

**Diógenes Vadim Câmara**

**AÇÃO VASODILATADORA DE  
INOSITÓIS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Belo Horizonte**

**2015**

**Diógenes Vadim Câmara**

## **Ação Vasodilatadora de Inositóis**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Steyner F. Côrtes

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Belo Horizonte**

**2015**

*Dedico este trabalho aos meus filhos, Bernardo e Eduardo, e à minha esposa, Daniela que com amor, companheirismo e confiança sempre fizeram com que minhas fraquezas se tornassem estímulos para dias melhores.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, o maior dos meus objetivos; à minha esposa, Daniela, e aos meus filhos, Bernardo e Eduardo, que com amor, companheirismo e confiança sempre fizeram com que minhas fraquezas tornassem estímulos para dias melhores; aos meus pais e minhas irmãs, Kelly e Kênia, que sempre me deram apoio; aos colegas da pós-graduação; à todos os amigos dos laboratórios de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, pela valiosa ajuda no decorrer dessa trajetória; ao Prof. Fernão Castro Braga por isolar e nos fornecer bornesitol; à Prof<sup>a</sup>. Virgínia Soares Lemos, pela colaboração e em especial ao Prof. Steyner de França Côrtes, pela confiança, paciência e orientação acadêmica; à todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

## RESUMO

Os inositóis são substâncias naturais de origem animal e vegetal, que integram a alimentação humana. Eles participam do metabolismo celular e são utilizados no tratamento de distúrbios metabólicos. Estudos recentes sugerem um papel protetor, caracterizado pela redução da disfunção endotelial, dos inositóis no sistema cardiovascular. A natureza exata destes efeitos protetores é pouco conhecida, mas pode estar relacionada em parte à sua ação antioxidante e metabólica. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ação vasodilatadora direta e respectivo mecanismo de ação do mio-inositol, do quiro-inositol e do bornesitol em aorta de rato. Os inositóis induziram um efeito vasodilatador concentração-dependente, dependente da presença de endotélio funcional e abolido por um inibidor não-seletivo de óxido nítrico sintase (NOS). A análise da fluorescência de DAF-2, sonda fluorescente para óxido nítrico (NO), demonstrou que os inositóis induzem a produção de NO em aorta de rato. Experimentos de Western blot demonstraram que os inositóis aumentam a fosforilação do sítio de ativação da NOS endotelial (eNOS). Inibidores seletivos de fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3K) não inibiram o efeito vasodilatador dos inositóis. No entanto, a inibição da calmodulina reduziu significativamente a vasodilatação induzida por inositóis. Além disso, os inositóis induziram o aumento da concentração intracelular de cálcio no endotélio de anéis de aorta. Os presentes resultados permitem concluir que o mio-inositol, o quiro-inositol e o bornesitol induzem um efeito vasodilatador direto, dependente do endotélio e da produção de NO, com a ativação da eNOS por um mecanismo dependente do aumento da concentração intracelular de cálcio.

## ABSTRACT

Inositols are natural compounds from animal and plant sources present in human diet. They have an important role in cell metabolism and they are used in the treatment of metabolic illnesses. Recent studies suggest that inositols have a protective effect on the cardiovascular system, characterized by the reduction of the endothelium dysfunction. The precise mechanism of this protective effect is unknown, but could be related to their antioxidant and metabolic effects. The work aimed at investigating the direct vasodilator effect and respective mechanism of action of myo-inositol, chiro-inositol and bornesitol in rat aorta. The inositols induced a concentration- and endothelium-dependent vasodilation, abolished by a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). Fluorescent analysis with DAF-2, a selective dye for nitric oxide (NO), demonstrated that the inositols increased the production of NO. Western blot data demonstrated that the inositols increased the phosphorylation level of the activation site of the endothelial NOS (eNOS). Selective inhibitors of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) did not change the vasodilator effect of the inositols. However, the selective inhibition of calmodulin significantly reduced the vasodilation induced inositols. Also, the inositols increased the intracellular concentration of calcium in the endothelium of rat aortic rings. The present results allow concluding that myo-inositol, chiro-inositol and bornesitol induce an endothelium- and NO-dependent direct vasodilator effect, through the activation of eNOS by a calcium-dependent mechanism of action.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras	I
Lista de Abreviaturas	III
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	02
1.1 Aspectos histológicos e fisiológicos dos vasos sanguíneos	04
1.1.1 O endotélio vascular	07
1.2 Óxido Nítrico	08
1.2.1 Sintases de Óxido Nítrico	08
1.2.2 Regulação da atividade da eNOS	12
1.2.3 NO e o sistema cardiovascular	15
1.2.4 Mecanismo do efeito vasodilatador do NO	16
1.3 Inositóis	17
<b>2 OBJETIVOS</b>	33
2.1 Objetivos gerais	33
2.2 Objetivos específicos	33
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	35
3.1 Modelos Animais	35
3.2 Materiais	35
3.2.1 Substâncias e sais	35
3.3 Métodos	36
3.3.1 Experimentos de reatividade vascular	36
3.3.1.1 Obtenção e montagem de anéis de aorta	36
3.3.1.2 Avaliação da integridade endotelial	38
3.3.1.3 Remoção do endotélio vascular	38
3.3.2 Estudo do efeito vasodilatador dos inositóis em anéis de aorta	38
3.3.2.1 Avaliação da participação do endotélio no efeito vasodilatador dos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol, em aorta de rato	39
3.3.2.2 Avaliação da participação do NO, no efeito vasodilatador dos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol, em aorta de rato	40
3.3.2.3 Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasorelaxante dos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol em aorta de rato	40
3.3.2.4 Avaliação da participação do complexo Ca <sup>2+</sup> /calmodulina no efeito	

vasorelaxante dos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol em aorta de rato.....	41
3.3.2.5 Avaliação da dependência de transporte dos ciclitóis do meio extracelular para o intracelular em seus mecanismos de ação vasodilatadora em aorta de rato.....	41
3.3.3 Determinação da síntese endotelial de NO em estímulo aos ciclitóis pelo uso de Microscopia de Fluorescência.....	42
3.3.4 Análise dos níveis de fosforilação da eNOS em Ser 1177 e Thr 495 por Western Blot em aorta de rato estimulada com os inositóis.....	43
3.3.5 Avaliação do aumento intracelular de cálcio em células endoteliais por Microscopia Confocal .....	45
3.4 Análise estatística .....	46
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 Avaliação do efeito vasodilatador dos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol e da participação do endotélio, em aorta de rato.....	48
4.2 Avaliação da participação do NO no efeito vasodilatador dos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitolem aorta de rato.....	49
4.3 Determinação da produção intracelular de NO endotelial por microscopia de fluorescência em estímulo aos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.....	50
4.4 Análise dos níveis de fosforilação da eNOS em Ser1177 e Thr495 como indicador da funcionalidade da eNOS em aorta de rato estimulada com os inositóis.....	54
4.5 Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasodilatador dos ciclitóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitolem aorta de rato.....	58
4.6 Avaliação da participação do complexo Ca <sup>2+</sup> /CaM no efeito vasorelaxante induzido por mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol em aorta de rato.....	60
4.7 Avaliação do aumento intracelular de cálcio em células endoteliais por microscopia confocal em estímulo ao mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol, em aorta de rato.....	63
4.8 Avaliação da dependência de transporte dos inositóis do meio extracelular para o intracelular em seus mecanismos de ação vasodilatadora.....	65



<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura molecular do inositol .....	18
<b>Figura 2.</b> Isômeros do inositol.....	19
<b>Figura 3.</b> Alimentos ricos em inositol .....	20
<b>Figura 4. (A)</b> Esquema representativo da conexão dos vasos às hastes metálicas. <b>(B)</b> Sistema de aquisição de dados da reatividade vascular de vasos isolados.....	37
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo da curva concentração-resposta cumulativa de relaxamento induzida pelos ciclitóis em vasos pré-contraídos com fenilefrina.....	39
<b>Figura 6.</b> Avaliação do efeito vasorelaxante do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol e da participação do endotélio, em aorta de rato.....	48
<b>Figura 7.</b> Avaliação da participação do NO no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol em aorta de rato.....	49
<b>Figura 8.</b> Determinação da produção intracelular de NO endotelial em estímulo ao mio-inositol pelo uso de Microscopia de Fluorescência utilizando-se a sonda fluorescente DAF-FM diacetato.....	51
<b>Figura 9.</b> Determinação da produção intracelular de NO endotelial em estímulo ao quiro-inositol pelo uso de Microscopia de Fluorescência utilizando-se a sonda fluorescente DAF-FM diacetato.....	52
<b>Figura 10.</b> Determinação da produção intracelular de NO endotelial em estímulo ao bornesitol pelo uso de Microscopia de Fluorescência utilizando-se a sonda fluorescente DAF-FM diacetato.....	53
<b>Figura 11.</b> Análise dos níveis de fosforilação da eNOS em Ser1177 e Thr495 por Western Blot estimulada com mio-inositol .....	55
<b>Figura 12.</b> Análise dos níveis de fosforilação da eNOS em Ser1177 e Thr495 por Western Blot estimulada com quiro-inositol.....	56
<b>Figura 13.</b> Análise dos níveis de fosforilação da eNOS em Ser1177 e Thr495 por Western Blot estimulada com bornesitol. ....	57
<b>Figura 14.</b> Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.....	58

<b>Figura 15.</b> Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.....	59
<b>Figura 16.</b> Participação da via $Ca^{2+}$ /CaM no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.....	61
<b>Figura 17.</b> Participação da via $Ca^{2+}$ /CaM no efeito vasodilatador da acetilcolina .....	62
<b>Figura 18.</b> Avaliação do aumento intracelular de cálcio em células endoteliais em estímulo ao mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.....	64
<b>Figura 19.</b> Avaliação da participação de transportadores de inositóis no mecanismo de ação vasodilatadora dos inositóis.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ach - acetilcolina  
ADP - difosfato de adenosina  
Akt - proteína serina treonina quinase, conhecida como proteína quinase B  
AMPC - monofosfato cíclico de adenina  
AMPK – Proteína quinase ativada pelo AMP  
ANOVA - análise de variância  
ATP - trifosfato de adenosina  
bFGF – Fator de crescimento Fibroblástico básico  
BH4 – Tetrahidrobiopterina  
BK - bradicinina  
BKCa- canal de K<sup>+</sup> de condutância elevada ativado pelo Ca<sup>2+</sup>  
Ca<sup>2+</sup> - íons cálcio  
Ca<sup>2+</sup>/CaM - complexo cálcio/calmodulina  
CaMKII - proteína quinase II dependente da calmodulina  
Cav-1 - caveolina 1  
COX - cicloxigenase  
DAG - diacilglicerol  
E.P.M. - erro padrão da média  
ECA - enzima conversora de angiotensina  
EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio  
EDRF - fator relaxante derivado do endotélio  
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial  
ET - endotelina  
FAD - dinucleotídeo de flavina e adenina  
FMN - mononucleotídeo de flavina  
GCs - guanilil ciclase solúvel  
Glc6p – glicose -6-fosfato  
GMPc - monofosfato cíclico de guanosina  
GTP - trifosfato de guanosina  
HDL – lipoproteína de alta densidade  
iNOS - óxido nítrico sintase induzida  
Ins – inositol

Ins3P – D-mio-inositol-3-fosfato  
InsPase – Inositol monofosfatase  
IP3 - inositol 1, 4, 5, trifosfato  
K<sup>+</sup> - íons potássio  
KCa- canais de K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup>  
L-NAME - N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster  
L-NMMA – N<sup>G</sup>-monometilarginina  
MCP-1 – Proteína quimioatraente de monócitos  
MIPS – mio-inositol-3-fosfato sintase  
MLC - cadeia leve da miosina  
MLCK - quinase da cadeia leve de miosina  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal  
NO - óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - nitrato  
NOS - óxido nítrico sintase  
O<sub>2</sub> - oxigênio molecular  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion superóxido  
PAF - fator ativador de plaquetas  
PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E2  
PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  – prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>   
PGG<sub>2</sub> – prostaglandina G<sub>2</sub>  
PGH<sub>2</sub> – prostaglandina H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub> - prostaciclina  
PI3K - fosfatidil-inositol 3-quinase  
PIP2 - fosfatidil-inositol-bifosfato  
PIS – fosfatidilinositol sintase  
PKA - proteína quinase A  
PKC - proteína quinase C  
PKG - proteína quinase G  
PLC - fosfolipase C  
PTdIns – fosfatidilinositol  
PTdIns (4,5)P<sub>2</sub> – fosfatidilinositol -4,5 Bifosfato.  
PTdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> – fosfatidilinositol -3,4,5 Trifosfato

RE - retículo endoplasmático

ROS - espécies reativas de oxigênio

Ser - serina

SNC - sistema nervoso central

SP – substância P

TGF $\beta$  – Fator de crescimento e transformação  $\beta$

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TXA<sub>2</sub> - tromboxano A2

Tyr – tirosina

Thr – treonina

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

# **Introdução**

## | 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de mortalidade no mundo, quase um terço do total (WHO, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são responsáveis por mais de 17 milhões de mortes por ano no mundo. Desse total de mortes por doenças cardiovasculares as cardiopatias isquêmicas são responsáveis por 7,3 milhões e os acidentes vasculares cerebrais são responsáveis por 6,2 milhões de mortes (WHO, 2013). Mais de 3 milhões dessas mortes ocorrem antes de 60 anos de idade e podem ser em grande parte evitadas. As doenças cardiovasculares incluem as doenças cardíacas isquêmicas, os acidentes vasculares cerebrais (AVC), e as doenças vasculares incluindo a hipertensão, a aterosclerose e as isquemias vasculares periféricas (WHO, 2011). A maioria das patologias cardiovasculares estão relacionadas à alterações da estrutura e da função vascular, e, nesse sentido, situa-se a disfunção endotelial, caracterizada por uma baixa produção e/ou biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), como um dos importantes fatores que contribuem para a origem das doenças cardiovasculares (Zago & Zanescio, 2006; Brandão & Pinge, 2007). Nesse contexto, o conhecimento dos mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase vascular torna-se importante, uma vez que as doenças cardiovasculares mantêm sua liderança como uma das maiores causas de mortalidade.

O endotélio vascular caracterizado por uma única camada de células que revestem internamente a parede dos vasos, apresenta um importante papel na manutenção da homeostase vascular através da produção de várias substâncias



que regulam o tônus vascular, a coagulação e os processos aterogênicos (Dias *et al.*, 2011).

O NO é considerado um dos mediadores vasoprotetores mais importantes secretados pelo endotélio. A integridade endotelial é crucial para a produção de NO. Ele é sintetizado de maneira contínua pelas células endoteliais através da enzima NO sintase endotelial (eNOS). Na literatura há concordância de que a reduzida atividade biológica do NO, causada tanto pela redução na síntese como pelo aumento de sua degradação pelo estresse oxidativo, tem sido identificada como o mecanismo de maior relevância no processo multifatorial na disfunção endotelial e na participação das principais disfunções cardiovasculares (Zanesco & Antunes, 2007; Pepine, 2009). O papel do NO nas doenças cardiovasculares tem sido observado em todas as áreas de conhecimento. A ação vasoprotetora do NO sobre a hipertensão arterial, doenças tromboembólicas, dislipidemia e aterosclerose é bem estabelecido (Silva & Zanesco, 2010). Os efeitos benéficos do NO sobre o sistema cardiovascular são atribuídos à suas ações vasodilatadora, antioxidante, inibitória da agregação e adesão plaquetária, inibitória da proliferação e migração das células musculares lisas e inibitória da adesão e migração de leucócitos (Maeda *et al.*, 2004; Forstermann, 2006).

