O'rourke S.T. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. *Am. J. Physiol*. v.263, p.H676–H680. 1992.

76. Pieper G.M., Siebeneich W., Hilton G.M. & Roza A.M.. Reversal by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic BB rat. *Diabetologia.* v.40, p.910–915. 1997.

77. Piercy V.G. & Taylor S.A. Comparison of spasmogenic and relaxant responses in aortae from C57/BL/KsJ diabetic mice with those from their non-diabetic littermates. *Pharmacology.* v.56, p.267–275. 1998.

78. Quilley J. & Chen Y.J. Role COX-2 in the Enhanced Vasoconstrictor Effect of Arachidonic Acid in the Diabetic Rat Kidney. *Hipertansion. v.*.42 p.837–843. 2003.

79. Rakotoarisoa L., Carricaburu V., Leblanc C., Mironneau C., Mironneau J. & Macrez N.. Angiotensin II-induced delayed stimulation of phospholipase Cgamma requires activation of both phosphatidylinositol 3-kinase gamma and tyrosine kinase in vascular myocytes. *J. Cell. Mol. Med*. v.10, p.734–748. 2006.

80. Shimizu K., Muramatsu M., Kakegawa Y., Asano H., Toki Y., Miyazaki Y., Okumura K., Hashimoto H. & Ito T.(Role of prostaglandin H2 as an endothelial-erived contracting factor in diabetic state. *Diabetes.* v..42, p.1246–1252. 1993.

81. Sobrevia L., Mann G.E. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp. Physiol.* v.82, p.423–52. 1997.

82. Su, X., Smolock, E.M., Marcel, K.N. & Moreland, R.S. Phosphatidylinositol 3-kinase modulates vascular smooth muscle contraction by calcium and myosin light chain phosphorylation-independent and -dependent pathways. *Am. J. Physiol.* v.286 p.H657–H666. 2004.

83. Takeda N. Cardiac disturbances in diabetes mellitus. *Pathophysiology.* 2009

84. Taylor P.D., Oon B.B, Thomas C.R & Poston L. Prevention by insulin treatment of endothelial dysfunction but not enhanced noradrenaline-induced contractility in mesenteric resistance arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* v.111, p.35–41. 1994.

85. Tesfamariam B, Jakubowski J.A., Cohen R.A. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH2-TxA2. *Am J Physiol*. v.257, p.H1327-H1333. 1989.

86. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. Free*. Radic. Biol. Med*. v.16, p. 383–391. 1994.

87. Thompson. Animal models of diabetes Mellitus: Relevance to vascular complication. *Currents Pharmaceutical Design*.v.14, p.309–324. 2008

88. Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell. Res*. v.253, p.239–254. 1999.

89. Vecchione C., Patrucco E., Marino G., Barberis L., Poulet R., Aretini A., Maffei A., Gentile M.T., Storto M. & Azzolino O. Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kγ. *Nat. Med*. v.201, p.1217–1228. 2005.

90. Viard P., Exner T., Maier U., Mironneau J., Nurnberg B. and Macrez N. Gbeta gamma dimers stimulate vascular L-type Ca21 channels via phosphoinositide 3-kinase. *Faseb J.* v.13, p.685– 694. 1999.

91. Villalba N, Stankevicius E, Simonsen U, Prieto D. Rho kinase is involved in Ca^{2+} entry of rat penile small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 v.294, p.H1923–32. 2008.

92. Wadwa R.PCardiovascular disease risk in youth with diabetes mellitus. Rev. *Endocr. Metab. Disord*. v.7, p.197–204. 2006.

93. Wang Y, Yoshioka K, Azam MA, Takuwa N, Sakurada S, Kayaba Y, Sugimoto N, Inoki I, Kimura T, Kuwaki T, Takuwa Y. Class II phosphoinositide 3-kinase α-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. *Biochem. J.* v.394, p.581–592 2006.

94. White R.E. & Carrier G. Vascular Contraction induced by Activation of Membrane Calcium ion Channels is Enhanced in Streptozotocin-Diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* v..253, p.1057–1062. 1990

95. Wilbert S. & Aronow M.D. Hypertension and the Older Diabetic. *Clin. Geriatr. Med*. v.24,p.489–501 2008.

96. Wild S., Bchir M.B., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030 *Diabetes Care.* v.27, n.5. 2004.

97. Xie Z, Su W., Guo Z., Pang H., Post S.R., Gong M.C. Up-regulation of CPI-17 phosphorylation in diabetic vasculature and high glucose cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. v.69,491–501. 2006

98. Yach D., Stuckler D. & Brownell K.D.. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes Nature Medicine. v.12, n.1, 2006.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo