



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA**



LUCIANA NASCIMENTO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASCULAR
DO D-PINITOL EM ARTÉRIA
MESENTÉRICA**

BELO HORIZONTE-MG

2015

LUCIANA NASCIMENTO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASCULAR
DO D-PINITOL EM ARTÉRIA
MESENTÉRICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais.
Área de concentração: Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Steyner F. Côrtes.

BELO HORIZONTE-MG

2015

AGRADECIMENTOS

Alguém já disse que “a gratidão é a lembrança do coração”. Por isso essa parte da dissertação é tão especial... quero aqui expressar de coração os meus agradecimentos às seguintes pessoas e instituição:

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

Aos meus pais Edna e Juracy por serem os meus grandes incentivadores nas horas mais difíceis, pela sabedoria em me educar, pelo amor, carinho, proteção e que sabiamente souberam me ensinar os limites da vida, por terem investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento. Obrigado por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim e por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas.

Ao meu irmão Luciano agradeço por ter sido o meu professor de vida e grande exemplo. Obrigada por existir! Amo você!

Ao Prof. Dr. Steyner F. Côrtes meu muito obrigado pela amizade, paciência e orientação ao longo desses anos. Agradeço pela oportunidade! Tenho um carinho muito grande pelo senhor e um respeito muito maior.

A Prof^ª. Dr^ª. Virgínia S. Lemos pelo afeto e acolhimento.

Ao Prof. Dr. Pedro O. Luccas por ser meu primeiro guia no universo da pesquisa.

Ao amigo Elmo José C. Silva por me socorrer nos momentos difíceis do mestrado.

Meu reconhecimento e meu muito obrigado aos colegas do laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, meus companheiros de vida acadêmica.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, pela oportunidade de realizar este projeto e a Capes pelo suporte financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

*Dedico este trabalho a Deus, a meus pais
Edna e Juracy e a Luciano por tudo o que sou.*

*Vocês são os meus heróis e
minha eterna fonte de inspiração.*

Tudo é possível àquele que crê.

(Jesus Cristo)

RESUMO

O D-pinitol (3-O-metil-D-quiro-inositol) é um ciclitol presente em diversas espécies vegetais (frutas cítricas e leguminosas). Estudos recentes demonstram a capacidade deste ciclitol em reverter a disfunção endotelial e inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelos animais de diabetes mellitus. Em humanos, o D-pinitol apresenta atividade hipoglicemiante e reduz a pressão arterial sistólica e diastólica em indivíduos com diabetes mellitus tipo II. Considerando a importância das alterações cardiovasculares na morbidade e mortalidade associadas ao diabetes mellitus, os efeitos descritos para o D-pinitol sugerem um efeito protetor deste fármaco no sistema cardiovascular. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito vasodilatador do D-pinitol e seu respectivo mecanismo de ação em artéria mesentérica de camundongo. Artérias mesentéricas de 2ª ramificação foram isoladas de camundongos machos C57BL/6, com 8-14 semanas, seccionadas em anéis e montadas em um miógrafo com fios de tungstênio (DMT, Aarhus, Denmark). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Experimentação Animal da UFMG (CEUA-UFMG, protocolo nº. 170/2014). O D-pinitol induziu um efeito vasodilatador, concentração-dependente, na presença de endotélio funcional. Este efeito vasodilatador foi abolido na ausência de endotélio funcional e na presença de L-NAME (300 μ M), um inibidor não seletivo de óxido nítrico sintase (NOS). Este resultado sugere a participação do endotélio e da NOS no efeito vasodilatador do D-pinitol. Em artérias tratadas com ODQ (10 μ M), um inibidor da guanilato ciclase, a curva concentração-efeito foi deslocada para a direita. O D-pinitol aumentou significativamente a produção de nitrito em artérias mesentéricas com endotélio funcional. Este efeito é inibido por L-NAME e por calmidazolium (10 μ M), um inibidor de calmodulina. D-pinitol aumentou o nível de fosforilação da NOS no resíduo de Ser1177, sítio de ativação, e

reduziu o nível de fosforilação no resíduo de Thr495, sítio de inativação. Os presentes resultados nos permitem concluir que o D-pinitol apresenta um efeito vasodilatador em artéria mesentérica de camundongo, dependente do endotélio vascular e da produção de NO, via ativação da NOS por um mecanismo dependente de cálcio-calmodulina.

Palavras-chave: D-pinitol, vasorrelaxamento, artéria mesentérica, óxido nítrico sintase

ABSTRACT

D-pinitol (3-O-methyl-D-chiro-inositol) is a cyclitol present in several plant species (citrus fruits and vegetables). Recent studies demonstrated the ability of this cyclitol in reversing the endothelial dysfunction and to inhibit the release of pro-inflammatory cytokines in animal models of diabetes mellitus. In humans, D-pinitol shows hypoglycemic activity and reduces systolic and diastolic blood pressure in individuals with type II diabetes mellitus. Considering the importance of cardiovascular diseases in the morbidity and mortality associated with diabetes mellitus, the effects described for the D-pinitol suggest a protective effect of this drug in the cardiovascular system. The present work aimed at investigating the mechanisms involved in the vascular effects of D-pinitol in mouse mesenteric artery. Male mice C57BL/6 with 8-14 weeks were used (Animal Ethics Committees: Protocol 170/2014). Mesenteric arteries 2nd branch were dissected and sectioned in 1.6 to 2.0 mm rings. These segments were mounted in a wire myograph (DMT, Aarhus, Denmark). D-pinitol induced a concentration-dependent vasodilation in the presence of a functional endothelium. This vasodilator effect was abolished in the absence of a functional endothelium and in the presence of L-NAME (300 μ M), a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). In arteries treated with ODQ (10 μ M), an inhibitor of guanylate cyclase, the concentration-effect curve was shifted to the right. D-pinitol significantly increased the nitrite production in mesenteric arteries with a functional endothelium. This effect was inhibited by L-NAME and calmidazolium (10 μ M), an inhibitor of calmodulin. D-pinitol significantly increased the phosphorylation level of NOS at Ser1177, activation site, and reduced the phosphorylation level at Thr495, inactivation site. The present results led us to conclude that the D-pinitol has an endothelium- and NOS- and NO-dependent vasodilator effect

in mouse mesenteric artery activated by a mechanism dependent on calcium-calmodulin.

Keywords: D-pinitol, vasodilator, mesenteric artery, nitric oxide synthase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do D-pinitol (3-O-metil-D-qui-ro-inositol).	25
Figura 2: Porção da 2 ^a ramificação da artéria mesentérica a ser dissecada. A seta preta indica a localização da 2 ^a ramificação.	28
Figura 3: Esquema de montagem de um anel de artéria em um miógrafo.	28
Figura 4: Teste de endotélio em artéria mesentérica de camundongo. (A) vaso com endotélio funcional e (B) vaso sem endotélio funcional.	30
Figura 5: Esquema de curva de relaxamento concentração-resposta induzida pelo D-pinitol em vaso pré-contraído com Phe (3 µM).	30
Figura 6: Efeito vasodilatador do D-pinitol na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio funcional. Os resultados representam a média ± EPM de 5 experimentos. *** P < 0,001.....	36
Figura 7: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, em artérias mesentéricas pré-incubadas ou não com L-NAME (300 µM). Os resultados representam a média ± EPM de 7 experimentos. * P < 0,05 ; ** P < 0,01 e *** P < 0,001 em relação ao controle.....	37
Figura 8: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com indometacina (10 µM). Os resultados representam a média ± EPM de 7 experimentos.	38
Figura 9: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com TRIM (300 µM). Os resultados representam a média ± EPM de 7 experimentos.	39
Figura 10: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com ODQ (10 µM). Os resultados representam a média ± EPM de 7 experimentos. * P < 0,05 e *** P < 0,001 em relação ao controle.....	40

- Figura 11:** Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com wortmannin (1 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 6 experimentos. 41
- Figura 12:** Produção de nitrito em artérias mesentéricas na ausência (basal) ou na presença de D-pinitol (20 μ M) ou ACH (10 μ M), antes e após pré-tratamento com L-NAME (300 μ M) e Calmidazolium (10 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos. *** $P < 0,001$ em relação ao basal, † $P < 0,05$ e ††† $P < 0,001$ em relação ao respectivo controle. 42
- Figura 13:** Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com vermelho de rutênio (10 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos. 43
- Figura 14:** Efeito do estímulo com D-pinitol sobre o nível de fosforilação da eNOS em resíduos de Ser1177 (A) e de Thr495 (B). As imagens são representativas de 4 experimentos. Os resultados representam a média \pm EPM de 4 experimentos. * $P < 0,05$ em ao respectivo controle. 44
- Figura 15:** Esquema representativo dos mecanismos e procedimentos farmacológicos utilizados na investigação do efeito vasodilatador do D-pinitol em artéria mesentérica de camundongo. 47

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
ACH	Acetilcolina
Akt	Proteína quinase B
AMPc	3'5'-monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	5'-trifosfato de adenosina
BH4	Tetrahidrobiopterina
CaCl₂.2H₂O	Cloreto de cálcio diidratado
CEUA	Comissão de ética de uso de animais
CO₂	Gás carbônico
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
E⁺	Com endotélio funcional
E⁻	Sem endotélio funcional
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDH	Hiperpolarização derivada do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EDTA.2Na	Etilenodiaminotetracético dissódico
E_{máx}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
Fe²⁺	Íon ferroso
Fe³⁺	Íon férrico

g	Gramas
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GLUT4	Transportador de glicose 4
GMPc	3'5'-monofosfato de guanosina cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
HCl	Ácido clorídrico
HRP	Peroxidase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP	Inositol fosfato
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
L-NAME	N ^G -nitro L-arginina metil éster
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
min	Minutos
mg	Miligrama
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
mN	Milnewton
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaF	Fluoreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

Na₃VO₄	Ortovanadato de sódio
NCX	Canal trocador de sódio-cálcio
nM	Nanomolar
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂	Oxigênio
ODQ	1H-[1,2,4]-oxidiazol[4,3-a] quinoxalin-1-ona
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PGF₂	Prostaglandina
PGH₂	Prostaglandina
PGI₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PP1	Proteína fosfatase 1
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SBH	Sociedade brasileira de hipertensão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida
Ser1177	Serina 1177
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarcoendoplasmático

SPH	Sociedade portuguesa de hipertensão
TBS	Tampão salino tris
TBS-T	Tampão salino tris + tween
Thr495	Treonina 495
TRIM	1-(2-trifluorometilfenil)imidazol
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TRP	Potencial receptor transitório
µg	Micrograma
µM	Micromolar
VGCC	Canal de cálcio voltagem-dependente
WHO	Organização mundial de saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Doenças Cardiovasculares	17
1.2	Artérias de Resistência	18
1.3	Papel da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no Relaxamento Vascular	21
1.4	Desenvolvimento de Fármacos a Partir de Produtos Naturais	23
1.5	D-pinitol.....	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3	METODOLOGIA	27
3.1	Animais.....	27
3.2	Reatividade Vascular.....	27
3.3	Avaliação da Integridade dos Anéis Mesentéricos.....	29
3.4	Avaliação do Papel do Endotélio e de seus Mediadores sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol.....	30
3.5	Avaliação da Participação dos Canais TRP's no Efeito Vasodilatador do D-pinitol.....	31
3.6	Determinação de Nitrito (NO_2^-) em Artéria Mesentérica de Camundongo	32
3.7	Determinação do Grau de Fosforilação em Resíduos de Serina e Treonina da eNOS por Western Blot.....	33
3.8	Preparação das Amostras de D-pinitol e Outras Drogas	34

3.9	Análise Estatística.....	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Avaliação do Papel do Endotélio Sobre o Efeito Relaxante de D-pinitol	36
4.2	Avaliação dos Mediadores Endoteliais Sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol.....	37
4.3	Avaliação da Participação da PI3K Sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol	40
4.4	Avaliação da Produção de Nitrito Pelo D-pinitol.....	41
4.5	Avaliação da Participação dos Canais TRP's Sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol.....	42
4.6	Determinação do Grau de Fosforilação em Resíduos de Serina e Treonina da eNOS por Western Blot	43
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

Doenças cardiovasculares (DCV) são doenças crônicas não transmissíveis causadas por distúrbios no coração e vasos sanguíneos. Inclui infarto, acidente vascular cerebral, hipertensão, doença arterial periférica, doença reumática do coração, doença cardíaca congênita e insuficiência cardíaca. Os principais fatores de risco metabólicos para o surgimento das DCV são os níveis de glicose, colesterol e triglicérides (Chiang et al., 2013). Os fatores de risco não metabólicos incluem o consumo de tabaco, o sedentarismo, dieta inadequada, uso abusivo do álcool e envelhecimento. As DCV acometem 17 milhões de mortes por ano, sendo que o número de pessoas diagnosticadas com hipertensão passou de 600 milhões em 1980 para 1 bilhão em 2008 (Versari et al., 2008; HO et al., 2010; WHO, 2013).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH) a prevalência de DCV nos últimos 20 anos foi de 30%, de acordo com os inquéritos populacionais nas cidades brasileiras. É considerado hipertenso o indivíduo que apresenta sistematicamente, pressão arterial sistólica (PAS) \geq 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) \geq 90 mmHg (SBH, 2010; Sociedade Portuguesa de Hipertensão - SPH, 2014).