Diversos mediadores e neurotransmissores podem promover a liberação do NO pelas células endoteliais, como a bradicinina e a acetilcolina, e produzir vasodilatação através da ativação dos seus receptores específicos, sendo consideradas substâncias vasodilatadoras dependentes do endotélio (Green, *et al.*, 2004). A descoberta de novos fármacos que controlem ou aumentem a disponibilidade de NO pode contribuir para o tratamento e redução de várias

doenças cardiovasculares e promover a melhora da qualidade de vida, trazendo grandes perspectivas para a elaboração de novas terapias, sobretudo as terapias preventivas, sendo um dos principais alvos da indústria farmacêutica.

Vários estudos têm mostrado que os inositóis, substâncias naturais de origem animal e vegetal, que integram a alimentação humana, produzem efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, bem como sobre as comorbidades da síndrome metabólica (Nascimento *et al.*, 2006). Vários relatos da literatura indicam que os inositóis possuem grande potencial para o tratamento da diabetes. Os inositóis são capazes de prevenir e reverter a disfunção endotelial em ratos diabéticos (Nascimento *et al.*, 2006) e apresentam efeitos metabólicos "insulin-like" (Bates *et al.*, 2000). O mecanismo destes efeitos protetores é pouco conhecido, mas pode estar relacionada em parte à sua ação antioxidante e metabólica, bem como à ação direta dos inositóis no endotélio vascular.

### **1.1 Aspectos histológicos e fisiológicos dos vasos sanguíneos**

As artérias têm por função transportar o sangue, sob alta pressão, para os tecidos. As artérias podem ser classificadas funcionalmente em artérias de condutância (ex: aorta e artéria pulmonar) e artérias de resistência (ex: artérias mesentéricas e artérias cerebrais) (Pohl *et al.*, 2000). As artérias de condutância estão relacionadas a uma maior acomodação do fluxo inicial recebido pelo coração auxiliando a condução do sangue em direção às artérias de resistência. As artérias de resistência têm a função de controlar o suprimento sanguíneo e irrigação dos tecidos através de liberação do fluxo para o sistema capilar. As

artérias, normalmente, possuem três camadas: a camada externa ou adventícia, a camada média ou muscular e a camada íntima ou endotelial (Gray, 1988).

A camada externa ou adventícia é formada por tecido conjuntivo frouxo, com uma fina rede de fibras colágenas e elásticas que reveste a parte externa da parede vascular. O tecido elástico é mais abundante próximo à camada média e denomina-se membrana elástica externa (Gray, 1988).

A camada média ou camada muscular é composta por múltiplas camadas de células musculares lisas, é a camada mais espessa e constitui o suporte da parede dos vasos, determinando assim seu comportamento mecânico (Gray, 1988). A camada muscular é responsável pelo aumento ou redução do diâmetro dos vasos, o que resulta respectivamente do relaxamento e da contração das células musculares lisas.

A contração da musculatura lisa vascular pode ocorrer principalmente por dois mecanismos: o acoplamento farmacomecânico e o acoplamento eletromecânico (Somlyo & Somlyo, 1994). O acoplamento farmacomecânico ocorre através da ligação de agentes contráteis aos seus receptores de membrana específicos presentes nas células musculares lisas. Esses receptores ativam a proteína quinase G (PKG), que estimula a enzima fosfolipase C (PLC), que, por sua vez, promove a hidrólise dos fosfolípidos, fosfatidil-inositolbifosfato (PIP<sub>2</sub>), presente na membrana celular das células musculares lisas que catalisam a formação dos segundos mensageiros, inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> liga-se aos seus receptores específicos localizados no retículo sarcoplasmático, liberando o íon Ca<sup>2+</sup> contido nos estoques intracelulares. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que, por sua vez, fosforila proteínas

ligadas ao canal para cálcio do tipo L, favorecendo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para o meio intracelular. Esses dois mensageiros produzem a elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que se liga à calmodulina (CaM), formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  que promove uma mudança conformacional na calmodulina, permitindo a interação e ativação da enzima quinase de cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK fosforila a cadeia leve da miosina (MLC) permitindo a interação actina-miosina e produzindo a contração da musculatura lisa vascular (Berridge, 1993; Webb, 2003; Wynne *et al.*, 2009). No acoplamento eletromecânico a contração da musculatura lisa vascular ocorre através da despolarização da membrana das células do músculo liso vascular (MLV) que leva a abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem. A abertura desses canais permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para o meio intracelular e conseqüente contração do MLV (Nelson *et al.*, 1990; Somlyo & Somlyo, 1994).

O relaxamento da musculatura lisa vascular, por sua vez, ocorrerá a partir de estímulos que reduzam a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular levando a dissociação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  da MLCK e conseqüentemente reduzindo a fosforilação da cadeia leve da miosina.

A camada íntima é formada pelo endotélio, camada única e continua de células planas de forma oval orientadas segundo a direção da corrente sangüínea, e pela camada subendotelial de tecido conjuntivo, constituído de colágeno, elastina e de glicoproteínas (Gray, 1988), que separa o sangue da parede vascular e do interstício. As células endoteliais desempenham importante papel no controle do tônus vascular, regulando a vasomotricidade, a permeabilidade vascular e a atividade plaquetária e leucocitária (Zanesco & Antunes, 2005).

### 1.1.1 O endotélio vascular

O endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória (Bahia *et al.*, 2006).

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que o relaxamento das células musculares lisas em resposta a acetilcolina era dependente da integridade do endotélio vascular e que esse efeito resultava da liberação de um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Em 1987, estudos experimentais demonstraram que o EDRF era o óxido nítrico (NO) (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Além do NO, o endotélio produz outras substâncias vasodilatadoras como a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Moncada *et al.*, 1977) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Vanhoutte, 2003). Além das substâncias vasodilatadoras o endotélio também é capaz de produzir e liberar substâncias vasoconstritoras como a endotelina (ET) (Kedzierski & Yanagisawa, 2001), o tromboxano (TXA<sub>2</sub>) (Frolich & Forstermann, 1989) e a angiotensina II (Peach, 1977). Quando a função do endotélio é normal, há um equilíbrio entre a produção destas substâncias com uma tendência à vasodilatação.

A disfunção endotelial ocorre quando os efeitos vasoconstritores se superpõem aos efeitos vasodilatadores, geralmente como resultado de uma diminuição da biodisponibilidade NO, com perda de sua ação vasoprotetora. A disfunção endotelial é definida como uma alteração do relaxamento vascular

dependente do endotélio sendo uns dos fatores que contribuem para o aparecimento das doenças cardiovasculares (Kingwell, 2000).

## **1.2 Óxido Nítrico**

O NO é um radical livre, gasoso que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado na última camada e uma meia-vida de 4 a 8 segundos em meio aquoso oxigenado (Moncada *et al.*, 1989). É capaz de livre difusão nas membranas celulares, tal característica colabora com sua alta atividade biológica (Palmer *et al.*, 1987). O NO reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre (Kiechele & Malinski, 1993).

O NO é considerado o mais potente vasodilatadores produzidos pelo endotélio, e o controle de sua produção está diretamente relacionado a diversas patologias, como hipertensão arterial, aterosclerose e doença arterial coronária (Zanesco & Antunes, 2005).

### **1.2.1 Sintases de óxido nítrico**

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) sendo, portanto, essenciais na regulação da função cardiovascular (Liu & Huang, 2008). Foram descritas três isoformas de NOS agrupadas em duas categorias baseadas em sua expressão constitutiva, NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), por serem

expressas em condições basais nos tecidos, e a induzida, NOS induzida (iNOS), por ser expressa quando as células são estimuladas por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Moncada, 1991). As isoformas constitutivas (eNOS e nNOS), são dependentes de cálcio/calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) para regulação das suas atividades, enquanto a isoforma induzida (iNOS) independe do aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Moncada, 1991; Marletta, 1994).

As NOS estão presentes no citosol e podem ser inibidas por análogos da L-arginina como a  $\text{N}^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA),  $\text{N}^G$ -amino-L-arginina (L-NAA) e o  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name) e requerem para a produção de NO os cofatores NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo),  $\text{BH}_4$  (tetrahidrobiopterina) e ferroprotoporfirina IV (Heme) (Moncada, 1991; Bred *et al.*, 1991; Stevens-Truss *et al.*, 1997). As enzimas NOS apresentam uma estrutura molecular composta por dois domínios funcionais unidos em um único polipeptídeo ou monômero (Alderton *et al.*, 2001; Masters *et al.*, 1996a; Masters *et al.*, 1996b). No domínio catalítico (oxigenase ou oxidase) N-terminal, encontram-se os sítios de ligação para os cofatores heme,  $\text{BH}_4$  e a L-arginina. O domínio redutase C-terminal possui sítios de ligação para FMN, FAD e NADPH (Andrew & Mayer, 1999; Alderton *et al.*, 2001). Entre os domínios redutor e oxidante, encontra-se o domínio de ligação da calmodulina. Durante a biossíntese de NO as flavinas adquirem elétrons do NADPH e transferem estes para o ferro do grupamento heme, permitindo a ligação do oxigênio e catalisando a produção do NO a partir da L-arginina. Esta transferência de elétrons é induzida pela ligação da CaM ao seu domínio (Andrew & Mayer, 1999; Fleming & Busse, 1999). A síntese de NO envolve duas etapas.

Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza o NADPH e oxigênio e envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a oxidação da NHA em NO e citrulina (Marletta, 1994; Griffith & Stuehr, 1995; Andrew & Mayer, 1999).

A nNOS foi a primeira isoforma identificada. A nNOS, chamada também de isoforma I, é encontrada no cérebro, na medula espinhal, no sistema nervoso periférico e em outras estruturas como células epiteliais de pulmões, útero e estômago, células da mácula densa do rim, células da ilhota pancreática e do músculo esquelético (Moncada *et al.*, 1991). A presença da nNOS já foi descrita também em células musculares lisas vasculares (Biecker *et al.*, 2004; Brophy *et al.*, 2000) e em miócitos cardíacos (Tambascia *et al.*, 2001), sugerindo sua importância fisiológica no sistema cardiovascular. Nosso grupo demonstrou que a nNOS é expressa constitutivamente nas células endoteliais e participa ativamente do relaxamento induzido pela ACh através da síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Capettini *et al.*, 2008; *et al.*, 2010). A atividade enzimática da nNOS é dependente de Ca<sup>2+</sup>/CaM, portanto controlada pelas variações da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Sendo assim, neurotransmissores ou sinalizadores celulares que determinem alterações na concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> irão regular a atividade da nNOS.

A iNOS, chamada também de isoforma II, tem sua expressão induzida por certos fatores como, o lipopolissacarídeo bacterianos (LPS), certas citocinas, incluindo a interleucina I, interferon  $\gamma$  e o fator de necrose tumoral- $\alpha$ , e sua atividade enzimática é independente de variações da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Griffith & Stuehr, 1995). A iNOS pode ser expressa em uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos,



hepatócitos, células epiteliais (Zago & Zanesco, 2006). A iNOS é capaz de produzir e liberar grandes quantidades de NO por períodos de tempos mais longos, podendo gerar alguns efeitos tóxicos ao organismo enquanto que as isoformas constitutivas (eNOS e nNOS) produzem pequenas quantidades de NO e por tempo menor (Moncada, 1997).

A eNOS ou isoforma III, é expressa em células endoteliais, plaquetas, células epiteliais tubulares do rim, epitélio respiratório, células intersticiais do cólon e hipocampo (Moncada, 1997; Zago & Zanesco, 2006). A eNOS, encontrada principalmente nas células endoteliais é essencial para a regulação do tônus vascular, bem como para a prevenção da adesão e agregação plaquetária (Michiels, 2003). A ativação da eNOS pode ocorrer quando receptores acoplados à proteína G da membrana das células endoteliais são estimulados por acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substância P, dentre outros. Além destes, a força de cisalhamento (Shear-stress) é também um importante modulador a atividade da eNOS (Fleming & Busse, 1999; Malek *et al.*, 1999; Michiels, 2003). Esses fatores promovem aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das células endoteliais, seja pelo influxo extracelular ou pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, o que ativa a eNOS, levando à síntese e liberação de NO (Luckhoff *et al.*, 1988; Busse & Mulsch, 1990). Ao NO resultante da eNOS é atribuído um importante papel protetor na hipertensão arterial, na doença arterial coronariana e nas doenças tromboembólicas (Curtis & Pabla, 1997; Maeda *et al.*, 2004).

### 1.2.2 Regulação da atividade da eNOS

A eNOS funcional é um dímero formado de duas subunidades idênticas denominadas de monômeros (Albrecht *et al.*, 2003). Os monômeros da NOS são tanto inativos cataliticamente quanto incapazes de se ligarem à arginina ou BH<sub>4</sub>. A dimerização da eNOS inicia-se com a ligação através do grupamento heme, sem o qual a eNOS existe somente como um monômero (Klatt *et al.*, 1996). A formação do dímero torna possível a ligação da BH<sub>4</sub> a este dímero da eNOS, sendo sua ligação essencial para manter a estabilidade do dímero e o proteger de proteólise (Andrew & Mayer, 1999). Os íons zinco são importantes para a manutenção da integridade do sítio de ligação da BH<sub>4</sub> no domínio oxigenase da eNOS (Raman *et al.*, 1998). Em células endoteliais a BH<sub>4</sub> apresenta um papel crucial no transporte de elétrons durante a formação de NO. A ausência do cofator BH<sub>4</sub> é o principal responsável pelo desacoplamento da eNOS. A depleção de BH<sub>4</sub> favorece a produção de anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e subsequentemente a formação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Cosentino & Luscher, 1999). A redução na biodisponibilidade de BH<sub>4</sub> e uma produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> dependente da eNOS pode estar implicada na disfunção endotelial, aterosclerose e hipertensão (Fleming & Busse, 1999).

A localização subcelular da síntese de NO exerce grande influência na sua atividade biológica. Estudos mostram que a eNOS pode ser encontrada na membrana plasmática, no complexo de Golgi ou nas cavéolas (Hecker *et al.*, 1999). As cavéolas são invaginações da membrana plasmática as quais funcionam para ligar e organizar uma variedade de moléculas de sinalização. Os

principais componentes estruturais das cavéolas são colesterol e proteínas estruturais, tais como as caveolinas (caveolinas 1, 2 e 3), sendo a caveolina 1 a mais abundante nas células endoteliais. A ligação da caveolina 1 ao domínio redutase da eNOS é proposto antagonizar a ligação da CaM e inibir a doação de elétrons para a subunidade heme, inibindo portanto a atividade da enzima eNOS (Ghosh *et al.*, 1998).