A hipertensão é uma desordem progressiva que além de causar danos cardiovasculares, pode acarretar problemas renais. É considerada como um problema de saúde pública em diversos países, pois pessoas que possuem essa patologia podem ser assintomáticas durante anos, mas vir a falecer por ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral. É uma doença multifatorial que está relacionada com desordens no débito cardíaco, rigidez arterial e resistência periférica (Loizzo et al., 2008; Agymang & Bhopal, 2013). A

hipertensão pode estar associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo como: coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, além de alterações metabólicas. A abordagem terapêutica está ligada não apenas ao controle da pressão sanguínea, mas também visa normalizar o sistema vascular. (Freeman, 2008).

1.2 Artérias de Resistência

A função básica do sistema cardiovascular é levar material nutritivo e oxigênio às células, que consiste no sangue, no coração e nos vasos sanguíneos (Ku, 1997).

As artérias são os vasos sanguíneos que têm por função transportar o sangue para os tecidos. As artérias são classificadas em: artérias de condutância e artérias de resistência como a artéria mesentérica (Pohl et al., 2000).

O tônus vascular de artérias de resistência é o grande responsável pela manutenção da resistência periférica na circulação e, conseqüentemente, é o principal contribuinte para o controle da pressão arterial. Em modo basal, o músculo liso vascular encontra-se parcialmente contraído e o estado contráctil das células vasculares lisas está sob a influência de mecanismos regulados pelo sistema simpático, neuro-humoral e principalmente pelo tônus miogênico. O mecanismo de compreensão do tônus vascular envolve a detecção por meio de mecanorreceptores ao estiramento da parede vascular, despolarização de membrana, alterações na concentração do íon cálcio, ativação na interação actina-miosina e vasoconstrição (Kauffenstein et al., 2012). A despolarização induz a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente proporcionando o aumento da concentração de cálcio intracelular e em contrapartida ocorre um feedback negativo com a abertura dos canais de potássio ativados por

cálcio ocorrendo a hiperpolarização da célula. O tônus vascular pode ser alterado principalmente em resposta a variações na concentração de cálcio na célula muscular lisa sendo capaz de induzir a contração (aumento da permeabilidade ao íon cálcio) ou relaxamento dos vasos diminuindo a concentração intracelular deste íon. O cálcio desempenha um papel diversificado na regulação da função do músculo liso, não só pelo início da contração, mas também através da estabilização da membrana e redução a cinética da interação na proteína contráctil (McCarron, 1985; Walsh, 1994; Ledoux et al., 2006; Akata 2007 a,b). A contração vascular está relacionada com a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) que favorece sua ligação com a actina. A fosforilação depende do aumento da concentração de cálcio intracelular e dos mecanismos que modulam a sensibilidade ao cálcio. O grau de fosforilação é determinado pela a ativação da quinase cadeia leve de miosina (MLCK) a qual é regulada pela formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina. A ativação da MLCK está relacionado com as vias de sensibilização do cálcio dependentes da Rho quinase e proteína quinase C (PKC) (Somlyo & Somlyo, 2003; Kauffenstein et al., 2012). A regulação do cálcio dentro da célula muscular lisa envolve: a entrada de cálcio principalmente pelos canais de cálcio voltagem-dependentes (VGCC), liberação dos estoques de cálcio pelo retículo endoplasmático e ativação da fosfolipase C com liberação do inositol trifosfato e entrada de cálcio pelos canais TRP, canais trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), canais de cálcio operados por receptores acoplados a proteína G (GPCR) e canais de cálcio ativados pela tirosina-quinase (Berridge, 2008; Kauffenstein et al., 2012). No entanto, uma elevação endotelial da concentração intracelular de cálcio induz o relaxamento das células do músculo liso vascular adjacente. A redução do tônus vascular ocorre em casos de depressão do sistema cardiovascular resultando na falha de perfusão enquanto que o aumento do tônus vascular contribui para o aumento da resistência periférica em casos

de hipertensão e diabetes mellitus tipo 2. Sabe-se que alterações genéticas e patogênicas podem alterar a cinética do cálcio no músculo liso, é necessária uma sintonia fina de concentração intracelular de cálcio em ambos os tipos de células para que ocorra a regulação e perfusão tecidual (Davis & Hill, 1999; Somlyo & Somlyo, 2003).

As artérias são muito mais sensíveis às ações de substâncias modulatórias, o que justifica a realização do projeto com artérias mesentéricas (Pohl et al., 2000). Estas artérias são constituídas basicamente por três túnicas: a túnica interna ou íntima, a túnica média e a túnica externa ou adventícia (Ferrari et al., 2003). A túnica íntima apresenta uma camada única de células planas ou escamosas de forma oval ou fusiforme orientadas segundo a direção da corrente sanguínea. A essa camada de células dá-se o nome de endotélio (Aird, 2007).

O endotélio forma uma barreira seletiva entre o sangue e os tecidos e apresenta estruturas adesivas transmembranares que unem as células umas as outras. A superfície da íntima do endotélio intacto é anticoagulante e antitrombótico: células endoteliais secretam uma variedade de moléculas importantes para a regulação das funções de coagulação do sangue e plaquetas. Em situações fisiopatológicas, a perda da função de barreira, dano ao vaso ou a exposição a certos estímulos pró-inflamatórios ou a citocinas, ocorre um deslocamento do equilíbrio no sentido de um pró-coagulante/pró-trombótico das células endoteliais (Pearson, 1999; Michiels, 2003). As células endoteliais coordenam o recrutamento de células inflamatórias para os locais de infecção ou lesão do tecido e produzem e liberam citocinas e fatores de crescimento (Mantovani et al., 1992; Muller, 2002). A fim de investigar os diversos fatores envolvidos na alteração da homeostase vascular, vários trabalhos têm investigado o papel do endotélio vascular. O endotélio participa na regulação local do tônus da musculatura do vaso através da liberação de substâncias contráteis, como

prostaglandina (PGF₂ e PGH₂), endotelina-1, angiotensina II e tromboxanos A₂ e de substâncias vasodilatadoras, como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Feletou & Vanhoutte, 1988) e prostaciclina (PGI₂) (Moncada et al, 1976). Um desequilíbrio na produção dos fatores endoteliais conduz à disfunção endotelial, um evento que caracteriza e geralmente precede as doenças cardiovasculares causando danos aterotrombóticos, liberação de mediadores contráteis, liberação de fatores pró-inflamatórios e produção de espécies reativas de oxigênio causando o colapso do óxido nítrico (NO) (Loizzo et al., 2008; Versari et al., 2008).

1.3 Papel da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no Relaxamento Vascular

O NO é uma molécula que se difunde nas membranas e participa na regulação de processos fisiológicos e patológicos, produzida pela NOS. Atualmente, são conhecidas três isoformas de NOS: eNOS (ou NOS III, endotelial constitutiva), nNOS (ou NOS I, neuronal constitutiva) e iNOS (ou NOS II, induzida).

A síntese de NO pela eNOS e nNOS, depende de processos que aumentam as concentrações de cálcio citosólico. Sendo que a ligação cálcio-calmodulina leva a ativação enzimática. O controle pode ser através de agonistas que são endotélio-dependentes, proporcionando o aumento da concentração de íons cálcio e conseqüentemente o aumento da ligação cálcio-calmodulina, ativando a eNOS e/ou nNOS; pelo estresse de cisalhamento, mediada pela AKT ou proteína quinase B que aumenta a fosforilação de eNOS e aumenta a sensibilidade da enzima ao cálcio, mesmo o cálcio estando em níveis basais; pela fosforilação de resíduos específicos da eNOS que irá influenciar na atividade da enzima e também pela ativação da tirosina-quinase (Dimmeller et al., 1999; Fleming, 2010).

A NOS catalisa uma reação em dois passos (reação monooxigenase I e II) durante a conversão da L-arginina em NO e L-citrulina. Na reação monooxigenase I, um elétron proveniente das flavinas do domínio redutase reduz o ferro do grupo heme (Fe^{3+} a Fe^{2+}). A redução do ferro possibilita a ligação de O_2 originando um complexo $\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$. Um elétron do Fe^{2+} alterna-se entre o Fe^{2+} e o O_2 , originando complexos $\text{O}_2^{\cdot-}\text{-Fe}^{3+}$. Para que haja a catálise da L-arginina é necessário a ligação do cofator BH_4 ao complexo $\text{O}_2^{\cdot-}\text{-Fe}^{3+}$, presente no grupo heme. Acredita-se que o BH_4 atue facilitando a oxidação do NADPH, a dimerização e estabilização do dímero da NOS e protegendo a enzima da auto inibição induzida pelo aumento das concentrações de NO. Elétrons provenientes da BH_4 possibilitam a hidroxilação da L-arginina, regenerando o estado Fe^{3+} do grupo heme e a liberação de água, L-citrulina e NO (Rosen et al., 2002; Li & Poulos, 2005).

Nas DCV ocorre um desacoplamento da NOS quando os níveis de BH_4 são inadequados, levando a uma redução enzimática de oxigênio molecular e a oxidação de L-arginina. Com isso, resulta na geração de ânions superóxidos, em vez de NO, contribuindo para o stress oxidativo e disfunção endotelial vascular (Takaki et al., 2008; Fleming, 2010).

A iNOS é a isoforma que é praticamente independente de cálcio, ou seja, já é totalmente ativa na concentração de cálcio intracelular basal. É induzida em situações de resposta inflamatória, como sepse, liberação de citocinas e insuficiência cardíaca. Ela está constitutivamente presente no coração, macrófagos e hepatócitos (Fleming, 2008; Takaki et al., 2008).

O NO apresenta efeitos significativos no controle do tônus do músculo liso vascular, como demonstrado por Furchgott & Zawadzki (1980) quando o caracterizaram como EDRF, e no controle da pressão arterial. Possui efeitos antitrombóticos através da inibição da agregação plaquetária, além de reduzir a adesão endotelial de monócitos e leucócitos

no desenvolvimento de placas ateromatosas (Chatterjee & Catravas, 2008; Fleming, 2010; Wood et al., 2013).

1.4 Desenvolvimento de Fármacos a Partir de Produtos Naturais

O uso de produtos naturais com alguma propriedade terapêutica representa a forma mais antiga e difundida de medicação (Halberstein, 2005). Plantas e diversos metabólitos são uma fonte importante para o desenvolvimento de novas drogas, sendo que nas últimas décadas, cerca de 50% dos medicamentos são derivados de compostos de origem natural com diversas aplicações e que tem sobressaído com sucesso no campo cardiovascular (Loizzo et al., 2008).

Os produtos naturais têm sido associados à saúde de maneira significativa e apresentando benefícios na prevenção e tratamento de várias doenças. Muitas substâncias revolucionaram o campo da ciência como *Salix caroliniana* (ácido salicílico que inspirou a síntese do ácido acetilsalicílico), *Papaver somniferum* (fonte de ópio, morfina e codeína), *Digitalis latana* (se extrai a digoxina), *Cinchona officinalis* (antimalárico quinina) (Halberstein, 2005).

Dentre os anti-hipertensivos naturais, destacam-se: a reserpina, um alcaloide extraído da raiz de *Rauwolfia serpentina*, utilizada no tratamento no tratamento da hipertensão (Halberstein, 2005). A teprotida isolada do veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*) que serviu de modelo para a síntese de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), captopril e enalapril (Cragg et al., 2013).

Os produtos naturais têm uma importância tanto como agentes farmacêuticos ou como fonte de inspiração para a síntese de moléculas bioativas, o que justifica a constante investigação científica com produtos naturais (Cragg & Newman, 2013).

1.5 D-pinitol

Os inositóis são ciclohexanopolióis, poliálcool cíclicos, contendo seis átomos de carbono e seis grupos hidroxila conectados a um anel. São arranjados em nove estereoisômeros: *scilo*, *mio*, *neo*, *quiro*, *cis*, *muco* e *allo* (Almeida et al., 2003). Estes compostos são também chamados de ciclitóis (Croze & Soulage, 2013). Além de suas funções na fisiologia celular como precursores de segundos mensageiros envolvidos nos processos de secreção, metabolismo, contração e proliferação (Almeida et al., 2003); estes compostos também são utilizados na terapia da síndrome do ovário policístico, possuem atividade sensibilizadora da insulina, são considerados como uma opção de complementação alimentar com o objetivo de prevenir doenças cardiovasculares na síndrome metabólica (Nascimento et al., 2006), são agentes quimiopreventivos da inflamação carcinogênica e nas alterações neuropsiquiátricas (depressão, doença de Alzheimer e síndrome do pânico) (Carlomagno & Unfer, 2011; Croze & Soulage, 2013) e na Síndrome de Down (Huang et al., 1999).

Na circulação sistêmica de humanos, o mio-inositol está presente em alta concentração, aproximadamente 20 μ M (Shetty et al., 1996). Quando administrado na dieta de modelos animais de diabetes mellitus tipo II, o mio-inositol aumentou significativamente o fluxo sanguíneo renal, na esclera-corioide e na musculatura esquelética (Pugliese et al., 1990). O D-pinitol (3-O-metil-D-quiro-inositol; Figura 1), presente em diversas espécies vegetais (frutas cítricas e leguminosas) como *Pinus Lambertiana*, *Mateza roritina*, *Sequoia sempevirens*, *Pinus strobus*, *Astragalus wootoni*, *Astragalus earliei*, *Oxitropis lambertii*, *Lotonis lax*, *Lupinus caudatus*, *Picea rubra*, *Bougainvillea spectabilis*, *Baldoa purpurascens*, sementes de vicia, folhas de senna e xarope de alfarroba (Gottlieb & Brauns, 1951; Bates et al., 2000; Lahuta et al., 2010; Tetik et al., 2011; Mosquera et al., 2013). Ele possui estrutura química e ações bioquímicas semelhantes ao D-quiro-

inositol; provavelmente é convertido em D-qui-ro-inositol *in vivo*. (Ostlund & Sherman, 1996; Davis et al., 2000; Kim et al., 2012.). Alguns estudos demonstram efeitos benéficos à saúde humana como a redução dos níveis de glicose no plasma e pós-prandial (Kang et al., 2006), estimulando a captação de glicose através da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática em miotubos L6 e músculo esquelético e mimetizando efeitos da insulina (Dang et al., 2010) em vários casos de diabetes mellitus em ratos STZ diabéticos, camundongos ob/ob, macaco rhesus e humanos (Bates et al., 2000; Kim et al., 2012; Croze et al., 2013). Há aqueles relacionados com efeito anti-inflamatório em patas de ratos (Singh et al., 2001) e melhoramento do processo patogênico da asma (Lee et al., 2007), prevenção da catarata e estresse oxidativo devido a um quadro hiperglicêmico em ratos, além de apresentar ações antioxidantes e hepatoprotetoras em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica (Geethan & Prince 2008, Choi et al., 2009) e não apresentar toxicidade segundo Davis e colaboradores (2000).

Os conhecimentos sobre a ação dos inositóis no organismo continuam a progredir, no entanto, a importância fisiológica dos diversos derivados de inositóis permanece obscura, evidenciando que a pesquisa nessa área continua sendo promissora e de grande relevância (Almeida et al., 2003).

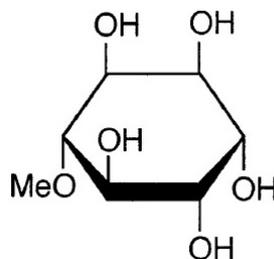


Figura 1: Estrutura do D-pinitol (3-O-metil-D-qui-ro-inositol).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito vasodilatador do D-pinitol e seu respectivo mecanismo de ação em artéria mesentérica de camundongo.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a relação concentração-efeito da atividade vasodilatadora do D-pinitol.
- Investigar a participação do endotélio e de seus mediadores (NO e prostaciclina) no efeito vasodilatador do D-pinitol.
- Investigar os mecanismos de ação do D-pinitol no endotélio ou no músculo liso vascular relacionados com a sua possível ação vasodilatadora.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG), protocolo 170/2014.

Camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 8 e 14 semanas provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, foram utilizados nos experimentos de investigação da atividade vasodilatadora do D-pinitol.

3.2 Reatividade Vascular

O sacrifício dos animais foi feita por decapitação, o abdômen foi seccionado e o leito mesentérico foi rapidamente removido e colocado em uma placa de Petri com solução salina fisiológica (mM): NaCl 119,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,4; NaHCO_3 14,9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,17; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 e glicose 5,5. Porções da 2ª ramificação da artéria mesentérica (Figura 2) foram dissecadas, sendo removido o tecido adiposo e conectivo. Em seguida, a mesma foi seccionada em anéis (aproximadamente entre 1,6 a 2,0 mm de comprimento) com diâmetro interno entre 150 e 250 μm . Estes segmentos foram montados em um miógrafo previamente descrito por Mulvany & Halpern (1977). Para isto, foram utilizados fios de tungstênio (20 μm de diâmetro) transpassados através do lúmen dos vasos e fixados nos suportes de aço do miógrafo. Os anéis foram mantidos em solução salina fisiológica, com temperatura controlada a 37°C e aerada com carbogênio, uma mistura gasosa contendo 95% O_2 e 5% CO_2 (Figura 3). A

tensão mecânica transmitida da parede dos vasos para os fios de tungstênio foram transmitidas para um sistema de amplificação por transdutores isométricos de força.

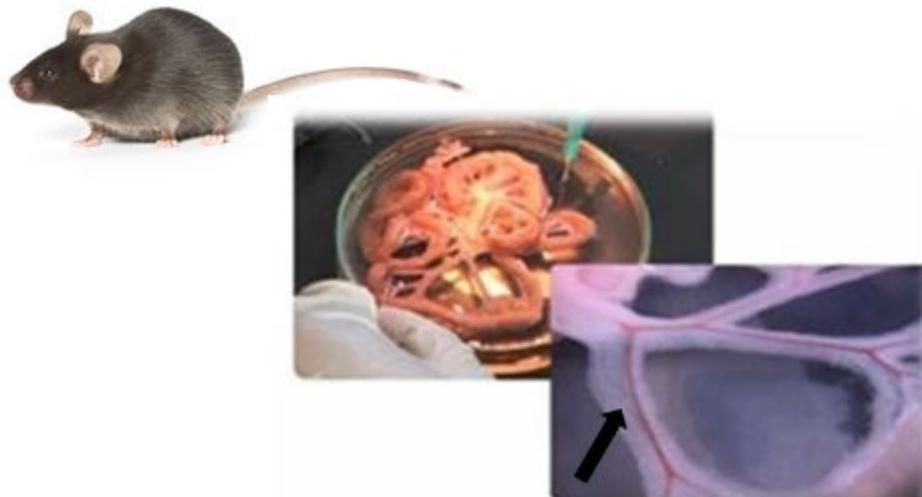


Figura 2: Porção da 2ª ramificação da artéria mesentérica a ser dissecada. A seta preta indica a localização da 2ª ramificação.

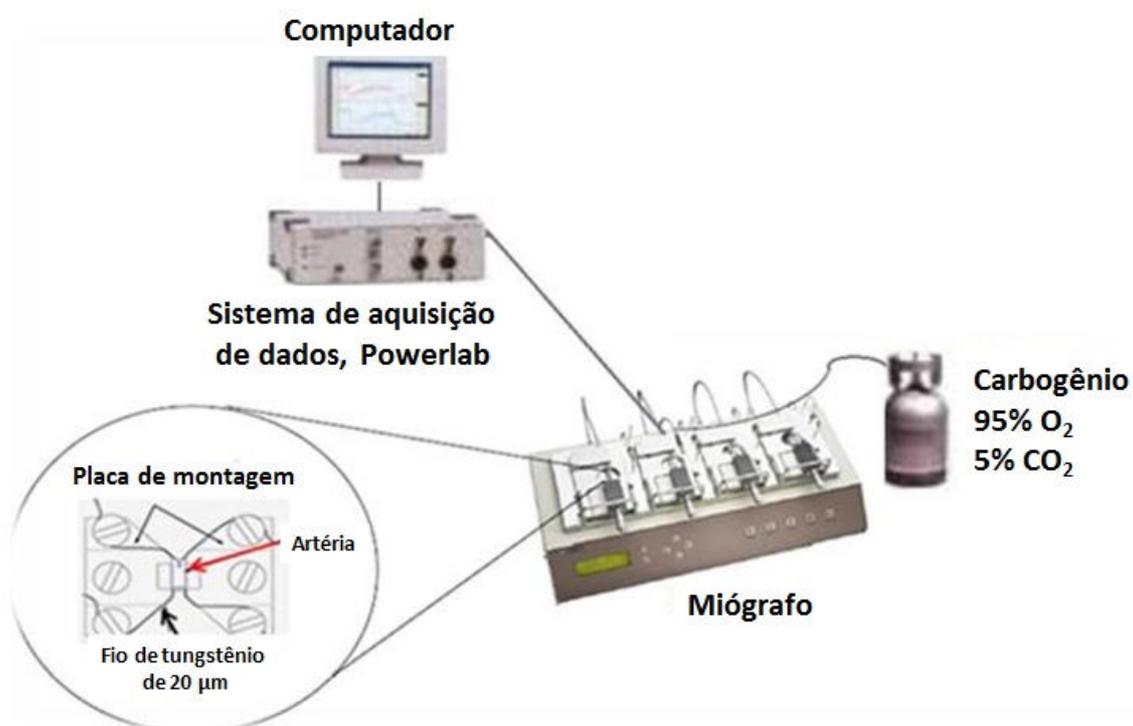


Figura 3: Esquema de montagem de um anel de artéria em um miógrafo.

Os vasos foram submetidos a uma tensão de 2 mN, equivalente a cerca de 90% da tensão naturalmente exercida pela pressão arterial

fisiológica. Estes permaneceram em estabilização durante 60 minutos, sendo que a solução fisiológica foi renovada a cada 15 minutos.

3.3 Avaliação da Integridade dos Anéis Mesentéricos

Após a montagem e estabilização dos vasos, os mesmos foram submetidos à contração induzida por fenilefrina (Phe, 3 μ M). A presença do endotélio funcional foi então constatada por adição de acetilcolina (ACH, 10 μ M) (Furchgott& Zawadzki, 1980) e os vasos que reduziram em mais que 70 % a contração sustentada induzida pela Phe, foram considerados como contendo endotélio funcional. A retirada do endotélio foi realizada através de leves fricções do fio de tungstênio no lúmen vascular durante a passagem do primeiro fio. A ausência de endotélio funcional foi confirmada em anéis de artéria mesentérica com vasodilatação induzida por acetilcolina inferior a 10 % (Figura 4). Após esse procedimento, foram aguardados 30 minutos a fim de se realizar novos testes no qual foi induzida mais uma segunda contração e curvas concentração-resposta cumulativas (Figura 5) foram obtidas com D-pinitol com as concentrações de 1 nM a 100 μ M. As respostas foram registradas utilizando um sistema de aquisição e análise informatizadas (LabChart; ADInstruments, Austrália).

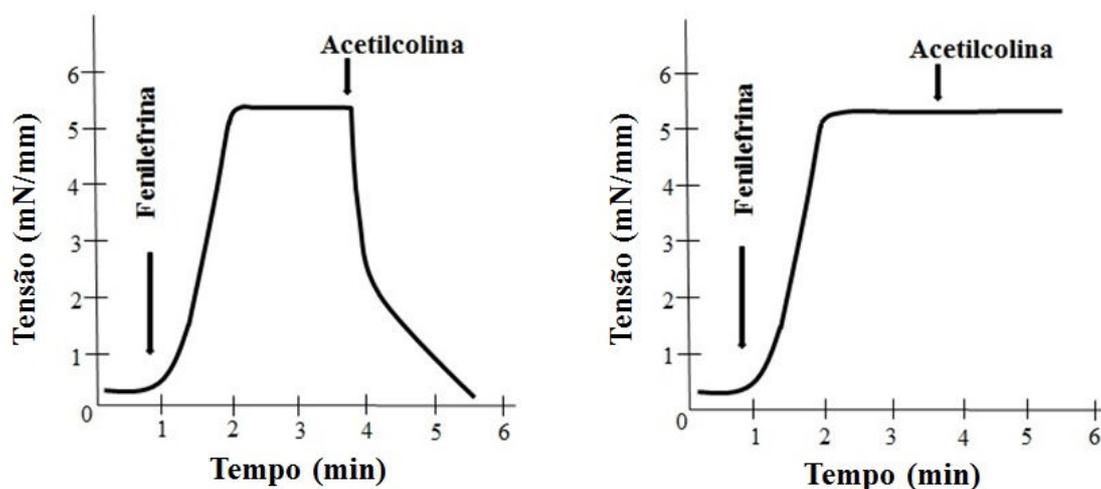


Figura 4: Teste de endotélio em artéria mesentérica de camundongo. (A) vaso com endotélio funcional e (B) vaso sem endotélio funcional.

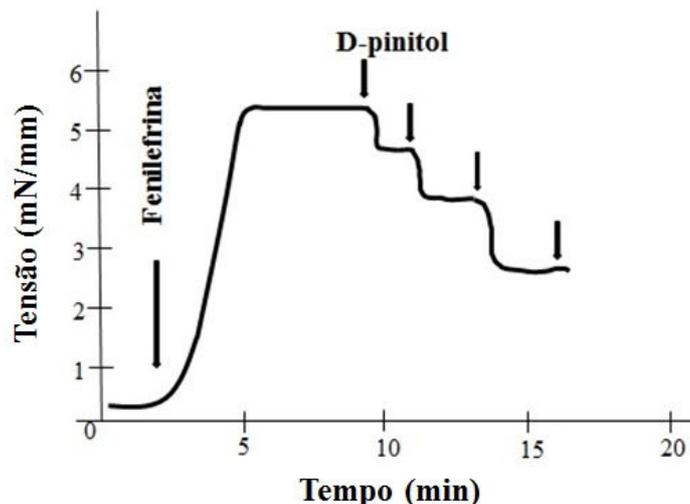


Figura 5: Esquema de curva de relaxamento concentração-resposta induzida pelo D-pinitol em vaso pré-contraído com Phe (3 μ M).