A eNOS é classificada como uma enzima constitutiva estritamente dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , sendo considerada a mais sensível às modificações da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre (Busse & Mulsch, 1990; Fleming & Busse, 1999). A ativação da eNOS nas células endoteliais por agonistas dependentes ou independentes de receptores é acompanhada pela elevação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, aumentando a produção de NO e produzindo vasodilatação (Fleming & Busse, 1999). Tanto a formação de NO induzida por agonista quanto a vasodilatação subsequente são abolidos pela quelação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ou pela a adição de inibidores de calmodulina (Luckhoff *et al.*, 1988; Fleming & Busse, 1999). A identificação de um domínio de ligação da CaM na estrutura primária da eNOS associado aos resultados que proteínas ligadas a CaM inibe a atividade da enzima demonstram que ligação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  é fundamental para ativar a eNOS. Ao ocorrer o aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, há a formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  e com isso a ligação à enzima eNOS e sua dissociação da caveolina facilitando o fluxo de elétrons do domínio redutase para o domínio oxidase da enzima e a conseqüente produção do NO (Fleming & Busse, 1999).

Embora classificada como uma enzima dependente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , uma atividade basal da eNOS foi demonstrada em situações onde há um aumento transiente e não sustentado de  $\text{Ca}^{2+}$ , como o *shear stress* ou em níveis basais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ayajiki *et al.*, 1996; Presta *et al.*, 1997; Dimmeler *et al.*, 1999; Fisslthaler *et al.*, 2000). A ativação da eNOS em resposta à aplicação do *shear stress* à células endoteliais pode ser observada na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e não é inibida pelo calmidazólio, antagonista de calmodulina, o qual abole a vasodilatação induzida por acetilcolina (Ayajiki *et al.*, 1996; Fleming & Busse, 1999). O *shear stress* estimula a ativação da fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K), ativando a proteína quinase B (Akt) que fosforila a eNOS no resíduo de serina 1177 estimulando sua atividade (Dimmeler *et al.*, 1999). A ativação da eNOS, pode ser induzida por inibidores de fosfatases de proteína tirosina, sugerindo que a fosforilação da eNOS por tirosina ou uma proteína regulatória associada é crucial para a sua ativação independente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fleming *et al.*, 1998).

A atividade da eNOS pode ser modulada pela sua fosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina (Michel *et al.*, 1993; Garcia-Cardena *et al.*, 1996; Fleming *et al.*, 2001). Existem vários sítio de fosforilação na estrutura da eNOS, mas a fosforilação do resíduo de serina 1177 (Ser1177) no domínio reductase e do resíduo de treonina 495 (Thr495) localizado dentro do domínio ligante da calmodulina parecem ser os mais importantes para a regulação da atividade da eNOS (Fleming & Busse, 2003; Mount *et al.*, 2007).

A fosforilação do resíduo de Ser1177 aumenta a ativação da eNOS mediada pela ligação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  e pode também levar a ativação da eNOS por aumentar a sensibilidade da eNOS às concentrações basais de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Vários estímulos tem sido associado à ativação da eNOS pela fosforilação de seus resíduos de Ser1177 tais como o shear stress (Dimmeler *et al.* 1999), bradicinina (Fleming *et al.*, 2001), insulina (Kim *et al.*, 2001) e estrogênio (Lantinho *et al.*, 1997). As principais quinases implicadas na regulação da fosforilação da eNOS em Ser1177 são proteína quinase ativada por AMP (AMPK), Akt, proteína quinase A (PKA), proteína quinase II dependente de CaM (CaMKII), proteína quinase G (PKG) e a proteína fosfatase 2A (PP2A) (Mount *et al.*, 2007).

Já a fosforilação do resíduo de Thr495 inibe a atividade da eNOS (Fleming *et al.*, 2001; Mount *et al.*, 2007). O efeito inibitório da fosforilação da Thr495 sobre a síntese de NO parece ser devido a fosforilação deste resíduo interferir com o domínio de ligação do complexo  $Ca^{2+}/CaM$  à eNOS (Fleming *et al.*, 2001). A proteína quinase C (PKC) regula negativamente a produção de NO endotelial por fosforilar os resíduos de Thr495 da eNOS (Fleming *et al.*, 2001). A desfosforilação da Thr495 é observada em respostas a agonistas da síntese de NO tais como bradicinina, Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e ionomicina (Mount *et al.*, 2007).

### **1.2.3 NO e o sistema cardiovascular**

Atualmente, está bem estabelecido que o NO endotelial tem um importante papel na manutenção da homeostase vascular (Nava & Luscher, 1995). No sistema cardiovascular, é atribuído ao NO um papel protetor na Hipertensão, aterosclerose, dislipidemias, doença arterial coronariana e nas doenças tromboembólicas (Kingwell, 2000). A redução na biodisponibilidade de NO,

causada tanto pela redução na síntese quanto pelo aumento da degradação pelo estresse oxidativo, tem sido identificada como o principal mecanismo no processo multifatorial na disfunção endotelial e na participação das principais disfunções cardiovasculares (Pepine, 2009). A disfunção endotelial desencadeia eventos vasculares como alterações no tônus vascular, disfunções trombóticas, proliferação e migração de células musculares lisas e adesão de leucócitos (Madamanchi, *et al.*, 2005).

O importante papel do NO na manutenção da homeostase vascular está associado à suas ações na manutenção do tônus vascular mantido por uma constante liberação de NO através do shear stress mantendo a vasodilatação; na inibição da agregação plaquetária através da elevação de GMPc e da diminuição do  $Ca^{2+}$  no interior das plaquetas (Moncada *et al.*, 1991); na inibição da adesão de monócitos ao endotélio vascular através da inibição da expressão de moléculas de adesão (Lefer *et al.*, 1999); na inibição da proliferação das células musculares lisa (Garg & Hassid, 1989) e na inibição do estresse oxidativo através da indução da produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso (Wolin, 2000).

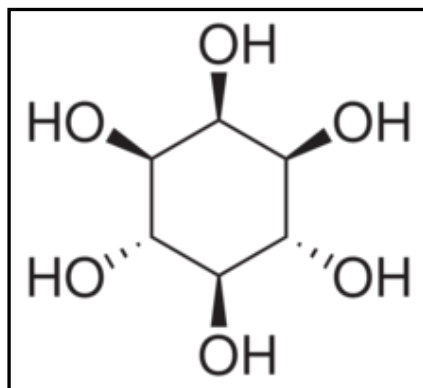
#### **1.2.4 Mecanismo do efeito vasodilatador do NO**

Uma vez formado, o NO difunde-se rapidamente da célula endotelial para a célula muscular lisa, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel, estimulando a sua atividade catalítica e levando à formação de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de

guanosina (GTP). O aumento da concentração de GMPc na célula muscular lisa resulta na ativação da PKG, que induz relaxamento desta célula através de diversos mecanismos, tais como: a ativação da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase no retículo sarcoplasmático (Cornwell *et al.*, 1991), ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Furukawa *et al.*, 1991), inibição dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Tare *et al.*, 1990; Mery *et al.*, 1991), fosforilação dos canais para  $\text{K}^+$  que induz hiperpolarização (Lincoln *et al.*, 1994) e ativação da  $\text{Ca}^{2+}$ ATPases da membrana plasmática (Fisher *et al.*, 2001). A vasodilatação via NO/GMPc pode ser estimulada por diversas substâncias incluindo acetilcolina, bradicinina, histamina, ADP, serotonina, substância P dentre outros (Michiels, 2003).

### 1.3 Inositóis

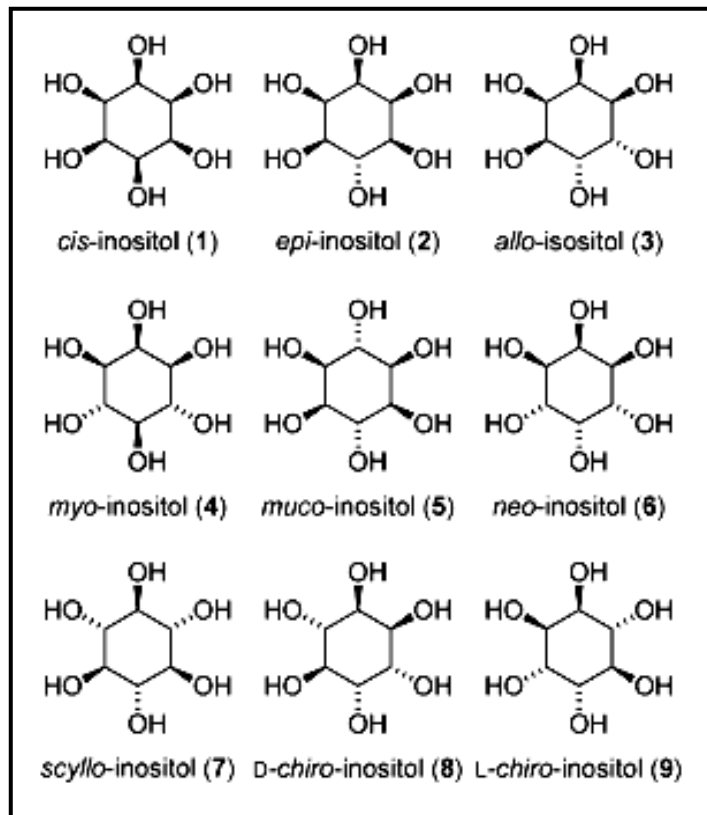
Na literatura o termo ciclitol é frequentemente usado para referir a um composto cíclico no qual o núcleo estrutural é um anel de seis átomos de carbonos, nos quais pelo menos três carbonos do anel têm unidos diretamente grupos hidroxilas (ciclohexanopoliol) (Duchek *et al.*, 2011). O termo inositol é usado para um subgrupo da classe dos cilitóis. Portanto, o inositol é um poliálcool cíclico, mais especificamente um ciclohexanohexol, um carboidrato cíclico com seis grupos hidroxil (OH), um em cada carbono do anel (Figura 1) (Duchek *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Estrutura molecular do inositol.

As estruturas possíveis do ciclohexanohexol são reduzidas pelos princípios de simetria a nove compostos, um par D L e sete isômeros meso: scilo, mio, epi, neo, D e L quiro, cis, muco e allo (Figura 2), sendo o mio-inositol a forma mais prevalente na natureza (Duchek *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2003). O mio-inositol ocupa um lugar central no metabolismo dos inositóis, pois é o único isômero que pode ser sintetizado *de novo*, a partir da D-glucose-6-fosfato, enquanto que todos os outros isômeros derivam do mio-inositol (Michell, 2008).





**Figura 2.** Isômeros do inositol (Duchek *al.*, 2011)

Esta forma predominante mostrou-se naturalmente abundante e trata-se de um componente comum de vários alimentos, principalmente grãos integrais, cereais, laranja, melão, amendoim, feijão, legumes, nozes, lentilha, ervilha e sementes (Figura 3) (Bohn, 2008).



**Figura 3.** Alimentos ricos em inositol.

O inositol pode ser obtido da alimentação (Holub, 1986), ou pela conversão tecidual a partir da D-glucose-6-fosfato para D-inositol-3-fosfato, que a seguir pode então ser desfosforilado para inositol, sendo que os rins podem sintetizar até 4 g/dia (Clements & Diethelm, 1979), assim como os testículos e o cérebro (Hauser & Finelli, 1963), mas em menor quantidade. De acordo com a literatura, algumas células produzem seu próprio inositol, enquanto outras obtêm inositol do meio extracelular através de co-transportadores específicos, SMIT (- sodium myo-inositol transporter-) ou HMIT (- H<sup>+</sup> myo-inositol symporter-) (Michell, 2008; Fisher *et al.*, 2002).

A síntese de inositol consome o metabólito glicolítico central, a glicose –6–fosfato e requer duas enzimas: Primeiro, a mio-inositol-3-fosfato sintase (MIPS) dependente de NAD<sup>+</sup>, sendo estimulada pelo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e inibida pelo Li<sup>+</sup>, que cataliza a ciclização da D-glicose-6-fosfato em D-mio-inositol-3-fosfato (Ins 3P), em seguida, a inositol monofosfatase (InsPase) que é dependente de Mg<sup>2+</sup> e pode sofrer inibição pelo Li<sup>+</sup>, desfosforila o Ins 3P, resultando no inositol livre (Michell, 2008). A fosfatidilinositol sintase (PIS) catalisa a transferência de grupo fosfatidil para porção D1 do inositol livre levando a formação de fosfatidilinositol (PtdIns). E

a fosforilação deste por proteínas quinases específicas leva a formação dos fosfolípidos de membrana como o fosfatidilinositol – 4,5 bifosfato (Ptd Ins (4,5)P<sub>2</sub>) que apresenta diversas funções, por exemplo, na sinalização, excitose e motilidade celular (Michell, 2008). Todas as células eucarióticas tanto de organismos unicelulares quanto multicelulares utilizam inositol como um principal constituinte de lípidos de membrana (Michell, 2008).

A distribuição do inositol nos tecidos e no plasma varia bastante, sendo que a concentração de inositol circulante no plasma de indivíduos saudáveis varia entre 30 e 70  $\mu\text{M}$  (Croze & Soulage, 2013), e com exceção dos testículos e rins, as concentrações no SNC são significativamente mais altas, excedendo em 25 à 50 vezes a do fluido cérebro-espinhal e 50 a 100 vezes a do plasma (Fisher *et al.*, 2002). Para a manutenção da concentração intracelular do inositol as células, além da reciclagem dos segundos mensageiros de inositol fosfato, utilizam – se de três mecanismos. O primeiro é o transporte de inositol via carreadores específicos, composto por dois sistemas: um de receptação saturável, sódio dependente, que exibe alta afinidade pelo inositol, é mediado pelo SMIT, sendo pH dependente e utilizando dois íons Na<sup>+</sup> para cada molécula de inositol transportada (Kwon *et al.*, 1992); E outro denominado HMIT presente quase que exclusivamente no SNC (Uldry *et al.*, 2001). A dependência destes dois carreadores em relação ao pH é inversa: enquanto a função do SMIT é progressivamente inibida com a redução do pH, o HMIT tem sua função aumentada em pH baixo (Fisher *et al.*, 2002). O segundo mecanismo é a síntese *de novo* de inositol a partir da glicose que ocorre em vários órgãos, como o cérebro, rins, testículos e fígado e que tem duas etapas de sua via metabólica passível de inibição pelo Li<sup>+</sup> (Eisenberg, 1963; Fisher *et al.*,

2002). O último meio de equilíbrio do inositol intracelular é o efluxo do mesmo, em situações de stress hipotônico, via difusão facilitada, através de um canal de cloro não específico, designado como *volume-sensitive organic osmolite anion channel* (VSOAC); (Jackson & Strange, 1994).

Os inositóis também podem ser encontrados em várias espécies de vegetais, como na espécie *Hancornia speciosa* Gomes uma espécie nativa do cerrado brasileiro conhecida popularmente como mangabeira. A *Hancornia speciosa* Gomes é utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças hepáticas (Rodrigues & Carvalho, 2001), diabetes (Grandi et al., 1982) como antiinflamatória (Lima & Martins, 1996), e anti-hipertensiva (Grandi et al., 1989; Hirschmann & Arias, 1990). O extrato etanólico das folhas da *Hancornia speciosa* apresentou efeito vasodilatador em aorta e em artéria mesentérica superior de rato por um mecanismo dependente do endotélio e da produção de NO (Ferreira et al., 2007a, 2007b). Em 2007, Endringer e colaboradores padronizaram uma fração proveniente do extrato alcoólico das folhas de *H. speciosa* e a caracterizaram quimicamente, revelando como principais constituintes químicos o ácido quínico, a quercetina-3 rutinosídeo (rutina) e o ciclitol, bornesitol.