3.4 Avaliação do Papel do Endotélio e de seus Mediadores sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol

Para avaliar a participação do endotélio no efeito vasodilatador, curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas em vasos contendo ou não endotélio funcional e os seus efeitos foram comparados.

Com o objetivo de avaliar a participação do NO na vasodilatação do D-pinitol, anéis da artéria mesentérica com endotélio funcional foram previamente incubados, por 30 minutos, com N^G-nitro L-arginina metil éster (L-NAME; 300 μ M), inibidor não seletivo da NOS (Fukuto et al., 1990) e com 1-(2-trifluorometilfenil) imidazol (TRIM; 300 μ M), inibidor seletivo da nNOS (Handy & Moore, 1997). Em seguida, os vasos foram pré-contraídos com Phe (0,3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas com D-pinitol.

Na avaliação da produção de prostanóides (Swierkosz et al., 1995), foi utilizado indometacina (10 μ M), inibidor não seletivo de ciclooxigenases. Em seguida os vasos foram pré-contraídos com Phe (3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas com D-pinitol.

A participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) na vasodilatação induzida por D-pinitol foi avaliada através de experimentos realizados na ausência e na presença de 1H-[1,2,4]-oxidiazol[4,3-a]-quinoxalin-1-ona (ODQ; 10 μ M), inibidor seletivo desta enzima. Os anéis de artéria mesentérica foram pré-incubados com ODQ por 30 minutos. Em seguida, os vasos foram pré-contraídos com Phe (3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas com D-pinitol.

A fim de avaliar a participação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) sobre o efeito vasodilatador do D-pinitol, os vasos foram incubados com wortmannin (1 μ M), inibidor seletivo dessa enzima, por 30 minutos. Em seguida, os vasos foram pré-contraídos com Phe (3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas com D-pinitol.

3.5 Avaliação da Participação dos Canais TRP's no Efeito Vasodilatador do D-pinitol

Com o objetivo de avaliar a participação dos canais TRP's (potencial receptor transitório) na atividade vasodilatadora dependente do endotélio induzida pelo D-pinitol, o vermelho de rutênio (10 μ M), inibidor não seletivo dos canais TRP's, foi utilizado. Os anéis de artéria mesentérica foram pré-incubados durante 30 minutos com esse inibidor, em seguida, os vasos foram pré-contraídos com Phe (3 μ M) e, após estabilização da

resposta contrátil, foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas com D-pinitol.

3.6 Determinação de Nitrito (NO_2^-) em Artéria Mesentérica de Camundongo

A avaliação da produção de NO em artéria mesentérica foi feita indiretamente pela dosagem de nitrito. Os níveis de nitrito foram dosados pelo método de fluorescência com 2,3-diaminofaleno (DAN), com pequenas modificações do método descrito por Misko e colaboradores (Misko et al., 1993). As ramificações da artéria mesentérica foram acondicionadas em solução salina fisiológica, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5 % CO_2 . Após a coleta do basal a amostra foi estimulada com dose única de D-pinitol (20 μM) ou acetilcolina (10 μM). Foi avaliada a produção de nitrito na presença e na ausência de L-NAME (300 μM) e calmidazolium (10 μM). 150 μl de sobrenadante foram coletados e adicionados de 150 μl de água purificada. Imediatamente foram acrescentados 15 μl da solução estoque de DAN (316 μM em HCl 0,62 M), em poços de microplacas pretas de 96 poços opacos (Costar® 3915, USA). A reação processou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, a reação foi paralisada com 5 μl de NaOH (2,8 M) e a absorbância determinada por espectrofluorímetro (excitação 365 nm, emissão 415 nm; Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific). A concentração de nitrito nas amostras foi calculada com base em uma curva padrão com concentrações pré-determinadas de nitrito de sódio, a cada experimento, e normalizadas pela quantidade de proteína nas ramificações. Os resultados foram expressos em $[\text{NO}_2^-]$ nM/ μg de proteína.

3.7 Determinação do Grau de Fosforilação em Resíduos de Serina e Treonina da eNOS por Western Blot

O leito mesentérico foi dissecado e as artérias mesentéricas foram removidas e livres do tecido conectivo e adiposo. As artérias de 6 animais foram divididas em quatro condições experimentais: sem estímulo e estimuladas com D-pinitol 20 μ M nos tempos 5, 15 e 30 minutos.

Durante o período de incubação, as artérias foram mantidas em solução nutritiva, aquecidas a 37°C e constantemente aeradas com uma mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂). Após o tempo de incubação, as artérias foram congeladas a -20 °C para posterior homogeneização na presença de tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris 50 mM; EDTA.2Na 5 mM; MgCl₂ 1 mM) acrescido de 0,3 % de Triton X-100, 0,5 % de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (Sigma Fast®, Sigma), na proporção de 25 mg de tecido para 100 μ l de tampão de lise enriquecido com o coquetel de inibidores de proteases. Para se evitar a desfosforilação dos resíduos de aminoácidos avaliados, foram acrescidos ao tampão de lise inibidores de fosfatase (NaF 20 mM; Na₃VO₄ 0,1 mM e PMSF 0,1 mM). Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 7200x g por 10 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -80 °C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método Bradford modificado (Bradford, 1976). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS, pH=6.8, 3 % Glicerol, 1 % SDS, 0,6 % β -mercaptoetanol, 0,012% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 30 μ g de proteína em gel de SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida) a 7,5 %. Após serem separadas no gel de poliácridamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore®, USA) com poro de 0,45 μ m. 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 4 horas em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1 % mais 3 % de albumina). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria (6-8 °C), com o anticorpo primário específico diluído em 1,5 % de albumina em TBS-Tween. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-eNOS (1:750; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti β -actina (1:1000; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti-phospho-eNOS-Ser1177 (1:500; policlonal feito em cabra; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA) e anti-phospho-eNOS-Thr495 (1:500; policlonal feito em cabra; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,1 % de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:8000, anti-cabra IgG-HRP e anti-camundongo IgG-HRP, Millipore, Massachusetts, EUA) diluído em 2 % de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por quatro vezes). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ 1.40 g. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD®, CA, USA).

3.8 Preparação das Amostras de D-pinitol e Outras Drogas

O D-pinitol foi obtido da Sigma-Aldrich e diluído em água ultrapurificada, assim como a fenilefrina, acetilcolina, L-NAME, vermelho de rutênio, TRIM e wortmannin. A indometacina foi solubilizada em bicarbonato de sódio 0,05 % e as substâncias ODQ e calmidazolium foram

solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final de DMSO não excedeu 0,01 %.

3.9 Análise Estatística

Os cálculos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 4.03. Os dados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução da contração sustentada induzida pela Phe (3 μ M). As análises estatísticas entre as curvas concentração-resposta cumulativas foram realizadas por análise de variância com dois fatores (two-way ANOVA), seguidas de pós-teste de Bonferroni. O teste t de Student foi utilizado para comparação de pares de resultados. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e considerados significativos os valores de $P < 0,05$. As curvas foram plotadas por regressão não linear.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do Papel do Endotélio Sobre o Efeito Relaxante de D-pinitol

Em artérias mesentéricas, na presença de endotélio funcional, o D-pinitol induziu uma vasodilatação dependente da concentração. Na ausência de endotélio funcional, este efeito vasodilatador foi abolido, como ilustrado na figura 6.

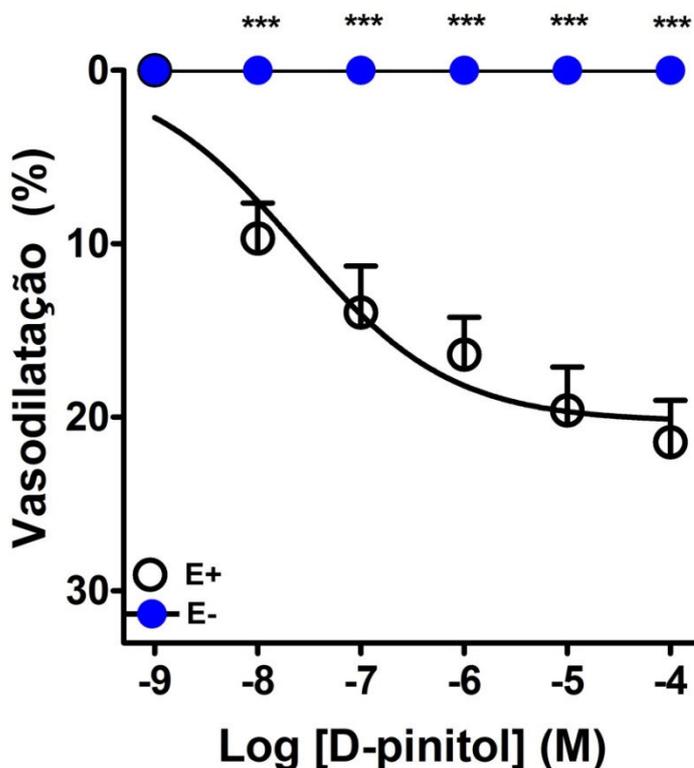


Figura 6: Efeito vasodilatador do D-pinitol na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio funcional. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos. *** $P < 0,001$.

4.2 Avaliação dos Mediadores Endoteliais Sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol

Para verificar os mediadores endoteliais que participariam no efeito vasodilatador do D-pinitol, os vasos contendo endotélio funcional foram pré-incubados com L-NAME (inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase; 300 μ M). Conforme observado na figura 7, o L-NAME aboliu o efeito vasodilatador do D-pinitol.

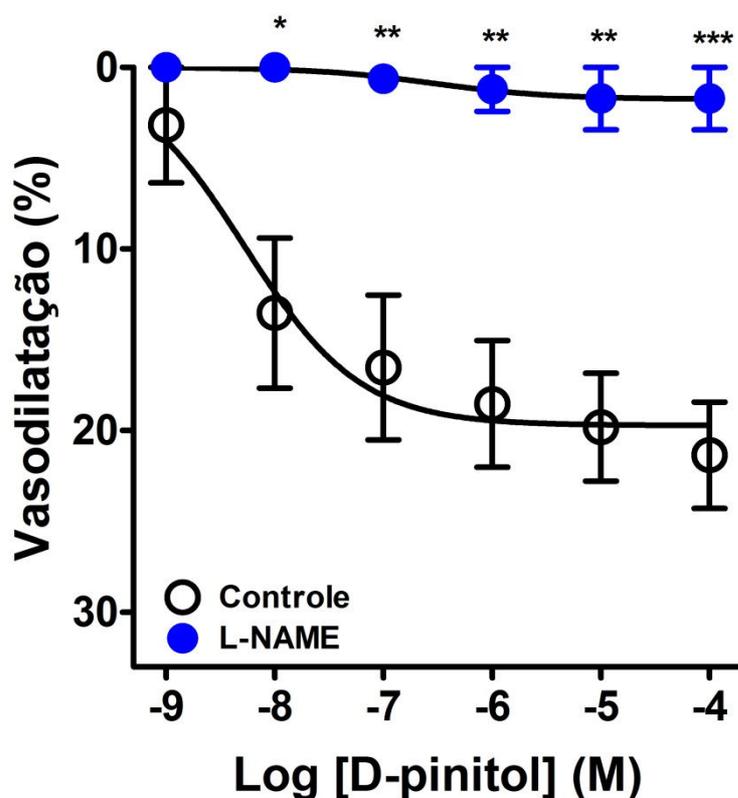


Figura 7: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, em artérias mesentéricas pré-incubadas ou não com L-NAME (300 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 7 experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao controle.

Os anéis de artéria mesentérica contendo endotélio funcional foram incubados com o inibidor não seletivo das ciclooxigenases, indometacina

(10 μM). Conforme foi observado, não ocorreram alterações significativas no efeito vasodilatador do D-pinitol (Figura 8).

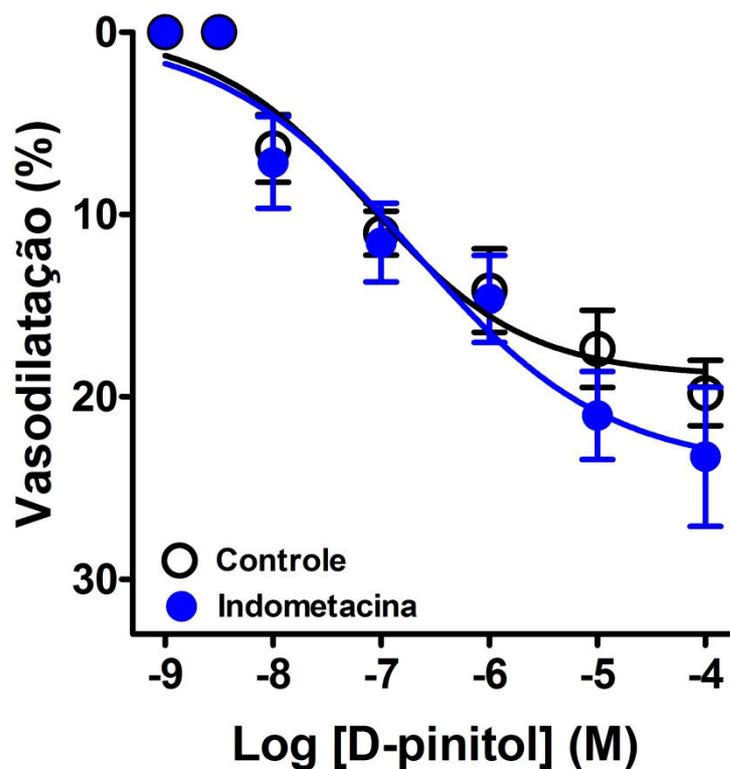


Figura 8: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com indometacina (10 μM). Os resultados representam a média \pm EPM de 7 experimentos.

Para avaliar a participação da nNOS, os vasos foram incubados com TRIM (300 μM), inibidor seletivo desta enzima. Conforme observado na figura 9, não ocorreu deslocamento da curva concentração-resposta do D-pinitol.

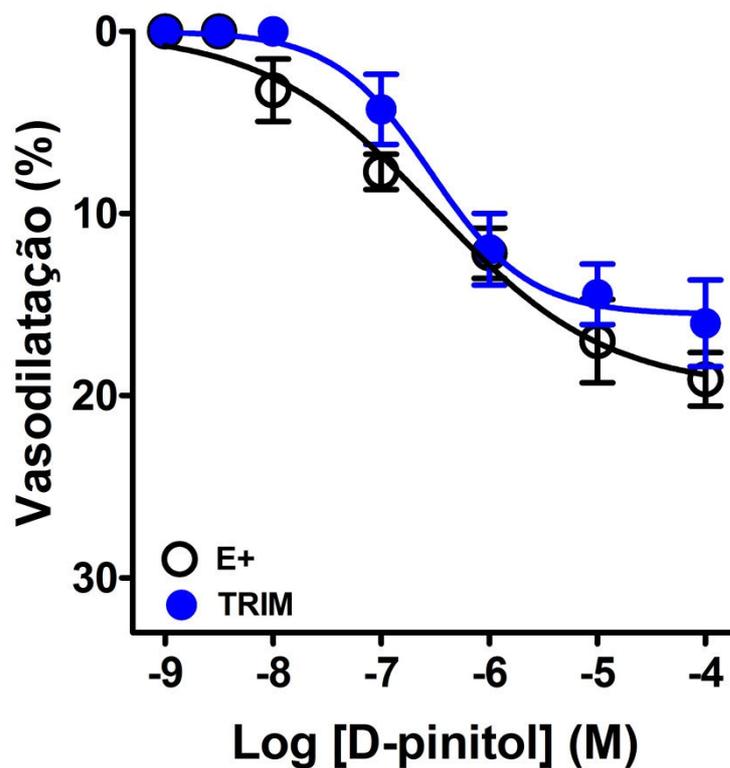


Figura 9: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com TRIM (300 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 7 experimentos.

O ODQ (10 μ M), inibidor da enzima guanilato ciclase, promoveu um deslocamento para a direita da curva concentração-resposta de D-pinitol (figura 10).

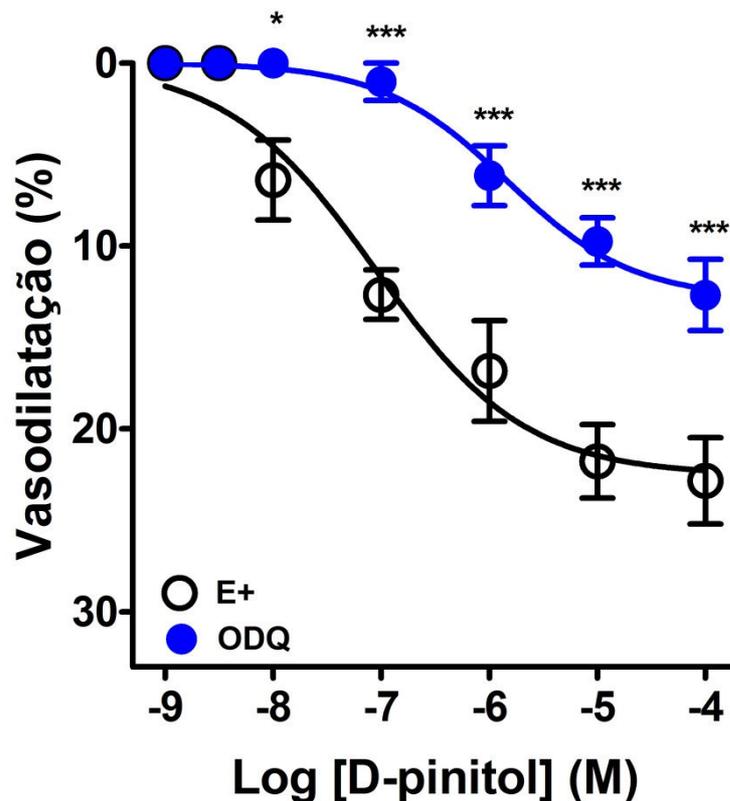


Figura 10: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com ODQ (10 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 7 experimentos. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ em relação ao controle.

4.3 Avaliação da Participação da PI3K Sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol

Com o intuito de avaliar a participação da PI3K, os vasos foram incubados com o inibidor seletivo, wortmannin (1 μ M). De acordo com a figura 11, não ocorreu o deslocamento da curva concentração-resposta do D-pinitol.

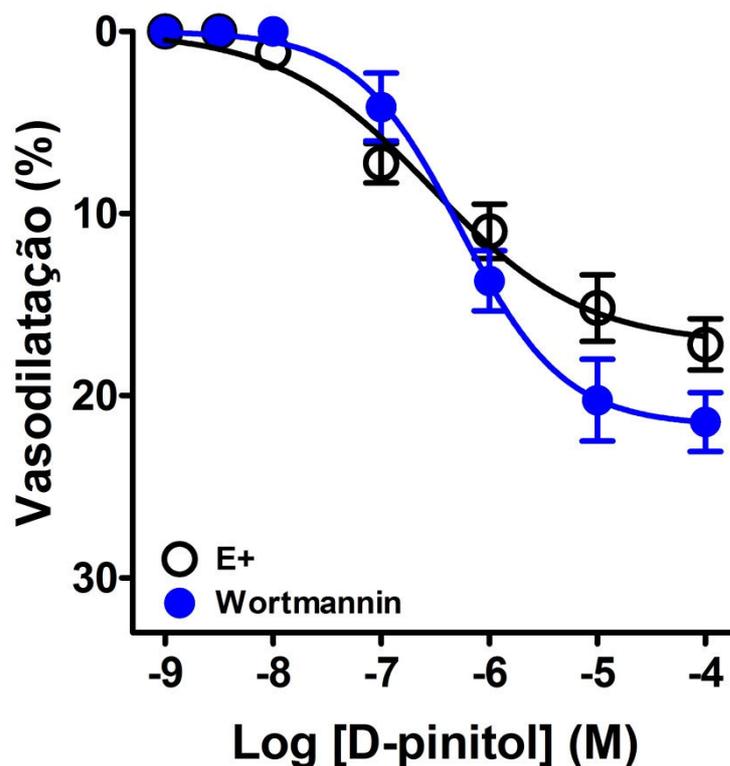


Figura 11: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com wortmannin ($1 \mu\text{M}$). Os resultados representam a média \pm EPM de 6 experimentos.

4.4 Avaliação da Produção de Nitrito Pelo D-pinitol

A produção de nitrito induzido pelo D-pinitol ($20 \mu\text{M}$) e ACH ($10 \mu\text{M}$) foi avaliada na ausência e presença de L-NAME ($300 \mu\text{M}$) e calmidazolium ($10 \mu\text{M}$), um inibidor da calmodulina. Como ilustrado na figura 12, o D-pinitol aumentou a produção basal de nitrito em artérias mesentéricas de camundongo. Este efeito foi abolido na presença de L-NAME e significativamente inibido pelo calmidazolium. O efeito do D-pinitol foi semelhante ao observado com ACH, utilizada como controle positivo (Figura 12).

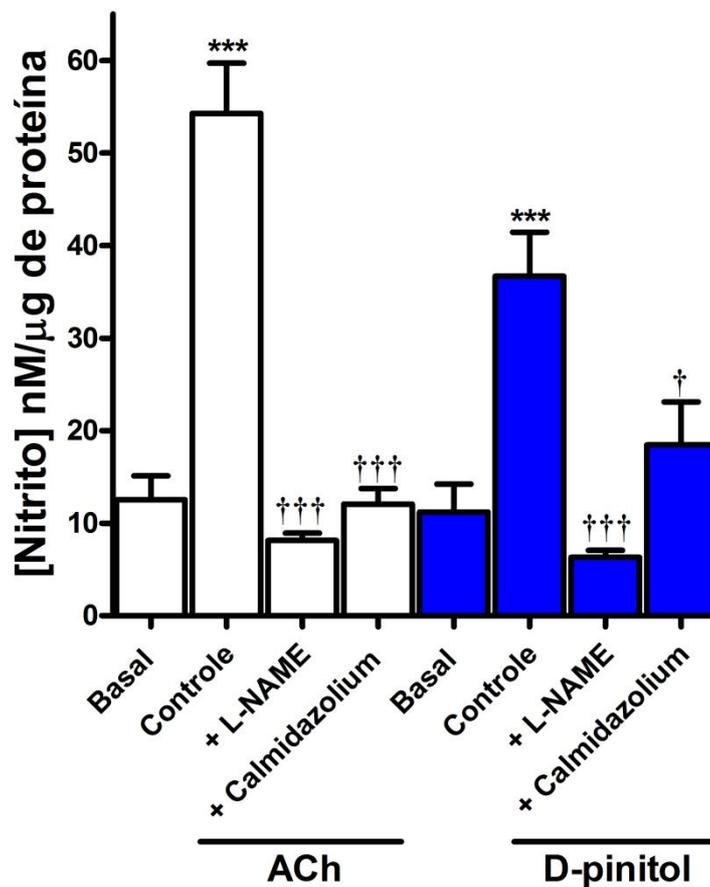


Figura 12: Produção de nitrito em artérias mesentéricas na ausência (basal) ou na presença de D-pinitol (20 μ M) ou ACh (10 μ M), antes e após pré-tratamento com L-NAME (300 μ M) e Calmidazolium (10 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos. *** $P < 0,001$ em relação ao basal, † $P < 0,05$ e ††† $P < 0,001$ em relação ao respectivo controle.

4.5 Avaliação da Participação dos Canais TRP's Sobre o Efeito Vasodilatador do D-pinitol

Foi avaliado o papel do vermelho de rutênio 10 μ M, inibidor não seletivo dos canais TRP's, e conforme observado na figura 13, não ocorreu alteração significativa na curva concentração-resposta do D-pinitol.

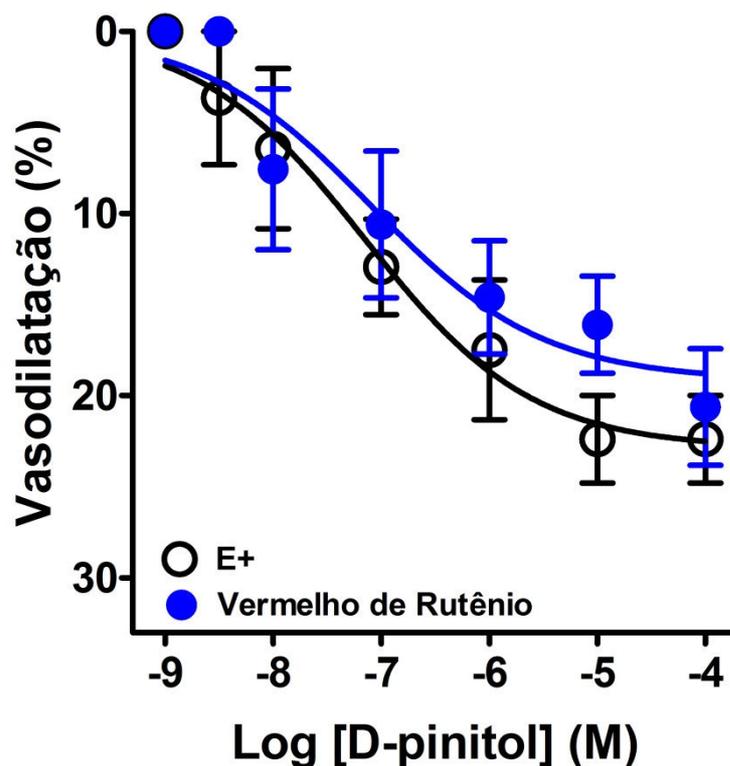


Figura 13: Efeito vasodilatador do D-pinitol com endotélio funcional, pré-incubados ou não com vermelhão de rutênio (10 μ M). Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos.