Nas células o inositol existe principalmente sob a forma de derivados fosforilados, fosfoinositídeos e na sua forma livre (Almeida et al., 2003). O estudo dos componentes lipídicos de membrana celular, e em particular o “turnover” dos fosfoinositídeos, teve seu auge na década de 1980 com a descoberta que o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) pode ser hidrolizado pela fosfolipase C (PLC) a diacilglicerol (DAG) e inositol -1,4,5-trifosfato (Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>) (Berridge, 1993; Lee & Severson, 1994). Ambos os produtos foram identificados como

segundo mensageiros que ativam a proteína quinase C (PKC) (Ohanian *et al.*, 1996) e liberam  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares (Walsh, 1993), respectivamente. Estes eventos apresentam um papel central na transmissão de sinais de vários hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento dentre outros.

Em paralelo, inositóis e fosfoinosítídeos kinases foram identificados. Estas enzimas geram um repertório enorme de polifosfatos de inositol solúveis e lipídeos polifosfoinosítídeos de membrana. A PI3K, por exemplo, a qual é regulada por receptores de membrana, promove a formação do fosfatidilinositol -3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3), um lipídeo sinalizador que modula crescimento, proliferação e motilidade celular (Wymann & Schreiner, 2008). Os fosfoinosítídeos têm, portanto ganhado importância como moléculas alvo que estão envolvidas na organização de complexas sinalizações ligadas a membrana. As funções bioquímicas definidas para os fosfoinosítídeos nas membranas biológicas incluem a regulação de respostas celulares a estímulos externos e ou transmissão nervosa e a mediação da atividade de enzimas através das interações com várias proteínas específicas (Colodny & Hoffman, 1998). O desequilíbrio destas vias de sinalizações lipídicas contribui para progressão de doenças como inflamação crônica, autoimunidade, alergia, câncer, aterosclerose, hipertensão, hipertrofia cardíaca, doenças degenerativas e metabólicas (Wymann & Schreiner, 2008).

As funções do inositol são inúmeras e variam conforme sua configuração bioquímica. Na forma de fosfoinosítídeos de membrana, o papel nos eventos de transdução de sinais, como citado anteriormente, é bem estabelecido (Fisher *et al.*, 1992), sendo utilizados por receptores acoplados a proteína G como os receptores colinérgicos, noradrenérgicos serotoninérgicos e glutaminérgicos

(Colodny & Hoffman, 1998). Teoricamente, um desequilíbrio da concentração de inositol pode potencialmente afetar o desenvolvimento e a função de um ou de todos estes receptores. Portanto, qualquer órgão do sistema que abriga estes receptores pode também ser potencialmente afetado. As formas fosforiladas do inositol participam de funções fundamentais da célula, como sinalização de membrana, manutenção do citoesqueleto, regulação da sobrevivência e morte celular, produção de ácido araquidônico entre outras (Wymann & Schneite, 2008). O inositol 1, 4, 5 – trifosfato (IP3), por exemplo, tem papel central na mobilização do cálcio intracelular (Walsh, 1993); o inositol hexafosfato (IP6), por sua vez, inibe a cristalização do oxalato de cálcio urinário, prevenindo os cálculos renais (Grases *et al.*, 1999) e apresentação anticancerígena (Lee *et al.*, 2005). A sua possível aplicação em doenças cardiovasculares se justifica por possuir potente ação antioxidante prevenindo a formação de ROS, ação hipocolesterolêmica e inibição da agregação plaquetária (Jariwalla RJ, 1999.; Vucenik & Shamsuddin, 2003). Em sua forma livre o inositol além de apresentar um importante papel como base estrutural na formação dos segundos mensageiros das vias de transdução de sinais em células eucarióticas, como o IP3, é também essencial na formação estrutural dos dois inositóis fosfoglicanos (IPGs) que atuam como mediadores da ação da insulina (Asplin *et al.*, 1993). Os IPGs são liberados rapidamente das membranas plasmáticas hepáticas em resposta a insulina que estimula a hidrólise do glicosil-fosfatidilinositol (GPI) gerando os segundos mensageiros IPGs (Jones & Nieto, 1999). Duas classes de inositóis fosfoglicanos foram identificadas: a primeira classe denominada IPG-P, contendo D-quiró-inositol e galactosamina sendo ativador de PDH fosfatase e a segunda denominada IPG-A, contendo mio-

inositol e glucosamina sendo inibidor de adenilato ciclase e PKA (Larner *et al.*, 1988.; Croze & Soulage, 2013). Ambos os IPGs contribuem para a homeostase da glicose visto que anormalidades no metabolismo do mio-inositol e quiro-inositol, estão associadas à resistência à insulina, uma manifestação precoce importante do diabetes tipo II, assim como hipertensão, obesidade e doenças cardiovasculares (Croze & Soulage, 2013.; Asplin *et al.*, 1993). Outra área de enorme importância do inositol livre é a regulação do volume celular, onde eletrólitos e partículas osmoticamente ativas estão em constante fluxo. Nos casos de mudanças agudas na tonicidade, a manutenção do volume celular se dá pela troca de íons como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup>, porém nos casos de mudanças crônicas da tonicidade o controle se dá pelo transporte de osmólitos orgânicos, primariamente o mio-inositol (Strange 1992.; Lang 1998.; Fisher *et al.*, 2002). A diminuição de ATP em situações de hipoxia pós-AVC pode acarretar em diminuição do efluxo de inositol, com conseqüente piora do edema neuronal (Jackson, 1994). O inositol livre é também essencial à várias funções celulares incluindo sobrevivência e crescimento celular (Croze & Soulage, 2013), desenvolvimento e função dos nervos periféricos (Chau *et al.*, 2005), osteogênese (Dai *et al.*, 2011) e reprodução (Beemster *et al.*, 2002.; Bizzarri & Carlomagno, 2014).

As aplicações clínicas do inositol podem ser tão amplas quanto suas funções no organismo. O sistema nervoso central (SNC) é um tecido atípico que apresenta concentrações de inositol significativamente mais altas em relação a outros tecidos e à concentração plasmática. Uma alteração na biodisponibilidade de inositol no SNC pode alterar a via de sinalização celular no cérebro e

eventualmente levar ao desenvolvimento de doenças neurológicas e psiquiátricas. Estudos indicam que o inositol tem efeitos psicoativos por interagir com os sistemas de segundo mensageiros e regular a concentração citosólica de cálcio no cérebro (Colodny & Hoffman, 1998). Estudos avaliando a eficácia do inositol no tratamento de síndromes do SNC mostram que a suplementação com inositol pode ser eficaz no tratamento da depressão (Levine *et al.*, 1995), Doença de Alzheimer (Barak *et al.*, 1996), Síndrome do Pânico (Benjamin *et al.*, 1995), Síndrome Obsessiva–Compulsiva (Harvey *et al.*, 2002) e controle da dor (Tarnow *et al.*, 1998).

Estudos mostram que os inositóis constituem um grupo de substâncias que possuem grande potencial para o tratamento da diabetes. Trabalhos investigando o efeito de inositóis sobre a homeostase da glicose sanguínea e sobre o transporte de glicose em células musculares esqueléticas mostram que as administrações agudas e crônicas dos inositóis, D-quiró-inositol e D-pinitol (3-O-metil-quiró-inositol) em modelos animais de diabetes reduzem a hiperglicemia e aumentam a recapitação de glicose em células musculares (Bates *et al.*, 2000), e a suplementação com mio-inositol e D-quiró-inositol reduzem significativamente a taxa de excreção de glicose urinária e as concentrações de insulina e glicose plasmáticas pós-prandial em modelos animais resistentes à insulina (Ortmeyer, 1996), exercendo assim, um efeito mimético à insulina ao melhorar o controle glicêmico (Bates *et al.*, 2000). Mais evidências para um possível efeito mimético à insulina dos inositóis vêm de estudo em adipócitos isolados de ratos, no qual os inositóis mimetizaram os efeitos lipogênicos e antilipolítico da insulina (Croze & Soulage, 2013.; Machicao *et al.*, 1990).



Nos principais locais de desenvolvimento das complicações diabéticas (rins, nervo ciático, retina) uma depleção de mio-inositol intracelular é normalmente observada em indivíduos diabéticos (Croze & Soulage, 2013). A inibição da recaptação de inositol em nervos periféricos estaria implicada na etiologia da neuropatia diabética, com a hiperglicemia levando a uma redução do inositol intracelular pela ativação da enzima aldose redutase, o que levaria a um acúmulo de sorbitol e inibição da recaptação do inositol, com conseqüente diminuição de sua concentração intracelular (Fisher *et al.*, 2002). A neuropatia diabética está associada com redução da atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , a qual é importante para a manutenção do potencial de membrana, e redução na velocidade da condução nervosa, que é característica da diabetes tanto humana quanto experimental (Zhu & Eichberg, 1990). Estudos mostram que a suplementação alimentar com mio-inositol pode aliviar os sintomas relacionados à neuropatia diabética, restaurando os níveis de mio-inositol nos nervos periféricos, assim como a atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  e a velocidade da condução nervosa ao normal, sendo demonstrada essa possibilidade em quadros desta patologia induzidos experimentalmente (Yorek *et al.*, 1993; Zhu & Eichberg, 1990). A depleção de mio-inositol induzida pela hiperglicemia é também associada com distúrbios hemodinâmicos nos rins de indivíduos diabéticos que acreditam ter um papel importante no desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética. Os níveis de glicose elevados estimulam a transcrição e secreção de pró-colágeno em células do túbulo proximal induzindo hipertrofia celular e redução da proliferação celular. A suplementação com mio-inositol reverteu a redução

induzida pela glicose na proliferação celular e o aumento na transcrição e secreção do pró-colágeno (Ziyadeh *et al.*, 1991; Croze & Soulage, 2013).

A disfunção endotelial, caracterizada por uma redução na produção e/ou biodisponibilidade de NO, é um dos fatores que contribui para a origem das doenças cardiovasculares tais como a hipertensão arterial, hipercolesterolemia (Kingwell, 2000; John e Schmieder, 2000), a aterosclerose, a insuficiência cardíaca (Busse & Fleming, 1996; Davignon & Ganz, 2004) e as doenças isquêmicas (John & Schmieder, 2000). A hiperglicemia e dislipidemia são fatores de riscos para a disfunção endotelial e um mecanismo subjacente é o aumento na geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) (Brownlee, 2001; Pepine, 2009).

Estudos investigando o efeito de inositóis sobre a disfunção endotelial em modelos animais de diabetes mostram que o tratamento crônico e o agudo com os inositóis são capazes de prevenir e reverter a disfunção endotelial em leitões mesentéricos e aorta de rato e em corpo cavernoso de coelhos (Nascimento *et al.*, 2006). Neste estudo os inositóis reduziram significativamente os níveis de glicose e triglicerídeos plasmáticos, restauraram o relaxamento vascular em resposta à acetilcolina, reduziram a geração de ROS em condições hiperglicêmicas em células endoteliais e atuaram como sequestradores de superóxido (Nascimento *et al.*, 2006), apresentando importante papel como agentes terapêuticos na prevenção e tratamento da disfunção endotelial e erétil e da síndrome metabólica em virtude de seus efeitos protetores na sinalização do NO, antioxidantes e metabólicos.

A síndrome do ovário policístico (PCOS) é uma das doenças metabólicas – endócrinas mais comum, afetando cerca de 10 % das mulheres na idade

reprodutiva (Baillargeon, 2005). É caracterizada por hiperandrogenismo, hirsutismo, disfunção ovulatória e ovários policísticos (Saha *et al.*, 2012). Evidências suportam o papel central da resistência à insulina (IR) e hiperinsulinemia compensatória na patogênese da síndrome e no risco de desenvolvimento de dislipidemia, hipertensão, intolerância à glicose, diabetes mellitus tipo II e doenças cardiovasculares (Donà *et al.*, 2012). Algumas ações da insulina podem envolver mediadores IPGs e sugerem que uma deficiência do IPG contendo D-quiró-inositol e ou alteração em seu metabolismo em tecidos alvos da insulina (fígado, músculo e gordura) pode reduzir os IPGs envolvidos na transdução de sinais da insulina e contribuir para a resistência à insulina (Villeneuve *et al.*, 2009.; Croze & Soulage, 2013). A resistência à insulina e diabetes estão associados com níveis baixos de D-quiró-inositol na urina, plasma e nos tecidos alvos da insulina, excreção urinária de mio-inositol excessiva e deficiência de mio-inositol em tecidos insensíveis à insulina (rins, nervo ciático e retina) (Villeneuve *et al.*, 2009.; Asplin *et al.*, 1993). A redução da hiperinsulinemia pela inibição da liberação de insulina pancreática ou melhora na sensibilidade da insulina periférica, está associada com uma redução nos andrógenos circulantes, uma melhora da função ovulatória e aumento da fertilidade em mulheres com PCOS (Croze & Soulage, 2013). Estudos do potencial papel terapêutico do mio-inositol em doenças metabólicas mostram que a suplementação com mio-inositol pode melhorar os parâmetros hormonais e metabólicos restaurando a atividade ovariana espontânea e conseqüentemente a fertilidade em mulheres com PCOS (Bizzarri & Carlomagno, 2014). Uma melhora significativa dos parâmetros hormonais típicos é obtida em mulheres com PCOS após tratamento com mio-

inositol como: redução dos hormônios luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e níveis circulantes de testosterona, aumento de globulina transportadora de hormônio sexual (SHBG), estrógeno e níveis circulantes de progesterona (Gerli *et al.*, 2007; Genazzani *et al.*, 2008). Os marcadores de riscos cardiovasculares também foram melhorados, com redução dos triglicérides, colesterol LDL, e da pressão arterial e aumento do colesterol HDL (Costantino *et al.*, 2009; Gerli *et al.*, 2007). O mecanismo de ação do mio-inositol parece ser baseado principalmente sobre a melhora da sensibilidade à insulina nos tecidos alvos, resultando na redução da insulinemia que tem um efeito positivo sobre o eixo reprodutivo e as funções hormonais. A suplementação com mio-inositol para prevenir ou reduzir a resistência à insulina foi investigada em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica e em mulheres com diabetes gestacional. A melhora no controle da glicose obtida nas mulheres grávidas suplementadas com mio-inositol resultou em uma redução significativa de algumas consequências na gravidez relacionadas à hiperglicemia, em particular a macrosomia fetal (Corrado *et al.* 2011). Em mulheres pós-menopausa, a suplementação com mio-inositol melhorou também os parâmetros de riscos cardiovasculares (Santamaria *et al.* 2012). Portanto, a suplementação alimentar com mio-inositol parece ser um meio eficaz e seguro de combater a resistência à insulina e riscos cardiovasculares associados à mulher em um contexto de PCOS, diabetes gestacional ou síndrome metabólica pós-menopausa.

Estudos mostram que os inositóis produzem efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular como a melhora da função endotelial e das síndromes metabólicas (Nascimento *et al.* 2006). A natureza exata destes efeitos protetores

continua a ser investigada, mas pode estar relacionada em parte à suas ações antioxidante e metabólica, bem como à ação direta dos inositóis no endotélio vascular. Neste contexto, a avaliação e caracterização do efeito dos inositóis naturais, mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol sobre o sistema vascular, através da análise do papel do endotélio na modulação do tônus vascular induzida pelos inositóis é de extrema importância.

# **Objetivos**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Investigar o efeito vasodilatador e o respectivo mecanismo de ação do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o papel do endotélio no efeito vasodilatador dos inositóis;
- Investigar a participação do mediador endotelial, NO, no mecanismo de ação vasodilatadora dos inositóis;
- Determinar a produção intracelular de NO endotelial em estímulo aos inositóis;
- Investigar a participação da eNOS e o seu mecanismo de ativação pelos inositóis;
- Avaliar a participação da via de sinalização independente de cálcio na ativação da NOS endotelial pelos inositóis;
- Avaliar a participação da via de sinalização dependente de cálcio na ativação da NOS endotelial pelos inositóis;
- Avaliar a mobilização de cálcio em células endoteliais no efeito vasodilatador dos inositóis;
- Avaliar a dependência de transporte dos inositóis do meio extracelular para o intracelular em seus mecanismos de ação vasodilatadora.

# ***Materiais e Métodos***



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Modelos animais**

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar com idade entre 10 e 12 semanas (180 e 230g), obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG. Os ratos foram mantidos em caixas coletivas, em ambientes com ciclos de luminosidade de 12 horas (07:00 às 19:00h) com temperatura variando entre  $27 \pm 2,0$  °C e livre acesso à ração e água. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) - UFMG, protocolo nº 037/07.

#### **3.2. Materiais**

##### **3.2.1. Substâncias e sais**

Os sais bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de cálcio bi-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e glicose para o preparo das soluções, com grau de pureza analítica, foram obtidos da companhia, Synth; fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foi obtido da companhia, Merck; As drogas cloreto de acetilcolina (Ach), hidrocloreto de L-fenilefrina (Phe), hidrocloreto de N<sup>G</sup>-nitro L-arginina metil éster (L-NAME), mio-inositol e D-qui-ro-inositol foram obtidos da companhia, Sigma-Aldrich.

O bornesitol foi isolado de *Hancornia speciosa* Gomes (Mangabeira) e fornecido pelo professor Dr. Fernão Castro Braga (Laboratório de Fitoquímica/ Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG). O método de isolamento foi descrito por Endringer et al., (2007).

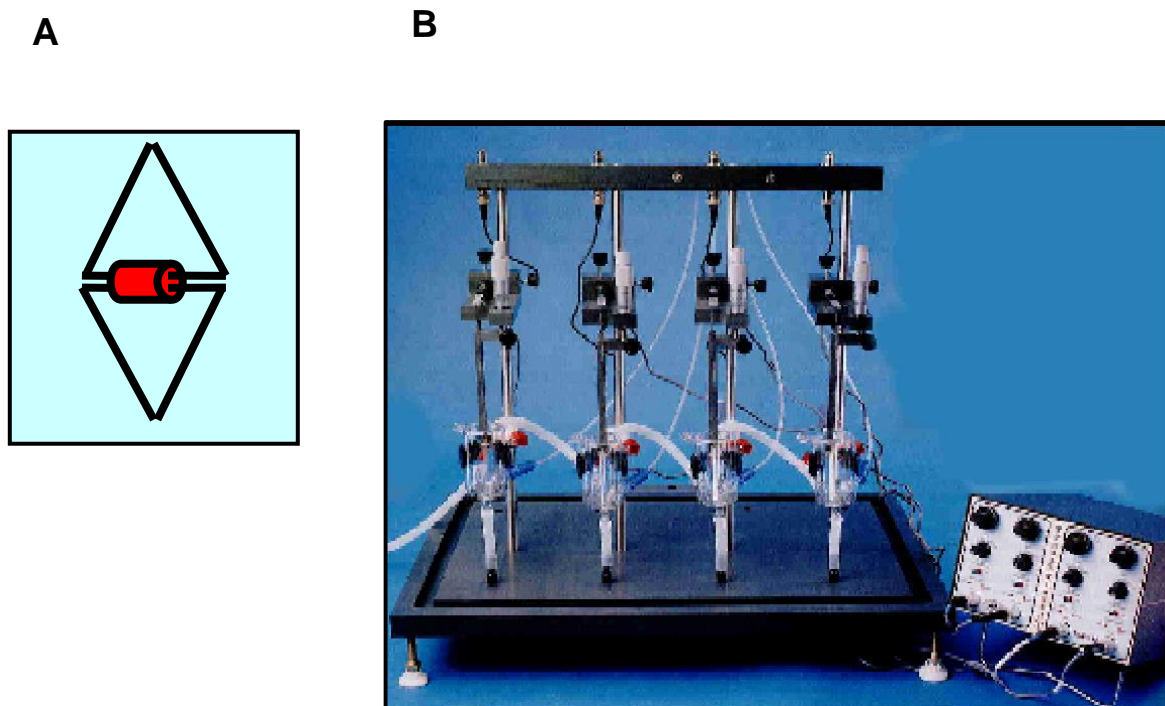
### **3.3 Métodos**

#### **3.3.1 Experimentos de reatividade vascular**

##### **3.3.1.1 Obtenção e montagem dos anéis de aorta**

Os anéis de aorta foram montados em um sistema de banhos para órgãos isolados como descrito por Lemos et al. (2005). Após o sacrifício dos animais, por decaptação e exsanguinação, a aorta torácica foi cuidadosamente dissecada, livre de tecido adiposo perivascular e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; MgSO<sub>4</sub> 1,07; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 e glicose 11,5). Em seguida, a artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 3-4mm de comprimento. Os anéis de aorta foram conectados a hastes metálicas (Figura 4A), que foram passadas através do lúmen dos vasos, e em seguida acopladas a transdutores isométricos para a obtenção dos registros experimentais (Figura 4B). A preparação ficou suspensa em cubas de vidro contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit, aerada continuamente com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>; White Martins<sup>®</sup>, Brasil), mantida à temperatura de 37±1 °C e pH de 7,4. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1g. A tensão foi regulada durante a primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutritora contida nas cubas de vidro foi trocada a cada 15 minutos, objetivando-se, dessa forma, evitar o acúmulo de metabólitos bem como a restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular.

Os registros experimentais foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., USA) conectados a um amplificador (Modelo TBM-4; World Precision Instruments, Inc. USA), acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico/digital (AD16JR; World Precision Instruments, Inc. USA). O programa WinDaq Data Acquisition (DataqInstruments, USA) foi utilizado para aquisição e análise dos dados experimentais.



**Figura 4.** (A) Esquema representativo da conexão dos vasos às hastes metálicas; (B) Sistema de aquisição de dados da reatividade vascular de vasos isolados.

### **3.3.1.2 Avaliação da integridade endotelial**

Após o período de estabilização, foram realizados testes de funcionalidade endotelial. Os anéis foram pré-contraídos com o agonista  $\alpha_1$  adrenérgicos, fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ; Sigma<sup>®</sup>, USA), e no platô da contração, o agonista muscarínico ACh (1  $\mu\text{M}$ ; Sigma<sup>®</sup>, USA) foi adicionado para avaliação da presença de endotélio funcional. Após atingir o relaxamento máximo, a solução nutritora de Krebs-Henseleit, foi trocada (por três vezes). O procedimento anteriormente descrito foi repetido após 30 minutos. Os anéis de aorta que apresentaram um relaxamento superior a 70%, em relação à contração máxima induzida pela fenilefrina, foram considerados como contendo endotélio funcional.

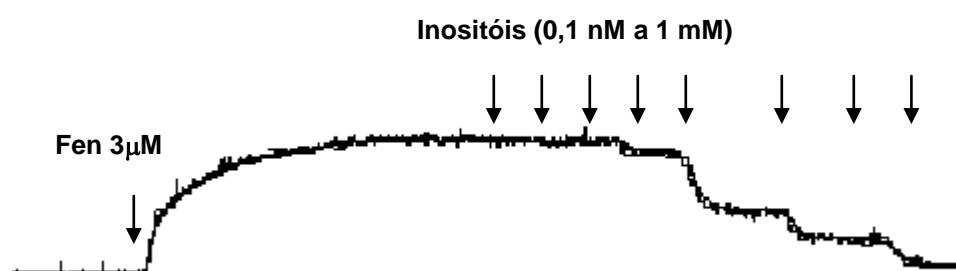
### **3.3.1.3 Remoção do endotélio vascular**

Quando necessário, a remoção do endotélio foi feita de forma mecânica, com o auxílio de uma haste metálica friccionada delicadamente ao lúmen do vaso. A retirada do endotélio foi confirmada pela ausência de efeito relaxante em resposta a ACh (1  $\mu\text{M}$ ), nos vasos pré-contraídos com fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ).

### **3.3.2 Estudo do efeito vasodilatador dos inositóis em anéis de aorta**

Após o teste de funcionalidade vascular conforme descrito anteriormente e estabilização das preparações, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ) e, durante a fase tônica da contração, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com os inositóis (0,1 nM a 1 mM) (Figura 5), nos vasos contendo endotélio funcional. O mecanismo de ação vasodilatadora dos

inositóis foi avaliada na presença de inibidores farmacológicos das vias de sinalização que induzem o relaxamento do músculo liso. Os resultados obtidos foram comparados com o relaxamento induzido pelos inositóis nestas condições com a curva controle.



**Figura 5.** Esquema representativo da curva concentração-resposta cumulativa de relaxamento induzida pelos inositóis em anéis de aorta com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (3  $\mu$ M).

### 3.3.2.1 Avaliação da participação do endotélio no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol

Com a finalidade de estudar a participação do endotélio no efeito relaxante dos inositóis, eles foram administrados sobre a contração sustentada induzida pela fenilefrina (3  $\mu$ M) nos anéis de aorta, na presença e na ausência de endotélio funcional. Nos anéis desprovidos de endotélio a retirada do endotélio foi realizada como citado no item 3.3.1.3. A participação do endotélio foi avaliada por comparação do efeito vasodilatador dos inositóis nos vasos desprovidos de endotélio funcional com o efeito obtido nos vasos contendo endotélio funcional.

### **3.3.2.2 Avaliação da participação do NO no efeito vasodilatador do mio- inositol, quiro-inositol e bornesitol**

Para avaliar a participação do mediador endotelial, NO, no efeito vasodilatador dos inositóis, os anéis de aorta foram pré-incubados por 15 minutos com o N<sup>G</sup>-Nitro L-Arginina Metil Éster (L-NAME 100 µM), inibidor não seletivo da NOS. Em seguida, na presença do L-NAME, curvas concentração-resposta cumulativas para os inositóis: (0,1 nM a 100µM), foram realizadas nos anéis pré-contraídos com fenilefrina (3 µM). A participação do NO endotelial no efeito vasodilatador dos inositóis foi avaliada comparando o efeito obtido nestas condições com a curva controle.

### **3.3.2.3 Avaliação da participação da via PI3K, no efeito vasodilatador do mio- inositol, quiro-inositol e bornesitol**

O objetivo deste protocolo foi avaliar se a possível ativação da enzima, eNOS, pelos inositóis estaria se dando por uma via independente de Ca<sup>2+</sup>, que é a via de ativação da PI3K/Akt. Para isto, o efeito dos inositóis foi avaliado na presença dos inibidores de PI3K, Wortmannin e LY 292004. Para tal, as preparações foram pré-incubadas com o Wortmannin (0,3 µM) e LY 292004 (20 µM) por um período de tempo de 15 minutos. Em seguida, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (3 µM). Assim que a contração em resposta a fenilefrina se estabilizou, curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas para os inositóis e os resultados comparados com a curva controle.

#### **3.3.2.4 Avaliação da participação da via $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol**

A eNOS é classificada como uma enzima constitutiva muito dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  para ser ativada de forma direta ou através da fosforilação por enzimas dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Flemig et al 2001). Sendo assim, o objetivo deste protocolo foi avaliar um eventual papel do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  na ativação da eNOS pelos inositóis. Para isto, as preparações foram incubadas com o inibidor do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , o calmidazólio ( $10 \mu\text{M}$ ), por um período de tempo de 30 minutos. Em seguida, os anéis de aorta foram pré-contráidos com fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ). Assim que a contração em resposta a fenilefrina se estabilizou, curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas para os inositóis e os resultados comparados com o efeito dos inositóis em condições controle.

#### **3.3.2.5 Avaliação da dependência de transporte dos inositóis do meio extracelular para o intracelular em seus mecanismos de ação vasodilatadora**

O objetivo deste protocolo foi avaliar a dependência de transporte dos inositóis do meio extracelular para o intracelular em seus mecanismos de ação vasodilatadora. Para isto, o efeito vasodilatador dos inositóis foi avaliado na presença de um inibidor de co-transportadores de inositol, o Florrizina. As preparações foram incubadas com o Florrizina ( $300 \mu\text{M}$ ) por um período de tempo de 15 minutos. Após o período de incubação, os anéis de aorta foram pré-contráidos com fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ). Assim que a contração em resposta a fenilefrina se estabilizou, curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas para

os inositóis e os resultados comparados com o efeito dos inositóis em condições controle.

### **3.3.3 Determinação da síntese endotelial de NO por microscopia de fluorescência**

Este método foi utilizado com o objetivo de se confirmar o aumento da produção de óxido nítrico endotelial em estímulo aos inositóis. Para tanto, segmentos de aorta de 2-3 mm foram abertos longitudinalmente e fixados a uma membrana de nitrocelulose pela face adventícia, sempre em presença de solução de Krebs-HEPES. Os segmentos foram incubados com 10 $\mu$ M da sonda fluorescente intracelular para o NO, 4-amino, 5-metilamino-2',7'-difluoresceína diacetato (DAF-FM diacetato; Calbiochem, San Diego, CA, USA), por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após duas lavagens para remoção do excesso de sonda do meio extracelular, a face endotelial das preparações foi analisada em um microscópio de epifluorescência (Olympus IX70, Tokyo, Japão). A sonda foi excitada a 480nm com uma lâmpada de xenônio e a emissão de fluorescência foi filtrada a 490-530nm. As imagens foram obtidas no repouso, 5, 15 e 30 minutos após a estimulação com os inositóis (100  $\mu$ M). A intensidade relativa de fluorescência foi calculada a partir das imagens obtidas antes e após a estimulação com os inositóis usando uma câmera digital Optronics modelo DEI-470 e o software Image Pro-Plus 5.0. A confirmação da especificidade de método foi avaliada pela incubação das preparações com L-NAME (100  $\mu$ M) 20 minutos antes da estimulação com os inositóis e por experimentos realizados em segmentos de aorta desprovidos de endotélio.



### **3.3.4 Análise dos níveis de fosforilação da eNOS em Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> por Western-blot**

Este método foi utilizado com o objetivo de se confirmar se o efeito vasodilatador dos inositóis estaria sendo via ativação da eNOS e produção de NO. Para tanto, os segmentos de aorta obtidos foram divididos em 04 placas contendo solução de Krebs-HEPES e mantidos por um período de 15 minutos para estabilização. Após o período de estabilização a solução foi trocada e os segmentos de aorta foram estimulados com os inositóis (100 µM) e mantidos em repouso por intervalos de tempo diferentes de 5, 15 e 30 minutos. Decorrido o tempo de estimulação de cada tecido, os mesmos foram transferidos para ependorffs e congelados a -80°C.