4.6 Determinação do Grau de Fosforilação em Resíduos de Serina e Treonina da eNOS por Western Blot

Conforme observado na figura, ocorre um aumento no nível de fosforilação no sítio de Ser1177 da eNOS (Figura 14A) com os vasos estimulados com D-pinitol em 5 e 15 minutos e uma diminuição no sítio de Thr495 (Figura 14B) em 15 e 30 minutos, sugerindo um aumento na atividade dessa enzima.

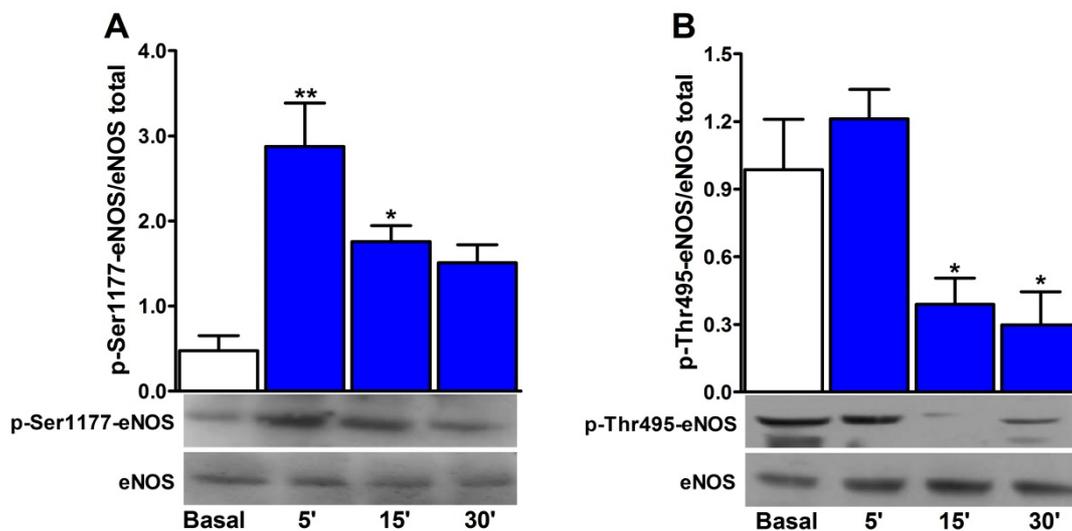


Figura 14: Efeito do estímulo com D-pinitol sobre o nível de fosforilação da eNOS em resíduos de Ser1177 (A) e de Thr495 (B). As imagens são representativas de 4 experimentos. Os resultados representam a média \pm EPM de 4 experimentos. * $P < 0,05$ em ao respectivo controle.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstramos que o D-pinitol apresenta um efeito vasodilatador, concentração-dependente, via ativação da liberação de NO endotelial, por um mecanismo dependente da ativação do complexo cálcio-calmodulina em artéria mesentérica de camundongo.

Estudos anteriores com o D-pinitol demonstraram que este ciclitol apresenta efeitos anti-inflamatório (Singh et al., 2001; Sethi et al., 2008), antioxidante, hipoglicemiante e protetor do endotélio vascular em modelo animal de diabetes (Bates et al., 2000; Nascimento et al., 2006; Sivakumar & Subramanian, 2009). O presente trabalho contribui para o conhecimento sobre os efeitos biológicos do D-pinitol demonstrando o seu efeito vasodilatador. Este efeito foi relativamente pequeno, entre 20-30 %, no entanto, este efeito é compatível com o de outros mediadores vasodilatadores, como a angiotensina-(1-7) (Neves et al., 2003; Lemos et al., 2005) e substância P (Bény & Brunet, 1988) que representam um importante papel no controle do tônus vascular. Além disso, o D-pinitol mostrou um efeito vasodilatador significativo a partir de 100 nM. Este nível de concentração é relativamente baixo, uma vez que este ciclitol é utilizado em doses altas, entre 600 e 1200 mg/dia, e alcança concentrações plasmáticas superiores a 1 μ M (Campbell et al., 2004; Kim et al., 2005; Kang et al., 2006). Portanto, é plausível pensar que as concentrações utilizadas no presente trabalho sejam alcançadas na circulação sistêmica durante o tratamento crônico com doses terapêuticas do D-pinitol.

A remoção do endotélio aboliu o efeito vasodilatador do D-pinitol, demonstrando a importância da presença de um endotélio funcional e, conseqüentemente, da liberação dos EDRF's para o efeito deste fármaco. O endotélio desempenha um importante papel no sistema cardiovascular. Ele

funciona como uma barreira semipermeável entre o sangue e a parede do vaso, que regula funções vitais como o tônus vascular, resposta a estímulos inflamatórios e a coagulação sanguínea (Triggle et al., 2003; Aird, 2007; Otsuka et al., 2012). O controle da homeostase e do tônus vascular pelo endotélio é devido à síntese e liberação de mediadores como o NO, prostaciclina e de outros EDRF's que induzem hiperpolarização (EDH) do músculo liso vascular, tais como H_2O_2 e ácidos epxoieicosatrienoicos (Medhora et al., 2001; Matoba et al., 2002; Chadha et al., 2011). Destes, o NO tem sido considerado como o principal EDRF (Bredt & Snyder, 1994). Uma vez formado, o NO se difunde para a camada de células musculares lisas e promove relaxamento através da ativação da guanilato ciclase solúvel. Esta por sua vez leva a produção de um nucleotídeo cíclico, o GMPc. Os nucleotídeos cíclicos, tanto o AMPc quanto o GMPc levam a um relaxamento vascular através da ação sobre a ativação das respectivas proteínas quinases, a proteína quinase A (PKA) e proteína quinase G (PKG) (Dostmann et al., 2002; Krumenacker et al., 2004; Fleming, 2008). Estas enzimas induzem um relaxamento da fibra muscular lisa através de um conjunto de ações: ativação de canais de potássio (Sobey, 2001), aumento da recaptção de Ca^{2+} através da ativação de bombas recaptadoras dependentes do ATP, Ca^{2+} -ATPase (SERCA), que levam o cálcio livre tanto para dentro dos estoques intracelulares quanto para fora da célula (Adachi et al., 2004) ou podem ainda levar a uma fosforilação da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), inativando-a (Krumenacker et al., 2004). A pré-incubação dos anéis de artéria mesentérica com endotélio funcional com L-NAME praticamente aboliu o efeito vasorrelaxante do D-pinitol, sugerindo que o efeito vasodilatador deste ciclitol é dependente da formação de NO, (Figura 15).

A prostaciclina (PGI_2) é um membro da família dos prostanóides também conhecida como um EDRF (Vane & Corin, 2003). A PGI_2 é o

principal produto do metabolismo do ácido araquidônico via ciclooxigenase nas células endoteliais. Este eicosanoide induz o relaxamento da musculatura lisa vascular e inibição da função plaquetária, através da ativação de receptores IP presentes nas células musculares lisas, levando a um aumento de AMPc na fibra muscular (Vane & Corin, 2003; Majed & Khalil, 2012). Na presença de indometacina, inibidor não seletivo das ciclooxigenases, não ocorreram alterações significativas na curva concentração-resposta do D-pinitol. Este resultado sugere que a atividade vasorrelaxante não depende de derivados da ciclooxigenases liberados pelo endotélio.

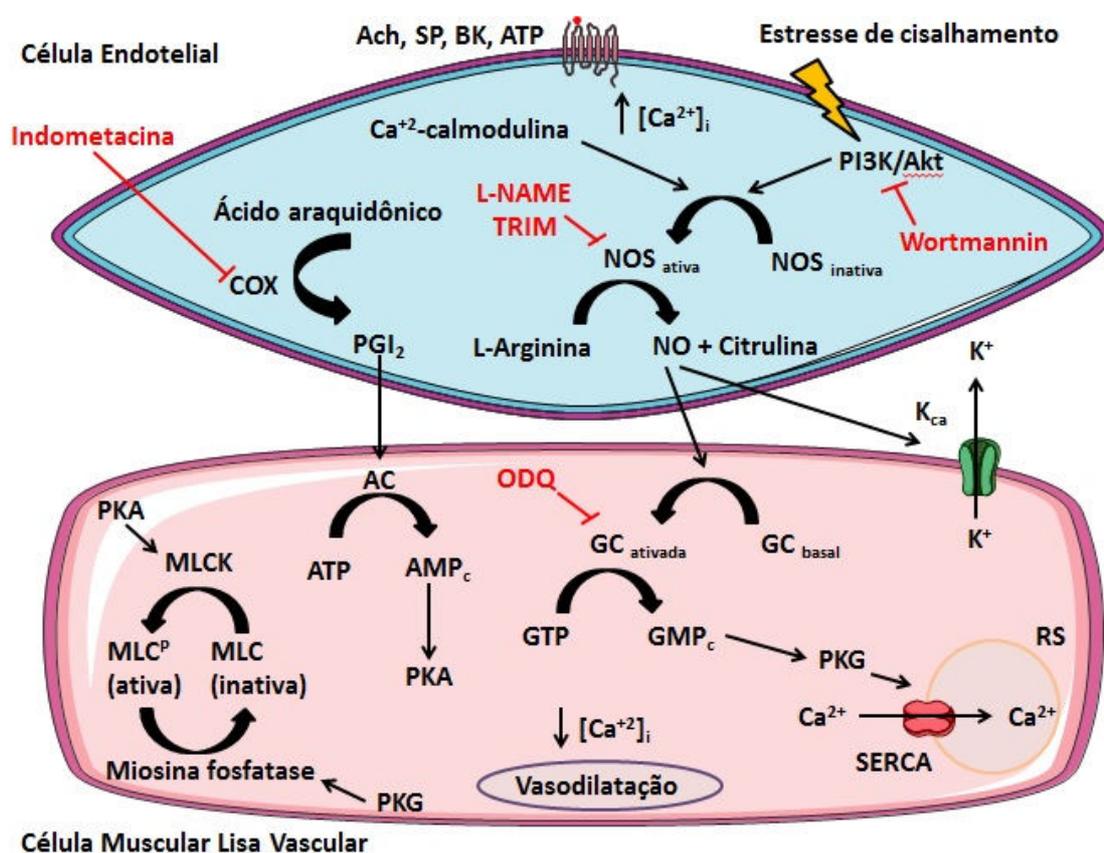


Figura 15: Esquema representativo dos mecanismos e procedimentos farmacológicos utilizados na investigação do efeito vasodilatador do D-pinitol em artéria mesentérica de camundongo.

A nNOS encontra-se nos neurônios onde se concentra as sinapses neuronais. Ela também é encontrada no músculo esquelético, músculo liso vascular e miocárdio (Förstermann et al., 1994; Melikian et al., 2009). Sua atividade é regulada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina e por fosforilação em diferentes resíduos (Fleming, 2008). Vários trabalhos de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a nNOS está presente no endotélio de aorta de camundongo e contribui para o efeito vasodilatador da acetilcolina (Capettini et al., 2010, 2011). Por este motivo, decidimos verificar se esta enzima também contribuía para o efeito vasodilatador do D-pinitol. Em artérias mesentéricas pré-incubadas com TRIM, inibidor seletivo da nNOS (Handy & Moore, 1997), a curva concentração-efeito do D-pinitol não foi alterada. Este resultado sugere que a nNOS não participa do efeito vasodilatador do D-pinitol em artérias mesentéricas.

Para reforçar a hipótese da participação do NO endotelial no efeito vasodilatador do D-pinitol a ativação da guanilato ciclase (GC) solúvel foi investigada com o seu inibidor seletivo, o ODQ (Figura 15). A GC possui um grupamento heme em seu sítio regulatório, ativado pelo NO através da transferência de elétrons ao domínio redutase do grupamento heme. O ODQ promove a oxidação do grupamento heme da GC e impede a sua ativação pelo NO (Schmidt et al., 2012). Artérias tratadas com ODQ apresentaram um deslocamento significativo da curva concentração-resposta do D-pinitol para a direita. Desta forma, estes resultados confirmam a participação do NO.

A eNOS pode ser ativada por mecanismos dependente e independente de cálcio (Figura 15). A ativação da eNOS e consequente aumento na produção de NO, por um mecanismo independente de cálcio, ocorre através da via de sinalização da PI3K/Akt, resultando na fosforilação do resíduo de Ser1177 da eNOS (Dimmeler et al., 1999; Fulton

et al., 1999; Gallis et al., 1999; Kumar et al., 2010). O wortmannin, um inibidor seletivo de PI3K (Arcaro & Wymann, 1993), evita a fosforilação e ativação da Akt e inibe o aumento dos níveis de GMPc no músculo liso vascular (Dimmeler et al., 1999). O wortmannin não alterou significativamente o efeito vasodilatador do D-pinitol, sugerindo que a ativação da eNOS não ocorre pela ativação da via PI3K/Akt.