#### **3.3.4.1 Extração de proteínas**

Para a extração de proteína, os tecidos congelados foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi<sup>®</sup>, Brasil) em presença de tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris 50 mM; EDTA.2Na 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM) acrescido de 0,1% de nonidet P40, 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de cocktail de inibidores de proteases (SigmaFast<sup>®</sup>, Sigma). Foram utilizados inibidores de fosfatase (NaF 20 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1mM) 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 8.000 rpm 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 descrito por Lowry et al.(1951).

### 3.3.4.2 Separação eletroforética em gel de acrilamida

As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6%  $\beta$ -mercaptoetanol, Azul de Bromofenol). Para separação, foram aplicados 60  $\mu$ g de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida). Para o gel de separação foi utilizado gel na concentração de 7,5% e 4%.

### 3.3.4.3 Western-blot

Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore<sup>®</sup>, USA) com poro de 0,45 $\mu$ 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 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 4% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria (6-8°C) com o anticorpo primário específico. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-phospho-eNOS Ser<sup>1177</sup> (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-eNOS Thr<sup>495</sup> (1:1000, Santa Cruz); anti-eNOS (1:2000; Santa Cruz), e anti-GAPDH (1:3000, Sigma). 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) (1:5000, anti-goat IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP, Sigma). 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) e a intensidade das mesmas foram avaliadas por análise densitométrica através do software ImageJ 1.4. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD®, CA, USA).

### **3.3.5 Avaliação do aumento intracelular de cálcio em células endoteliais por microscopia confocal.**

Com o objetivo de avaliar o efeito dos inositóis sobre a concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em células endoteliais, foi usada a sonda fluorescente para cálcio Fluo-4AM (Invitrogen). Os anéis de aorta foram colocados em solução de Hanks (pH 7,4; 37°C), cuja composição é (mM): NaCl 145,0; KCl 5,0;  $MgCl_2$  1,0;  $CaCl_2$  1,6;  $NaH_2PO_4$  0,5; Glicose 10,0; Hepes 10,0. Com auxílio de uma lupa e lâmina de bisturi anéis de aproximadamente 0,2 mm foram obtidos e colocados em lamínula para microscopia confocal (42 mm de diâmetro) contendo solução de poli-lisina, mantidas em câmara úmida a 37°C, sob aeração com  $CO_2$  5%, por cerca de 15 minutos para fixação. Posteriormente, foi adicionado Fluo-4AM (10  $\mu$ M, diluído em Hanks), mantendo-se por mais 30 minutos. Após a incubação, o excesso de sonda foi removido lavando cuidadosamente com Hanks.

Utilizando um laser de argônio, o Fluo-4AM foi excitado a 488 nm e a emissão foi medida a 510 nm em microscópio confocal (Zeiss 510 META, CAPI-ICB/UFGM). Utilizando objetiva de imersão em óleo (63x) e imagem com 512x512 pixels. As imagens foram capturadas a cada segundo durante 10 minutos. O programa ImageJ foi usado para analisar as imagens. Foram selecionadas células (regiões de interesse) na camada endotelial. O aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  na presença

dos inositóis foi avaliado através da intensidade de fluorescência antes e depois dos estímulos. Considerou-se  $F_0$  como a fluorescência basal antes do estímulo,  $F$  como fluorescência final após o estímulo. Desta forma, a variação entre a fluorescência basal ( $F_0$ ) e a fluorescência após adição dos inositóis ( $F$ ) reflete o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  que é calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \Delta IF = (F - F_0 / F_0) \times 100.$$

### **3.4 Análises estatísticas e expressão dos resultados**

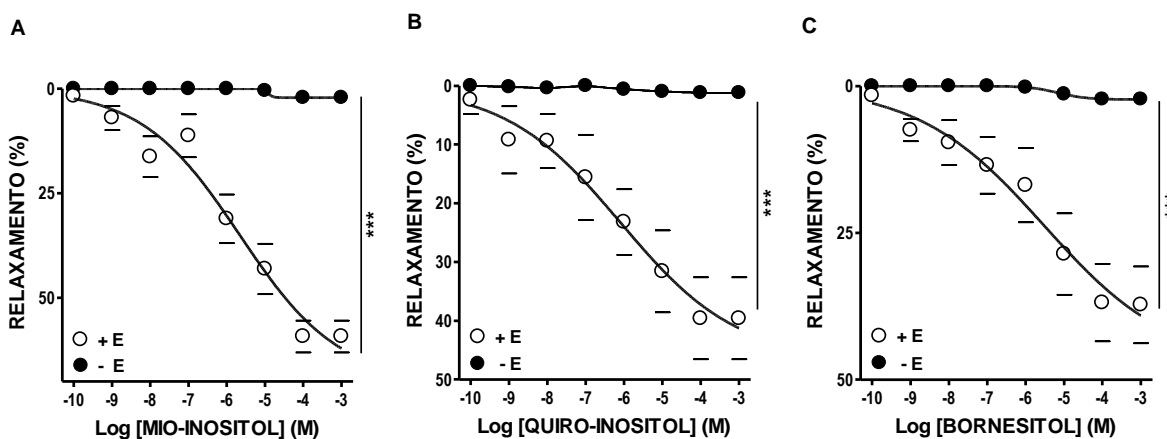
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 experimentos. Para os estudos funcionais, as análises estatísticas foram feitas através da análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). Os dados de Western blot foram expressos como média  $\pm$  EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de eNOS total ou GAPDH de cada amostra. As imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência por área. Os resultados expressos por gráficos de barras foram comparados pelos testes t de Student ou pelo método one-way ANOVA. Os gráficos e as análises estatísticas foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows (GraphPad Software San Diego, CA, USA). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e considerados significativos os valores de  $P < 0,05$ .

# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol e da participação do endotélio, em aorta de rato.

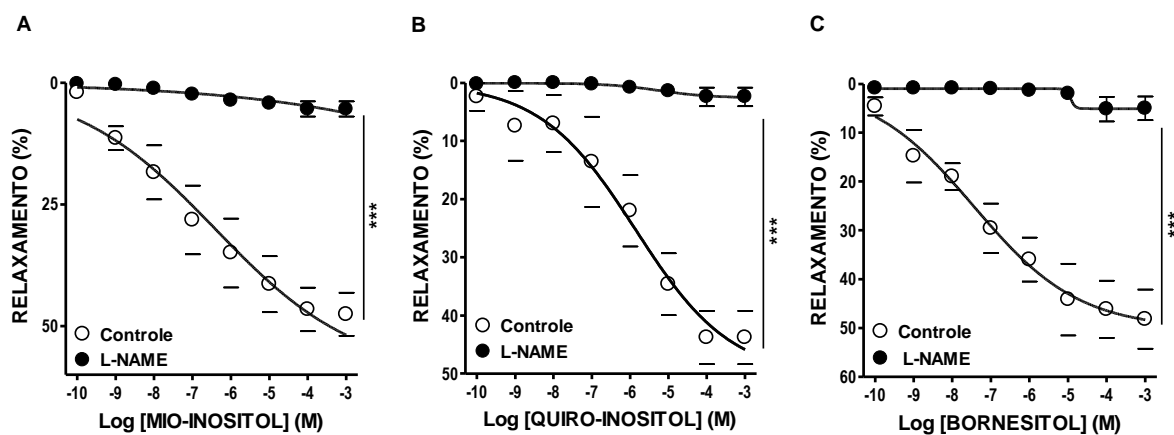
Nos experimentos que investigaram o efeito vasodilatador dos inositóis, o mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol induziram um efeito concentração-dependente em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (Figura 6). Nos anéis de aorta desprovidos de endotélio funcional, o efeito vasodilatador dos 3 inositóis foi abolido (Figura 6).



**Figura 6.** Efeito vasorrelaxante induzido pelo mio-inositol (A), quiro-inositol (B) e bornesitol (C) em anéis de aorta de rato, na presença (+E) ou na ausência (-E) de endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (3  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de cinco experimentos diferentes (n=5). \*\*\*P<0,001.

## 4.2 Avaliação da participação do NO no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol em aorta de rato.

O NO é um dos mediadores vasoprotetores mais importantes secretados pelo endotélio. Nos experimentos que investigaram o envolvimento do NO nos efeitos vasculares dos inositóis, o mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol induziram um efeito vasodilatador concentração-dependente em aorta de rato, com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (3  $\mu$ M). A incubação prévia dos vasos com L-NAME (100  $\mu$ M), inibidor não seletivo da NOS, foi capaz de abolir a vasodilatação induzida por estes inositóis (Figura 7).

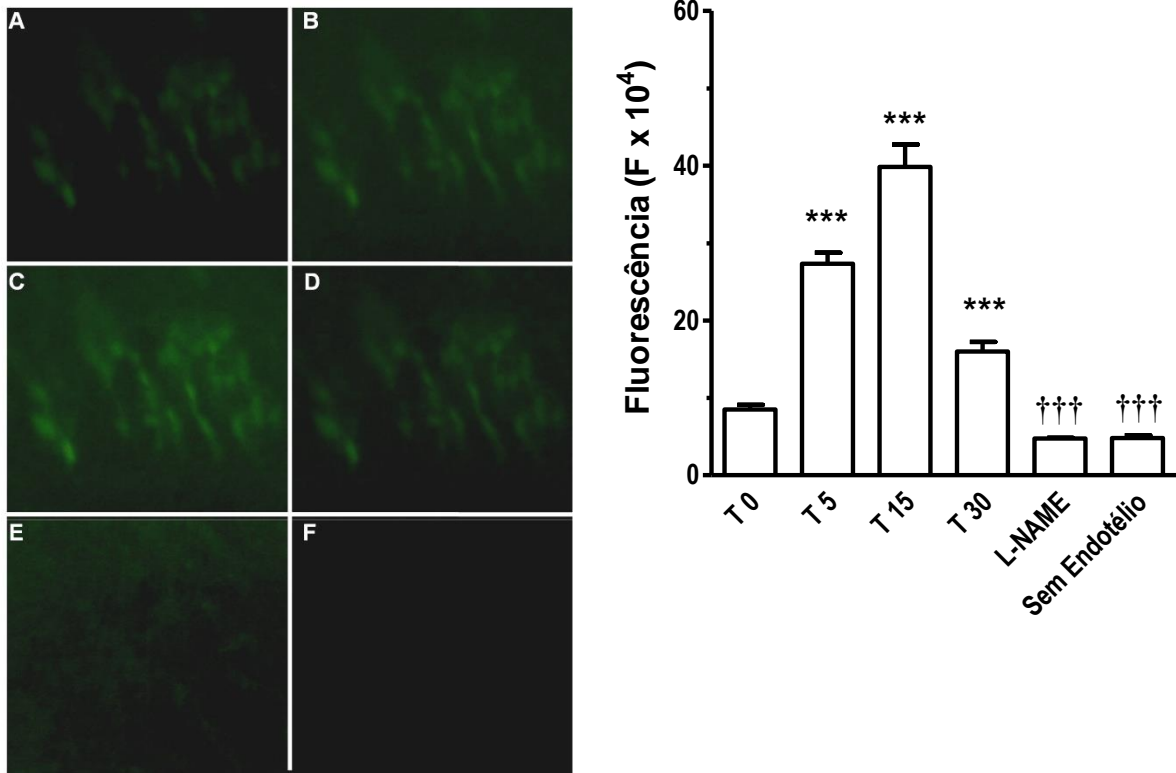


**Figura 7.** Efeito vasodilatador induzido pelo mio-inositol (A), quiro-inositol (B) e bornesitol (C) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (3  $\mu$ M), na presença e na ausência de L-NAME (100  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de cinco experimentos diferentes (n=5). \*\*\*P<0,001.

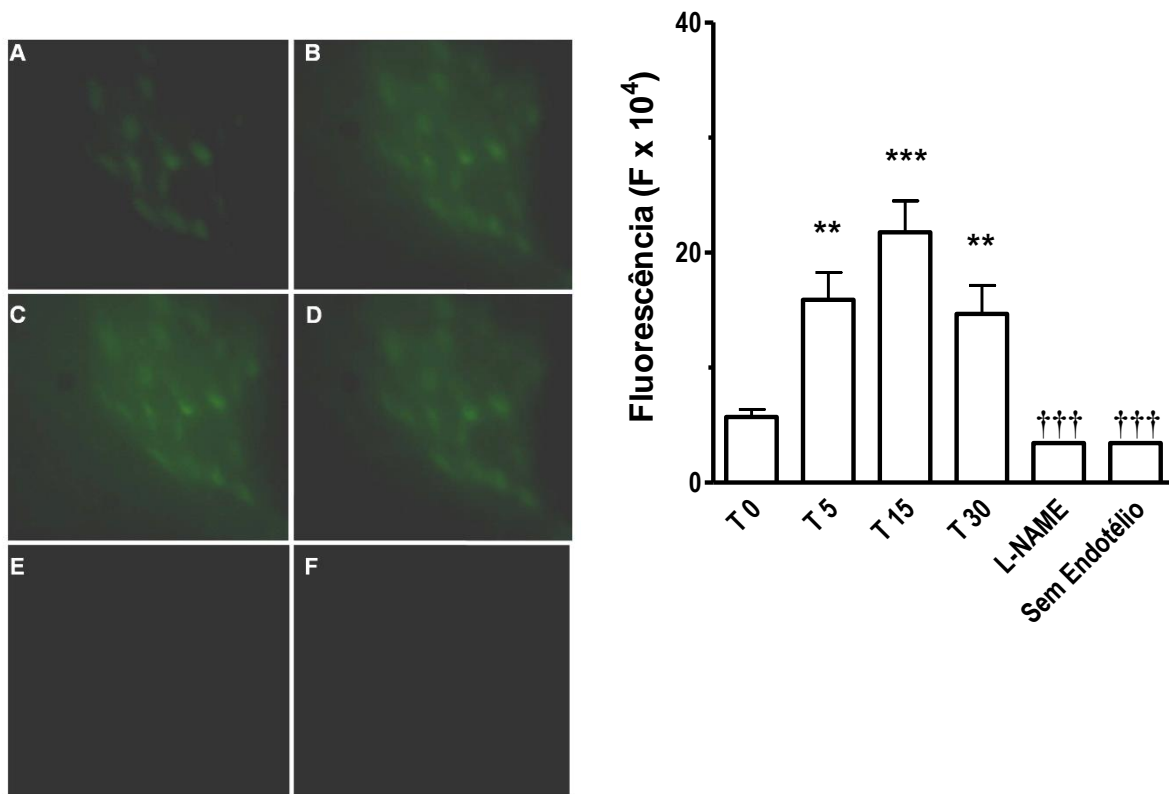
### **4.3 Determinação da produção intracelular de NO endotelial em estímulo aos inositóis.**

Uma avaliação direta da produção de NO pela técnica de microscopia de fluorescência, em células endoteliais, mostrou que mio-inositol (100  $\mu$ M), quiro-inositol (100  $\mu$ M) e bornesitol (100  $\mu$ M) produziram um aumento na fluorescência do DAF-FM diacetato comparada com o controle basal (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente). Esse aumento foi significativo nos tempos de 5, 15 e 30 minutos após a estimulação com o mio-inositol e quiro-inositol (Figuras 8 e 9) e de 5 e 15 minutos após estimulação com o bornesitol (Figura 10). A inibição não-seletiva da NOS com o L-NAME (100  $\mu$ M) ou a remoção do endotélio vascular inibiram o aumento de fluorescência do DAF-FM diacetato induzidos pelos inositóis. As médias das intensidades relativas de fluorescência são apresentadas nos histogramas das figuras 8, 9 e 10.