O mecanismo de ativação da eNOS dependente de cálcio ocorre pela formação do complexo cálcio-calmodulina (Matsubara et al., 1996; Fleming, 2010). A formação deste complexo é inibida por inibidores seletivos de calmodulina, tal como calmidazolium (Sunagawa et al., 2000). Inicialmente, o calmidazolium foi testado no efeito vasodilatador do D-pinitol. No entanto, este inibidor aboliu o efeito contrátil da fenilefrina impedindo a utilização deste procedimento experimental. Por este motivo, foi decidido observar o efeito do calmidazolium na formação de NO, indiretamente inferida pela dosagem de nitritos, em artérias mesentéricas incubadas com D-pinitol. Na presença de D-pinitol, ocorreu um aumento significativo na produção de nitrito, que foi inibido por L-NAME e calmidazolium. Desta forma, a participação da eNOS e do complexo foram respectivamente confirmados.

O aumento da concentração intracelular de cálcio responsável pela ativação da eNOS pode ocorrer da liberação dos estoques intracelulares ou do influxo de cálcio nas células endoteliais (Fleming, 2010; Förstermann & Sessa, 2012). Os canais potencial receptor transitório (TRP) são considerados canais não seletivos e permitem o influxo cálcio, sódio e magnésio (Pedersen et al., 2005; Owsianik et al., 2006). Estão relacionados com o controle da função vascular incluindo a permeabilidade endotelial (Tirupathi et al., 2006), resposta ao estresse oxidativo (Hecquet et al., 2008), tônus miogênico (Earley et al., 2004), atividade proliferativa celular (Ge et al., 2009) e termorregulação (Hamada et al., 2008). Os TRP's

são ativados por diversos estímulos incluindo a depleção dos estoques de cálcio, alterações mecânicas, de temperatura e osmolaridade, além da ativação de receptores acoplados a proteínas G (Di et al., 2010, Rubinstein et al., 2014). No presente estudo, a participação dos canais TRP no efeito vasodilatador do D-pinitol foi avaliada. As artérias mesentéricas foram incubadas com vermelho de rutênio, inibidor não seletivo dos TRP (Amann & Maggi, 1991), e nenhuma alteração significativa foi observada na curva concentração-efeito do D-pinitol. Este resultado permite descartar a hipótese da participação de TRP's. Portanto, o mecanismo de ativação de eNOS dependente de cálcio induzida pelo D-pinitol pode estar relacionado com a liberação de estoques intracelulares de cálcio ou com o influxo de cálcio por outros canais.

Nascimento e colaboradores (2006) sugeriram que o aumento da concentração de NO em animais diabéticos era uma consequência do efeito antioxidante dos vários inositóis testados, inclusive o D-pinitol. Considerando que observamos que o aumento da concentração de NO induzido por D-pinitol era dependente da função da calmodulina e, conseqüentemente, da formação do complexo cálcio-calmodulina, parecia evidente que o D-pinitol era capaz de ativar a eNOS. Portanto, o efeito antioxidante não parecia ser o único efeito relacionado ao aumento de NO. Por este motivo, investigar a ativação da eNOS pelo D-pinitol foi o próximo passo. Um procedimento bem aceito para a verificação da ativação da eNOS é pela análise da fosforilação dos sítios de ativação e inativação dessa enzima por Western blot (Capettini et al., 2011, Aires et al., 2013). Quanto maior o nível de fosforilação no resíduo de Ser1177, mais ativa estará a eNOS. Por outro lado, quanto maior a fosforilação em Thr495, menos ativa essa proteína se encontra (Fleming et al., 2001). De acordo com o resultado, verificamos uma cinética diferente entre os sítios de fosforilação da eNOS. O D-pinitol aumentou a fosforilação dos sítios de

Ser1177 nos primeiros 15 minutos de estimulação, enquanto reduziu a fosforilação dos sítios de Thr495 mais tardiamente. Esses resultados sugerem uma ativação de uma quinase capaz de ativar o resíduo de Ser1177, que conforme resultados funcionais com o wortmannin, não é dependente via PI3K. Trabalhos sugerem que outras quinases são capazes de fosforilar Ser1177, tais como AKT1, PKA (Förstermann & Sessa, 2012), AMPK (Fisslthaler & Fleming, 2009) e CaMKII (Schneider et al., 2003). Considerando que o inibidor de calmodulina foi capaz de inibir o efeito vasodilatador do D-pinitol, a participação da CaMKII parece ser o mais provável mecanismo. Em relação ao sítio de Thr 495, os resultados sugerem a ativação de uma fosfatase. Trabalhos na literatura sugerem que a proteína fosfatase 1 (PP1) é capaz de desfosforilar o resíduo de Thr495 e possivelmente o D-pinitol pode atuar na ativação da PP1(Fleming et al., 2001). Dessa forma, a ativação direta da eNOS pelo D-pinitol é o provável mecanismo envolvido no seu efeito vasodilatador.

6 CONCLUSÃO

Diante dos principais resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o D-pinitol apresenta um efeito vasodilatador, dependente do endotélio, da ativação da eNOS e da formação de NO por um mecanismo que envolve o complexo cálcio-calmodulina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi T., Weisbrod R. M., Pimentel D. R., Ying J., Sharov V. S., Schöneich C., Cohen R. A. **S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide.** *Nature Medicine*, v. 10 (11), p. 1200-1207, 2004.

Agyemang C., Bhopal R. **Hypertension and cardiovascular disease endpoints by ethnic group: The promise of data linkage.** *Heart*, v. 99 (10), p. 675-676, 2013.

Aird W. C. **Phenotypic heterogeneity of endothelium: I. structure, function, and mechanisms.** *Circulation Research*, v. 100, p. 158-173, 2007.

Aires R. D., Capettini L. S. A., Silva J. F., Rodrigues-Machado M. G., Pinho V., Teixeira M. M., Cortes S. F., Lemos V. S. **Paraquat poisoning induces TNF- α -dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats.** *Plos One*, v. 8, p. e73562, 2013.

Akata T. **Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone: Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone.** *Journal of Anesthesia*, v. 21, p. 220-231, 2007.

Akata T. **Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone: Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells.** *Journal of Anesthesia*, v. 21, p. 232-242, 2007.

Almeida M. V., Silva A. D., Souza M. V. N., Benício A. A. A. **A cascata dos fosfoinosítídeos.** Química Nova, v. 26 (1), p. 105-111, 2003.

Amann R., Maggi C. A. **Ruthenium red as a capsaicin antagonist.** Life Sciences, v. 49, p. 849-856, 1991.

Arcaro A., Wymann M. P. **Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses.** Biochemical Journal, v. 296, p. 297-301, 1993.

Bates S. H., Jones R. B., Bailey C. J. **Insulin-like effect of pinitol.** British Journal of Pharmacology, v. 130, p. 1944-1948, 2000.

Bény J. L., Brunet P. C. **Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta.** Journal of Physiology, v. 398, p. 277-289, 1988.

Berridge M. J. **Smooth muscle cell calcium activation mechanisms.** The Journal of Physiology, v. 586.21, p. 5047-5061, 2008.

Bradford M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

Bredt D. S., Snyder S. H. **Nitric oxide: A physiologic messenger molecule.** Annual Review of Biochemistry, v. 63, p. 175-195, 1994.

Campbell W. W., Haub M. D., Fluckey J. D., Ostlund R. E. Jr., Thyfault J. P., Morse-Carrithers H., Hulver M. W., Birge Z. K. **Pinitol**

supplementation does not affect insulin-mediated glucose metabolism and muscle insulin receptor content and phosphorylation in older humans. Journal of Nutrition. v. 34, p. 2998-3003, 2004.

Capettini L. S. A., Cortes S. F., Alvarez-Leite J. I., Lemos V. S. **Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis.** British Journal of Pharmacology, v. 164, p. 1738-1748, 2011.

Capettini L. S. A., Cortes S. F., Lemos V. S. **Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta.** European Journal of Pharmacology, v. 643, p. 260-266, 2010.

Carlomagno G., Unfer V. **Inositol safety: clinical evidences.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v. 15, p. 931-936, 2011.

Chadha P. S., Liu L., Rikard-Bell M., Senadheera S., Howitt L., Bertrand R. L., Grayson T. H., Murphy T. V., Sandow S. L. **Endothelium-dependent vasodilation in human mesenteric artery is primarily mediated by myoendothelial gap junctions intermediate conductance calcium-activated K^+ channel and nitric oxide.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. v. 336 (3), p. 701-708, 2011.

Chatterjee A., Catravas J. D. **Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation.** Vascular Pharmacology, v. 49, p. 134-140, 2008.

Chiang P. C. C., Lamoureux E. L., Shankar A., Tai, E. S., Wong T. Y., Sabanayagam C. **Cardio-metabolic risk factors and prehypertension in persons without diabetes, hypertension, and cardiovascular disease.** BMC Public Health, v. 13, p. 730, 2013.

Choi M. S., Lee M. K., Jung U. J., Kim H. J., Do G. M., Park Y. B., Jeon S. M. **Metabolic response of soy pinitol on lipid-lowering, antioxidant and hepatoprotective action in hamsters fed-high fat and high cholesterol diet.** Molecular Nutrition & Food Research, v. 53, p. 751-759, 2009.

Cragg G. M., Newman D. J. **Natural products: A continuing source of novel drug leads.** Biochimica et Biophysica Acta, Review, p. 3670-3695, 2013.

Croze M. L., Soulage C. O. **Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases.** Biochimie, v. 95, p. 1811-1827, 2013.

Dang N. T., Mukai R., Yoshida K., Ashida H. **D-pinitol and myo-inositol stimulate translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of C57BL/6 mice.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 74 (5), p. 1062-1067, 2010.

Davis A., Christiansen M., Horowitz J. F., Klein S., Hellerstein M. K., Ostlund Jr R. E. **Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance.** Diabetes Care, v. 23 (7), p. 1000-1005, 2000.

Davis M. J., Hill M. A. **Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response.** Physiological Reviews, v. 79 (2), p. 387-423, 1999.

Di A., Malik A. B. **TRP channels and the control of vascular function.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 10, p. 127-132, 2010.

Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A. M., **Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.** *Nature*, v. 399, p. 601-605, 1999.

Dostmann W. R. G., Tegge W., Frank R., Nickl C. K., Taylor M. S., Brayden J. E. **Exploring the mechanisms of vascular smooth muscle tone with highly specific, membrane-permeable inhibitors of cyclic GMP-dependent protein kinase I α .** *Pharmacology & Therapeutics*, v. 93, p. 203-215, 2002.

Earley S., Waldron B. J., Brayden J. E. **Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries.** *Circulation Research*, v. 95, p. 922-929, 2004.

Félétou M., Vanhoutte P. M. **Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle.** *British Journal of Pharmacology*, v. 93, p. 515-524, 1988.

Ferrari A. U., Radaelli A., Centola M. **Invited Review: Aging and the cardiovascular system.** *Journal of Applied Physiology*, v. 95, p. 2591-2597, 2003.

Fisslthaler B., Fleming I. **Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells.** *Circulation Research*, v. 105, p. 114-127, 2009.

Fleming I. **Biology of nitric oxide synthases.** Microcirculation, Cap. 3, p. 56-80, 2008.

Fleming I. **Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS.** European Journal of Physiology, v. 459, p. 793-806, 2010.

Fleming I., Fisslthaler B., Dimmeler S., Kemp B. E., Busse R. **Phosphorylation of Thr⁴⁹⁵ regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity.** Circulation Research, v. 88, p. e68-e75, 2001.

Förstermann U., Closs E. I., Pollock J. S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. **Nitric oxide synthases isozymes: Characterization, purification, molecular cloning, and functions.** Hypertension, v. 23 (6), p. 1121-1131, 1994.

Förstermann U., Sessa W. C. **Nitric oxide synthases: regulation and function.** European Heart Journal, v. 33, p. 829-837, 2012.

Fukuto J. M., Wood K. S., Byrns R. E. , Ignarro L. J. **N^G-amino-L-arginine: a new potent antagonist of L-arginine-mediated endothelium-dependent relaxation.** Biochemical Biophysical Research Communications, v. 168, p. 458-465, 1990.

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.

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

Freeman, R. **Neurogenic orthostatic hypotension.** New England Journal of Medicine, v. 358 (6), p. 615-624, 2008.

Gallis B., Corthals G. L., Goodlett D. R., Ueba H., Kim F., Presnell S. R., Figeys D., Harrison D. G., Berk B. C., Aebersold R., Corson M. A., **Identification of flow-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor LY294002.** The Journal of Biologic Chemistry, v. 274 (42), p. 30101-30108, 1999.

Ge R., Tai Y., Sun Y., Zhou K., Yang S., Cheng T., Zou Q., Shen F., Wang Y. **Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis.** Cancer Letters, v. 283, p. 43-51, 2009.

Geethan P. K. M. A., Prince P. S. M. **Antihyperlipidemic effect of D-pinitol on streptozotocin-induced diabetic wistar rats.** Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, v. 22 (4), p. 220-224, 2008.

Gottlieb S., Brauns F.E. **Occurrence of D-pinitol in red spuce (*Picea rubra*).** This Journal, v. 73, p. 5880, 1951.

Halberstein R.A. **Medicinal Plants: Historical and cross-cultural usage patterns.** Annals of Epidemiology, v. 15, p. 686-699, 2005.

Hamada F. N., Rosenzweig M., Kang K., Pulver S. R., Ghezzi A., Jegla T. J., Garrity P. A. **An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila***. *Nature*, v. 454, p. 217-220, 2008.

Handy R. L. C., Moore P. K. **Mechanism of the inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM)**. *Life Science*, v. 60, p. 389-494, 1997.

Hecquet C. M., Ahmmed G. U., Vogel S. M., Malik A. B. **Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability**. *Circulation Research*, v. 102, p. 347-355, 2008.

Ho P. M., Zeng C., Tavel H. M., Selby J. V., O'Connor P. J., Margolis K. L., Magid D. J. **Trends in first-line therapy for hypertension in the cardiovascular research network hypertension registry, 2002-2007**. *Archives of Internal Medicine*, v. 170 (10), p. 912-913, 2010.

Huang W., Alexander G. E., Daly E. M., Shetty H. U., Krasuski J. S., Rapoport S. I., Schapiro M. B. **High brain myo-inositol levels in the predementia phase of Alzheimer's disease in adults with Down's syndrome: A ¹H MRS study**. *The American Journal of Psychiatry*, v. 156, p. 1879-1886, 1999.

Kang M. J., Kim J. I., Yoon S. Y., Kim J. C., Cha I. J. **Pinitol from soybeans reduces postprandial blood glucose in patients with type II diabetes mellitus**. *Journal of Medicine Food*, v. 9 (2), p. 182-186, 2006.

Kauffmanstein G., Laher I., Matrougui K., Guérineau N. C., Henrion D. **Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone.** Cardiovascular Research, v. 95, p. 223-232, 2012.

Kim H. J., Park K. S., Lee S. K., Min K. W., Han K. A., Kim Y. K., Ku B. J. **Effects of pinitol on glycemic control, insulin resistance and adipocytokine levels in patients with type 2 diabetes mellitus.** Annals of Nutrition and Metabolism, v. 60, p. 1-5, 2012.

Kim J. I., Kim J. C., Kang M. J., Lee M. S., Kim J. J., Cha I. J. **Effects of pinitol isolated from soybeans on glicaeamic control and cardiovascular risk factors in korean patients with type II diabetes mellitus: A randomized controlled study.** European of Journal of Clinical Nutrition, v. 59, p. 456-458, 2005.

Krumenacker J. S., Hanafy K. A., Murad F. **Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase.** Brain Research Bulletin, v. 62, p. 505–515, 2004.

Ku D. N. **Blood flow in arteries.** Annual Review of Fluid Mechanics, v. 29, p. 399-434, 1997.

Kumar S., Sud N., Fonseca F. V., Hou Y., Black S.M. **Shear stress stimulates nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells via a reduction in catalase activity: Role of protein kinase C δ .** American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 298, p. L105-L116, 2010.

Lahuta L. B., Goszczyn'ska J., Horbowicz M., Hołdyn'ski C., Go'recki R. **J. Cyclitols affect accumulation of a-D-galactosides in developing vicia seeds.** *Acta Physiologiae Plantarum*, v.32, p. 933-942, 2010.

Ledoux J., Werner M. E., Brayden J. E., Nelson M. T. **Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone.** *Physiology*, v. 21, p. 69-79, 2006.

Lee J. S., Lee C. M., Jeong Y. I., Jung I. D., Kim B. H., Seong E. Y., Kim J. I., Choi I. W., Chung H. Y., Park Y. M. **D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma.** *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 581, p. 57-64, 2007.

Lemos V. S., Silva D. M. R., Walther T., Alenina N., Bader M., Santos R. A. S. **The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang (1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of Mas-knockout mice.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 46 (3), p. 274-279, 2005.

Li H., Poulos T. L. **Structure-function studies on nitric oxide synthases.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 99, p. 293-305, 2005.

Loizzo M. R., Tundis R., Menichini F., Statti G. A., Menichini F. **Hypotensive natural products: Current status.** *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, v. 8, p. 828-855, 2008.

Majed B. H., Khalil R. A. **Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn.** *Pharmacological Reviews*, v. 64, p. 540-582, 2012.

Mantovani A., Bussolino F., Dejana E. **Cytokine regulation of endothelial cell function.** Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 6, p. 2591-2599, 1992.

Matoba T., Shimokawa H., Kubota H., Morikawa K., Fujiki T., Kunihiro I., Mukai Y., Hirakawa Y., Takeshita A. **Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 290 (3), p. 909-913, 2002.

Matsubara M., Titani K., Taniguchi H. **Interaction of calmodulin-binding domain peptides of nitric oxide synthase with membrane phospholipids: Regulation by protein phosphorylation and Ca^{2+} -calmodulin.** Biochemistry, v. 35, p. 14651-14658, 1996.

McCarron D. A. **Calcium in the pathogenesis and therapy of human hypertension.** The American Journal of Medicine, v. 78, p. 27-34, 1985.

Medhora M., Narayanan J., Harder D., Maier K. G. **Identifying endothelium-derived hyperpolarizing factor: Recent approaches to assay the role of epoxyeicosatrienoic acids.** The Japanese Journal of Pharmacology, v. 86, p. 369-375, 2001.

Melikian, N., Seddon, M. D., Casadei, B., Chowienczyk, P. J., Shah, A. M. **Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation.** Trends in Cardiovascular Medicine, v. 19 (8), p. 256-262, 2009.

Michiels C. **Endothelial cell functions.** Journal of Cellular Physiology, v. 196, p. 430-443, 2003.

Misko T. P., Schilling R. J., Salvemini, D., Moore W. M., Currie M. G. **A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples.** Analytical Biochemistry, v. 214 (1), p. 11-16, 1993.

Moncada S., Gryglewski R., Bunting S., Vane J. R. **An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.** Nature, v. 263, p. 663-665, 1976.

Mosquera D. M. G, Ortega Y. H., By B., Muro L. V., Hernandez Y. S., Ábalos R. G., Dehaen W., Pieters L., Apers S. **Antihyperglycemic activity of extracts from *Boldoa purpurascens* leaves in alloxan-induced diabetic rats.** Phytotherapy Research, v. 27, p. 721-724, 2013.

Muller W. A. **Leukocyte endothelial cell interactions in the inflammatory response.** Laboratory Investigation, v. 82 (5), p. 521-533, 2002.

Mulvanny M. J., Halpern W. **Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats.** Circulation Research, v. 41, p. 19-26, 1977.

Nascimento N. R. F., Lessa L. M. A., Kerntopf M. R., Sousa C. M., Alves R. S., Queiroz M. G. R., Price J., Heimark D. B., Larner J., Du X., Brownlee M., Gow A., Davis C., Fonteles M. C. **Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103 (1), p. 218-223, 2006.

Neves L. A. A., Averill D. B., Ferrario C. M. Chappell M. C. Aschner J. L., Walkup M. P., Brosnihan K. B. **Characterization of angiotensin-(1-7) receptor subtype in mesenteric arteries.** Peptides, v. 24, p. 455-462, 2003.

Ostlund R. E., Sherman W. R. **Pinitol and derivatives thereof for the treatment of metabolic disorders.** United States Patent. Patent number: 5,550,166, 1996.

Otsuka F., Finn A. V., Yazdani S. K., Nakano M., Kolodgie F. D., Virmani R. **The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting.** Nature Reviews Cardiology, v. 9, p. 439-453, 2012.

Owsianik G., Talavera K., Voets T., Nilius B. **Permeation and selectivity of TRP channels.** Annual Review of Physiology, v. 68, p. 685-717, 2006.

Pearson J. D. **Endothelial cell function and thrombosis.** Baillières Clinical Haematology, v. 12 (3), p. 329-341, 1999.

Pedersen S. F., Owsianik G., Nilius B. **TRP channels: An overview.** Cell Calcium, v. 38, p. 233-252, 2005.

Sunagawa M., Kosugi T., Nakamura M., Sperelakis N. **Pharmacological actions of calmidazolium, a calmodulin antagonist, in cardiovascular system.** Cardiovascular Drug Reviews, v. 18 (3), p. 211-221, 2000.

Pohl U., De Wit C., Gloe T. **Large arterioles in the control of blood flow: Role of endothelium-dependent dilation.** Acta Physiologica Scandinavica, v. 168, p. 505-510, 2000.

Rosen G. M., Tsai P., Weaver J., Porasuphatana S., Roman L. J., Starkov A. A., Fiskum G., Pou S. **The role of tetrahydrobiopterin in the regulation of neuronal nitric-oxide synthase-generated superoxide.** The Journal of Biological Chemistry, v. 277 (43), p. 40275-40280, 2002.

Rubinstein J., Lasko V. M., Koch S. E., Singh V. P., Carreira V., Robbins N., Patel A. R., Jiang M., Bidwell P., Kranias E. G., Jones W. K., Lorenz J. N. **Novel role of transient receptor potential vanilloid 2 in the regulation of cardiac performance.** American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, v. 306, p. H574-H584, 2014.

SBH. Sociedade Brasileira de Hipertensão. **Diretrizes brasileiras de hipertensão VI.** Revista Hipertensão, v. 13 (1), 2010.

Schmidt K., Neubauer A., Kolesnik B., Stasch J. P., Werner E. R., Gorren A. C. F., Mayer B. **Tetrahydrobiopterin protects soluble guanylate cyclase against oxidative inactivation.** Molecular Pharmacology, v. 82 (3), p. 420-427, 2012.

Schneider J. C., Kebir D. E., Chéreal C., Lanone S., Huang X. L., Roessingh A. S. B., Mercier J. C., Dall'Ava-Santucci J., Dinh-Xuan A. T. **Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation.** American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, v. 284, p. H2311-H2319, 2003.

Sethi G., Ahn K. S., Sung B., Aggarwal B. B. **Pinitol targets nuclear factor- κ B activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 7 (6), p. 1604-1614, 2008.

Shetty H. U., Holloway H. W., Schapiro M. B. **Cerebrospinal fluid and plasma distribution of myo-inositol and other polyols in Alzheimer disease.** *Clinical Chemistry*, v. 42 (2), p. 298-302, 1996.

Singh R. K., Pandey B. L., Tripathi M., Pandey V. B. **Anti-inflammatory effect of (+) pinitol.** *Fitoterapia*, v. 72, p. 168-170, 2001.

Sivakumar S., Subramanian S. P. **Pancreatic tissue protective nature of D-pinitol studied in streptozotocin-mediated oxidative stress in experimental diabetic rats.** *European Journal of Pharmacology*, v. 622, p. 65-70, 2009.

Sobey C. G. **Potassium channel function in vascular disease.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 21, p. 28-38, 2001.

Somlyo A. P., Somlyo A. V. **Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase.** *Physiological Reviews*, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SPH. Sociedade Portuguesa de Hipertensão. **Guidelines de 2013 da ESH/ESC para o tratamento da hipertensão arterial.** *Revista Portuguesa de Hipertensão e Risco Cardiovascular*, n. 39, 2014.

Swierkosz T. A., Mitchell J. A., Warner T. D., Botting R. M., Vane J. R. **Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: Interactions between nitric oxide and prostanoids.** British Journal Pharmacology, v. 114, p. 1335-1342, 1995.

Takaki A., Morikawa K., Tsutsui M., Murayama Y., Tekes E., Yamagishi H., Ohashi J., Yada T., Yanagihara N., Shimokawa H. **Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice.** The Journal of Experimental Medicine, v. 9, p. 2053-2063, 2008.

Tetik N., Turhan I., Oziyci H.R., Karhan M. **Determination of D-pinitol in carob syrup.** International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 62 (6), p. 572-576, 2011.

Tiruppathi C., Ahmmed G. U., Vogel S. M., Malik A. B. **Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability.** Microcirculation, v. 13, p. 693-708, 2006.

Triggle C. R., Hollenberg M., Anderson T. J., Ding H., Jiang Y., Ceroni L., Wiehler W. B., Ng E. S. M., Ellis A., Andrews K., McGuire J. J., Pannirselvam M. **The endothelium in health and disease – A target for therapeutic intervention.** Journal of Smooth Muscle Research, v. 39 (6), p. 249-267, 2003.

Vane J., Corin R. E. **Prostacyclin: A vascular mediator.** European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, v. 26, p. 571-578, 2003.

Versari D., Daghini E., Viridis A., Ghiadoni L., Taddei S. **The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man.** *Experimental Physiology*, v. 94.3, p. 317-321, 2008.

Walsh M. P. **Regulation of vascular smooth muscle tone.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 72 (8), p. 919-936, 1994.

WHO. World Health Organization – **A global brief on hypertension, silent killer, global public health crisis.** Geneva: World Health Organization, 2013.

Wood K. C., Cortese-Krott M. M., Kovacic J. C., Noguchi A., Liu V. B., Wang X., Raghavachari N., Boehm M., Kato G. J., Kelm M., Gladwin M. T. **Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis.** *Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 33, p. 1861-1871, 2013.