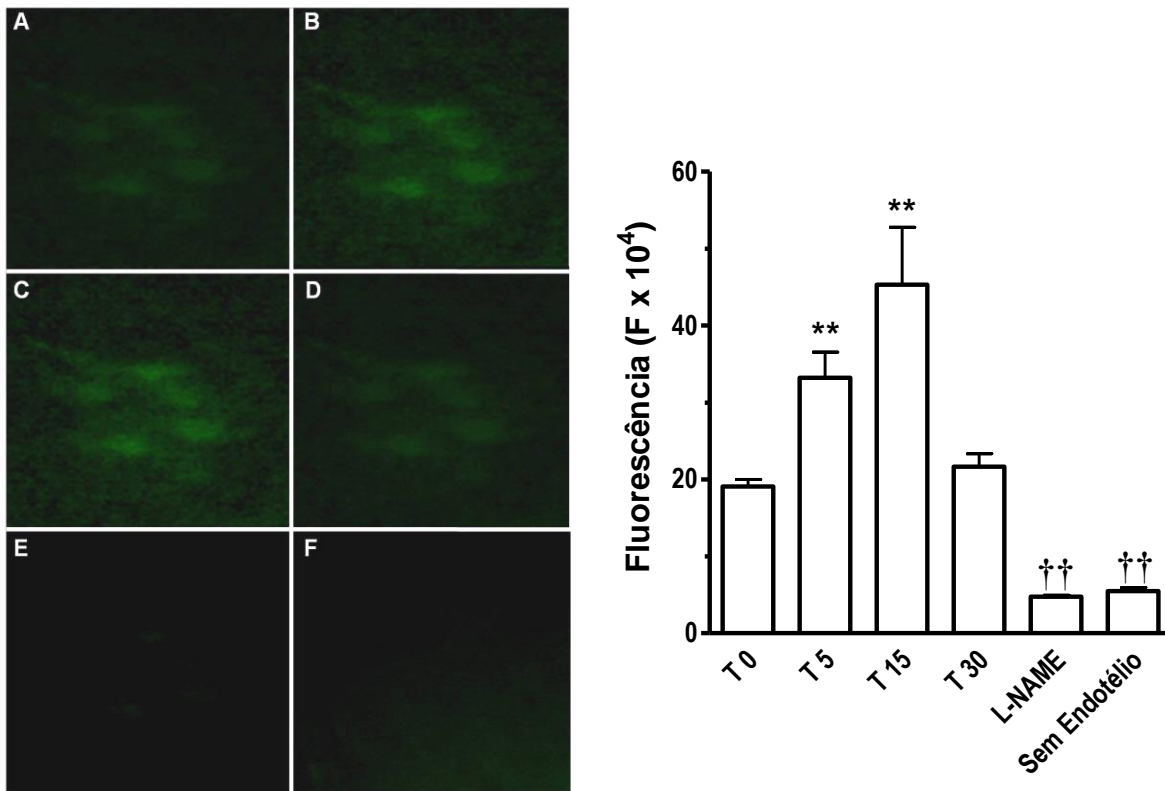




**Figura 8.** Determinação da produção de NO por microscopia de fluorescência utilizando a sonda intracelular DAF-FM diacetato. O mio-inositol (100  $\mu$ M) induziu aumento significativo na produção de NO nos intervalos de tempo de 5 (B), 15 (C) e 30 minutos (D), pelas células endoteliais em relação ao basal (A). A incubação com o L-NAME (100  $\mu$ M) (E) e a retirada do endotélio (F) aboliram o aumento da produção de NO. O histograma representa a média da intensidade de fluorescência das imagens obtidas em cinco experimentos diferentes (n=5). \*\*\*P<0,001 versus T0. †††P<0,001 versus T30.



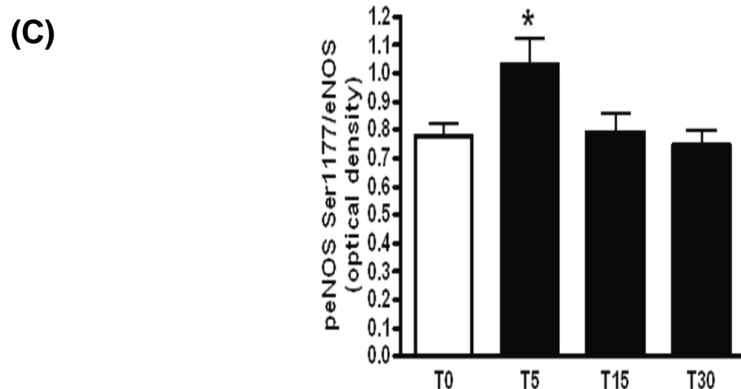
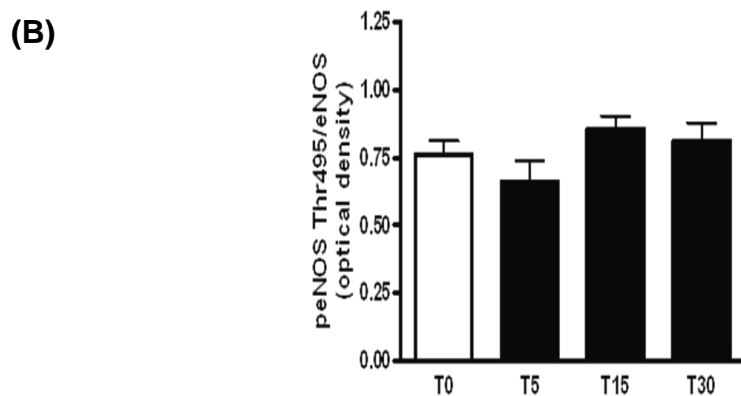
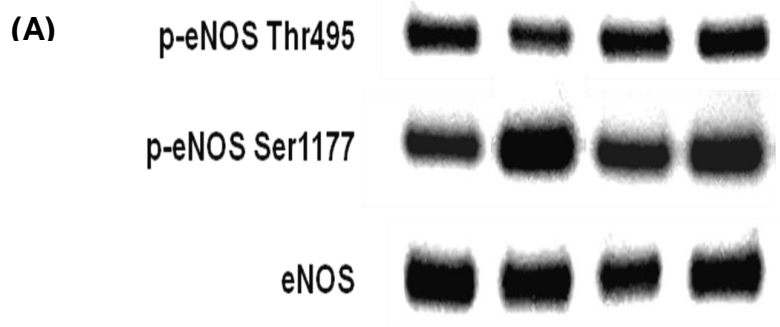
**Figura 9.** Determinação da produção de NO por microscopia de fluorescência utilizando a sonda intracelular DAF-FM diacetato. O quiro-inositol (100 $\mu$ M) induziu aumento significativo na produção de NO nos intervalos de tempo de 5 (**B**), 15 (**C**) e 30 minutos (**D**), pelas células endoteliais em relação ao basal (**A**). A incubação com o L-NAME (100  $\mu$ M) (**E**) e a retirada do endotélio (**F**) aboliram o aumento da produção de NO. O histograma representa a média da intensidade de fluorescência das imagens obtidas em cinco experimentos diferentes (n=5). \*\*P <0,01; \*\*\*P<0,001 versus T0. †††P<0,001 versus T30.



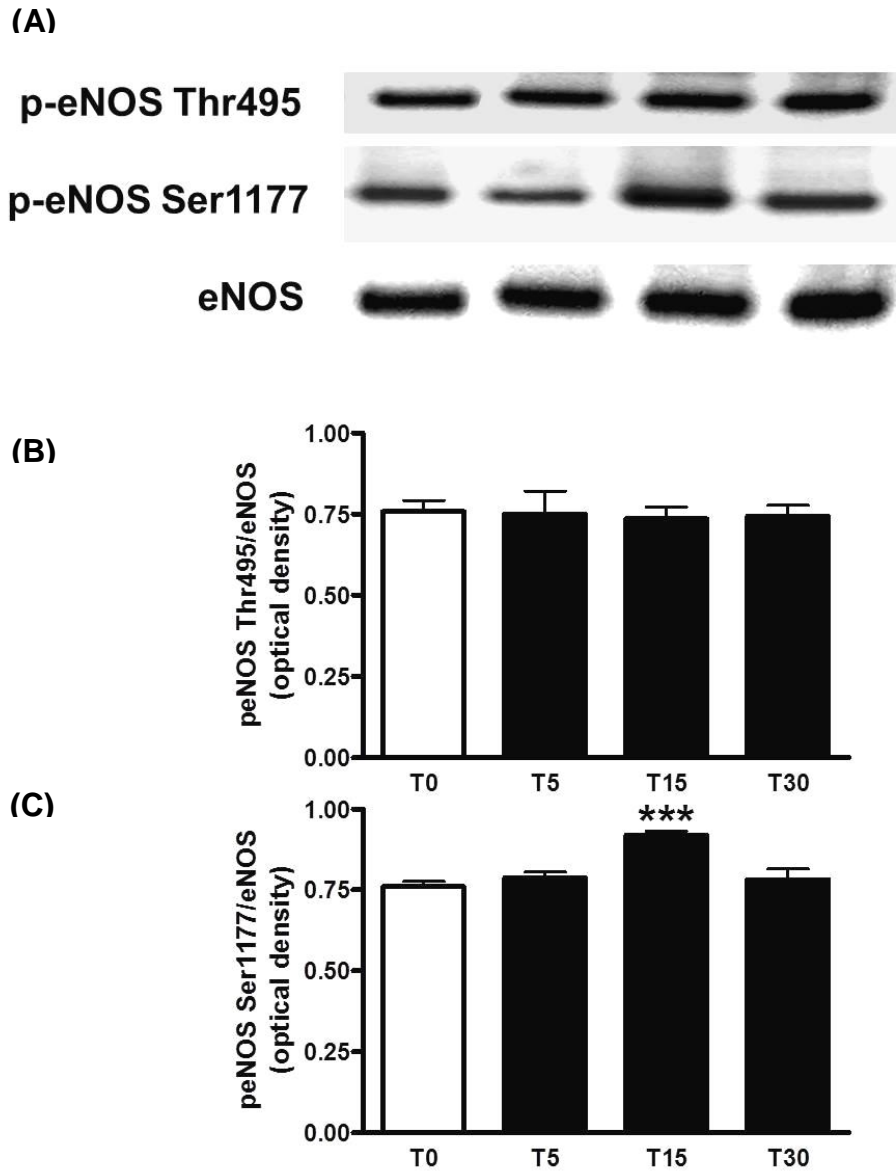
**Figura 10.** Determinação da produção de NO por microscopia de fluorescência utilizando a sonda intracelular fluorescente DAF-FM diacetato. O borsitol (100  $\mu$ M) induziu aumento significativo na produção de NO nos intervalos de tempo de 5 (B) e 15 minutos (C), pelas células endoteliais em relação ao basal (A). A incubação com o L-NAME (100  $\mu$ M) (E) e a retirada do endotélio (F) aboliram o aumento da produção de NO. O histograma representa a intensidade de fluorescência das imagens obtidas em cinco experimentos diferentes (n=5). \*\*P <0,01 versus T0. ††P <0,01 versus T30.

#### **4.4 Análise dos níveis de fosforilação da eNOS em Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> como indicador da funcionalidade da eNOS em aorta de rato estimulada com os inositóis.**

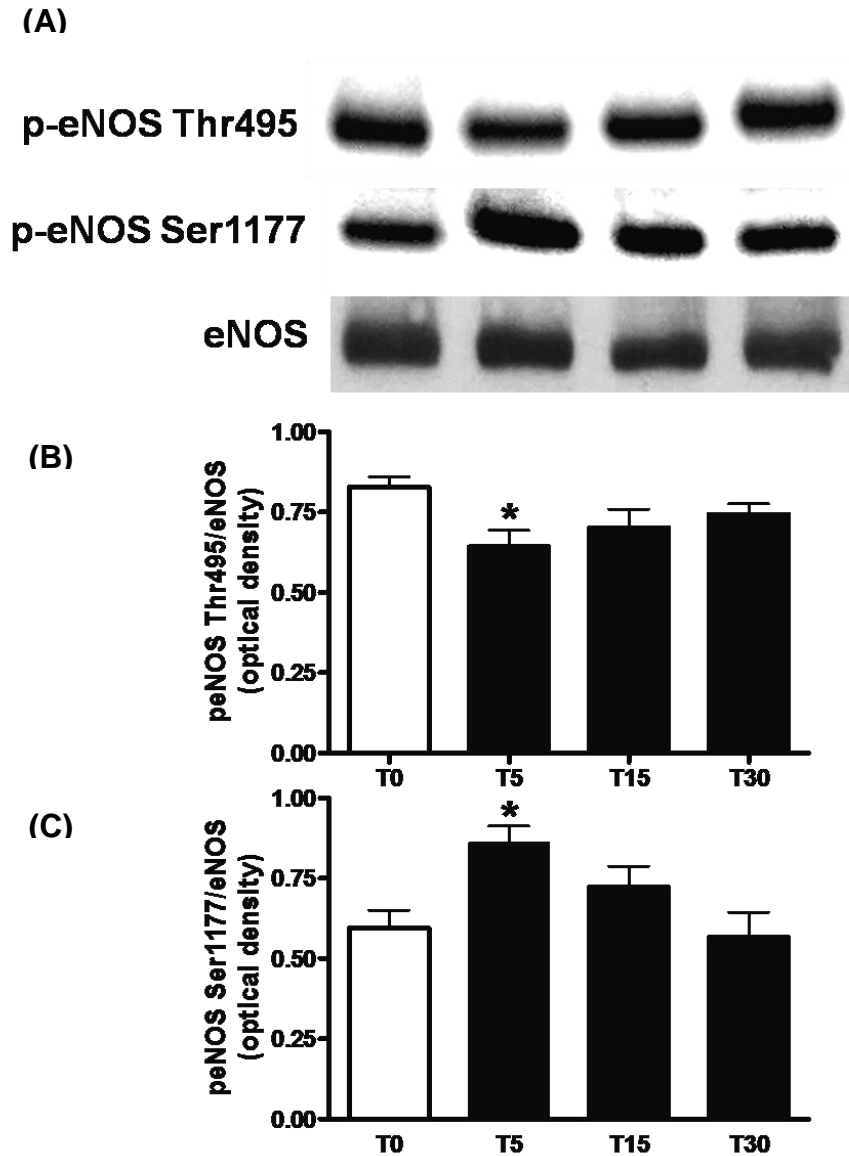
O próximo passo do estudo foi avaliar a funcionalidade da eNOS pelo grau de fosforilação em resíduos de serina e treonina, por Western-blot. Os nossos resultados mostraram que o mio-inositol (100 µM), o quiro-inositol (100 µM) e o bornesitol (100 µM) foram capazes de produzir um aumento na fosforilação da eNOS em Ser<sup>1177</sup> (Figuras 11, 12 e 13, respectivamente). Esse aumento foi significativo nos tempos de 5, 15 e 5 minutos, após a estimulação com o mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol. Entretanto, o mio-inositol e o quiro-inositol não produziram nenhuma alteração significativa na fosforilação da Thr<sup>495</sup> (Figuras 11 e 12), enquanto que o bornesitol apresentou uma redução significativa na fosforilação da Thr<sup>495</sup> no tempo de 5 minutos após o estímulo (Figura 13).



**Figura 11.** Análise do grau de fosforilação da eNOS em Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> por Western blot estimulada com mio-inositol (100µM). **(A)** Imunoblots representativos; **(B)** e **(C)** correspondem à análise densitométrica das bandas para p-eNOS. Os valores das análises dos sítios de fosforilação foram normalizados pelos valores das análises da expressão total da enzima. Os dados estão expressos como a média ± EPM de 4 experimentos. \*P<0,05 em relação ao controle, indicado por “T0”.



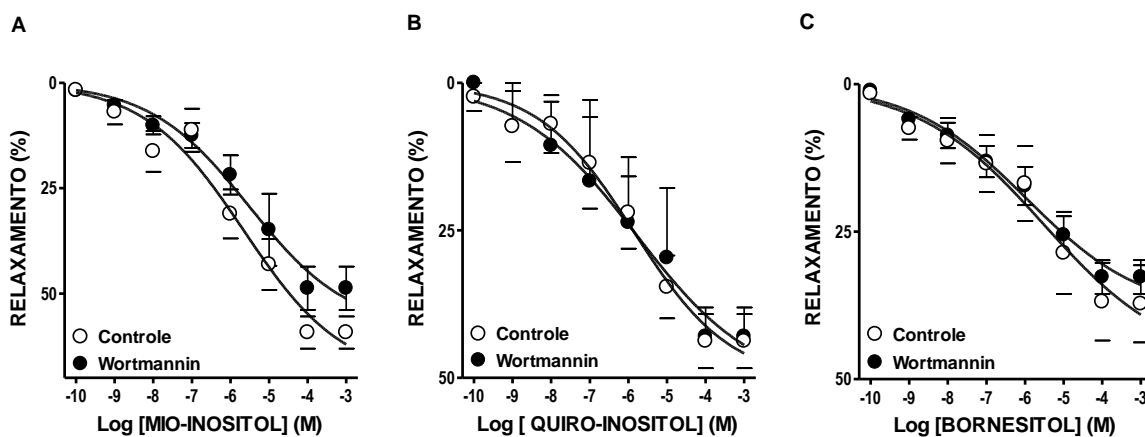
**Figura 12.** Análise do grau de fosforilação da eNOS em Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> por Western blot estimulada com quiro-inositol (100µM). **(A)** Imunoblots representativos; **(B)** e **(C)** correspondem à análise densitométrica das bandas para p-eNOS. Os valores das análises dos sítios de fosforilação foram normalizados pelos valores das análises da expressão total da enzima. Os resultados são mostrados como a média ± EPM de 4 experimentos. \*\*\*P<0,001 em relação ao controle, indicado por “T0”.



**Figura 13.** Análise do grau de fosforilação da eNOS em Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> por Western blot estimulada com bornesitol (100 µM). **(A)** Imunoblots representativos; **(B)** e **(C)** correspondem à análise densitométrica das bandas para p-eNOS. Os valores das análises dos sítios de fosforilação foram normalizados pelos valores das análises da expressão total da enzima. Os resultados são mostrados como a média ± EPM de 4 experimentos. \*P<0,05 em relação ao controle, indicado por “T0”.

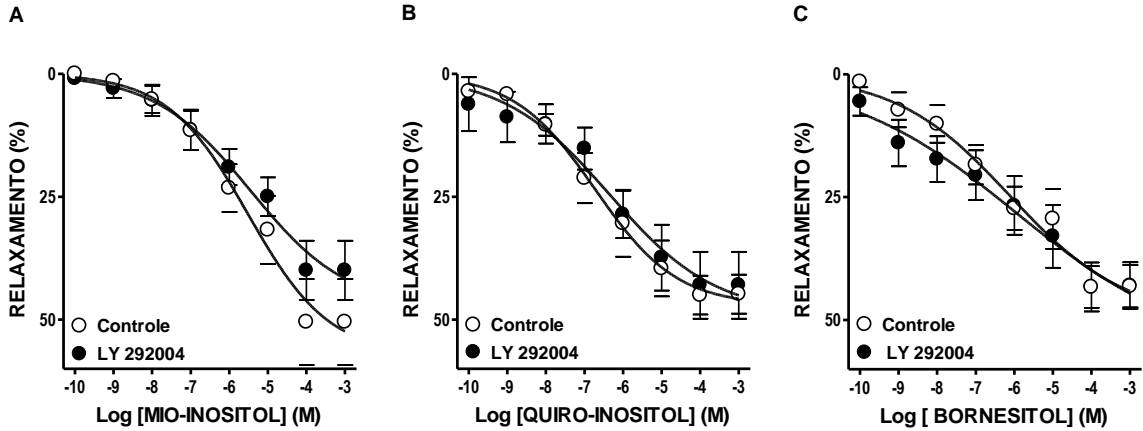
#### 4.5 Avaliação da participação da via PI3K, no efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.

A eNOS é uma enzima constitutiva dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , mas que também pode ser ativada pela via PI3K/Akt (Flemig et al, 2001). Nos experimentos que buscaram investigar o envolvimento da via PI3K/Akt nos efeitos vasculares dos inositóis em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ), os inibidores seletivos de PI3K, wortmannim ( $0,3 \mu\text{M}$ ) e LY 292004 ( $20 \mu\text{M}$ ) foram utilizados. O wortmannim (Figuras 14A, 14B e 14C) e LY 292004 (Figuras 15A, 15B e 15C) não modificaram o efeito vasodilatador dos inositóis.



**Figura 14.** Efeito relaxante induzido pelo mio-inositol (A), quiro-inositol (B) e bornesitol (C) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ) na presença e na ausência de wortmannin ( $0,3 \mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida de cinco experimentos diferentes ( $n=5$ ).



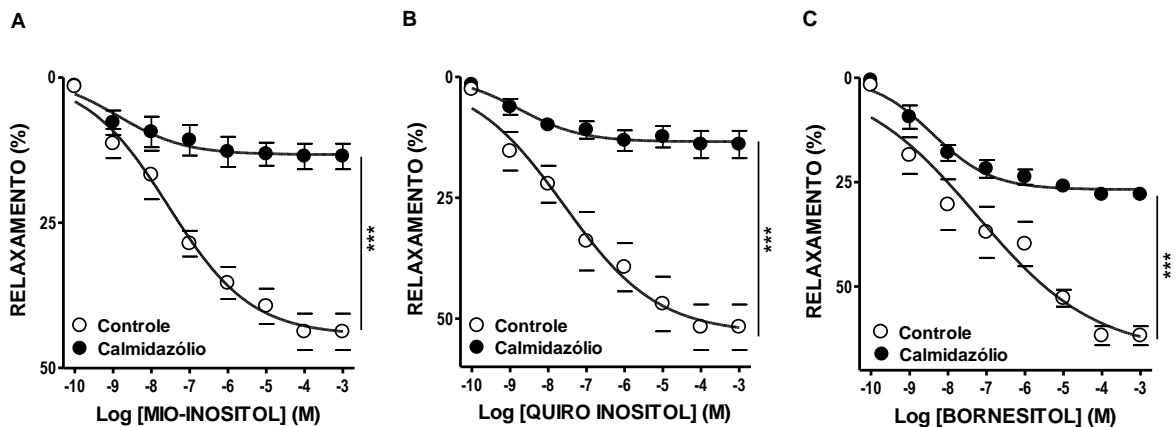


**Figura 15.** Efeito relaxante induzido pelo mio-inositol (A), quiro-inositol (B) e bornesitol (C) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contráidos com fenilefrina (3  $\mu$ M) na presença e na ausência de LY 292004 (20  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida de cinco experimentos diferentes (n=5).

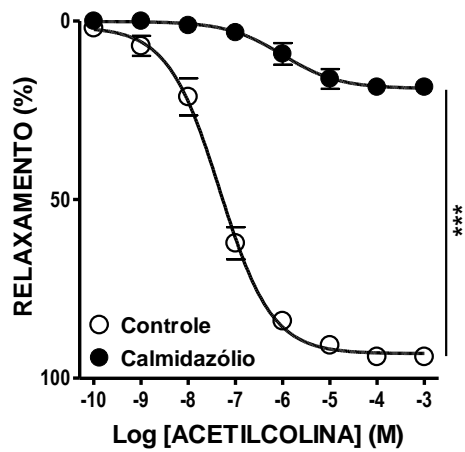
#### **4.6 Participação da via $\text{Ca}^{2+}$ /CaM no efeito vasodilatador induzido pelo mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.**

Conforme já mencionado acima, a eNOS é uma enzima constitutiva dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, mas que também pode ser ativada pela via PI3K/Akt (Flemig et al, 2001). Uma vez descartada, em experimentos anteriores, a participação da via independente de cálcio, PI3K/Akt, na ativação da eNOS induzida pelos inositóis, nós buscamos avaliar a via dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM. A formação do NO e a vasodilatação ocasionada pela estimulação desta via podem ser abolidas por antagonistas da CaM (Fleming & Busse, 1999).

A incubação dos vasos com calmidazólio (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor de CaM, inibiu significativamente a resposta relaxante do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol (Figura 16). Na mesma concentração o calmidazólio também inibiu as respostas vasorrelaxantes promovidas pela acetilcolina (Figura 17), comprovando a eficácia do inibidor.



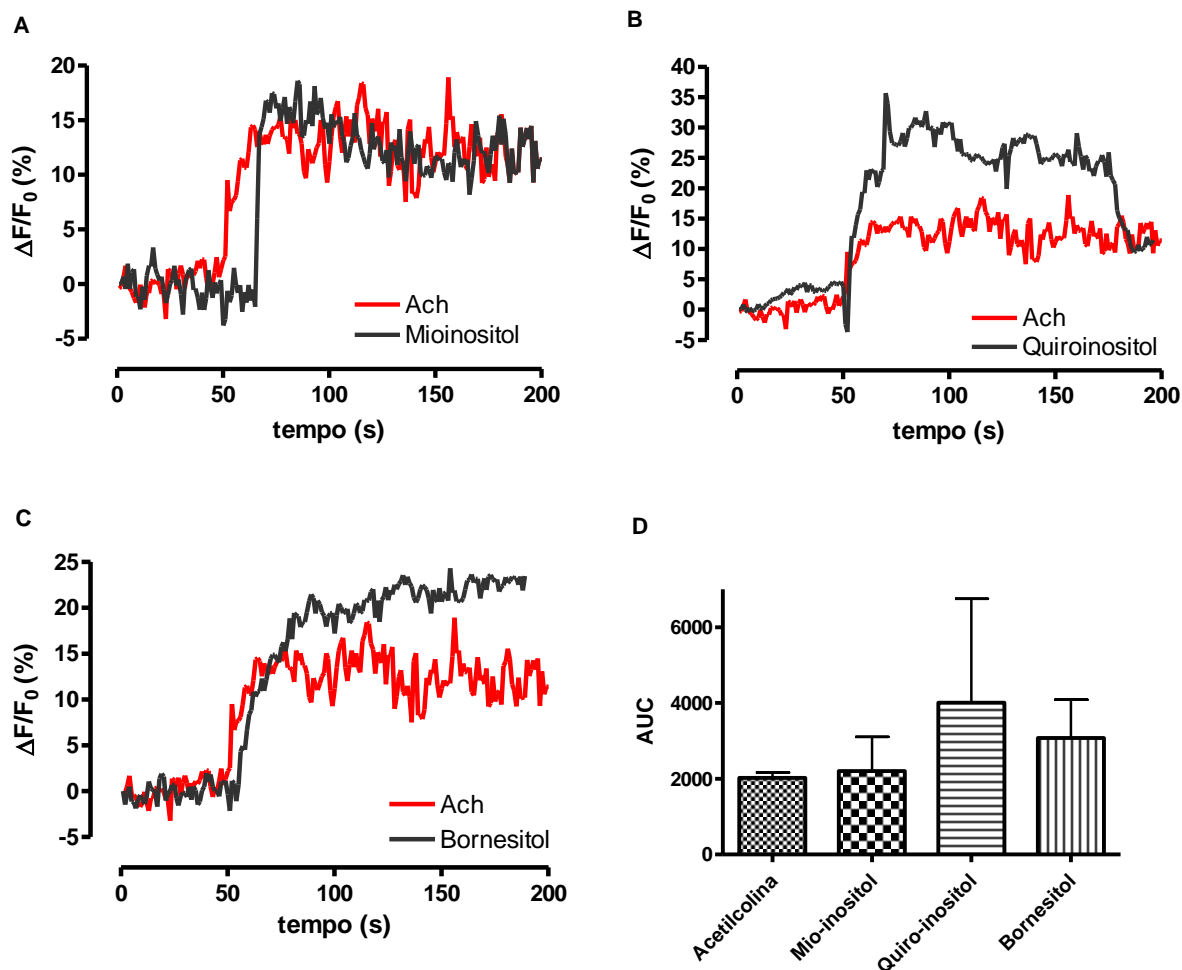
**Figura 16.** Efeito relaxante induzido pelo mio-inositol (A), quiro-inositol (B) e bornesitol (C) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contráídos com fenilefrina (3  $\mu$ M) na presença e na ausência de calmidazolío (10  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida de cinco experimentos (n=5). \*\*\*P<0,001.



**Figura 17.** Efeito relaxante induzido pela acetilcolina em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (3  $\mu$ M), na presença e na ausência de calmidazólio (10  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida de cinco experimentos (n=5). \*\*\*P<0,001.

#### **4.7 Avaliação do aumento intracelular de cálcio em células endoteliais em estímulo ao mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol.**

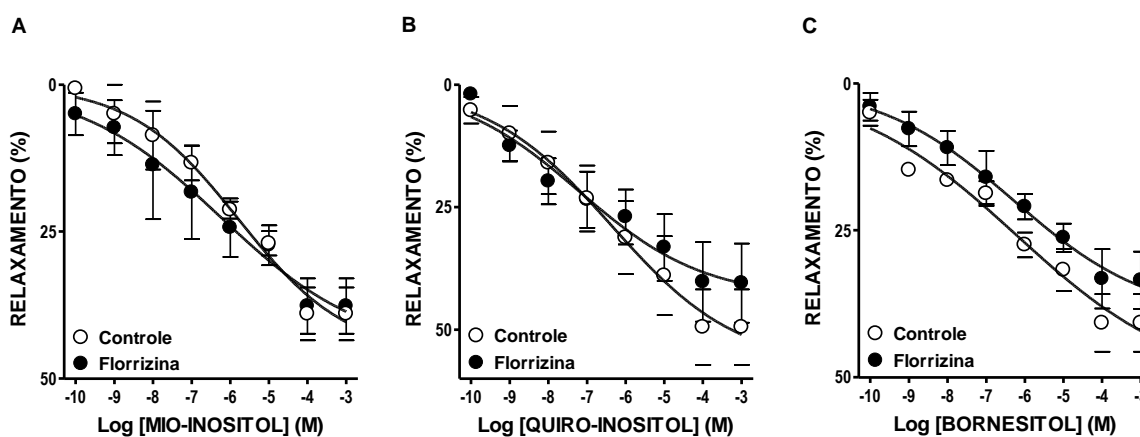
Uma avaliação direta da mobilização de cálcio em células endoteliais induzida pelos inositóis foi realizada utilizando a técnica de microscopia confocal, usando o Fluo-4AM como sonda fluorescente. A variação de fluorescência antes e após o estímulo com os inositóis apresentou um aumento de aproximadamente de 20%, 35% e 25% em estímulo ao mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol (Figura 18) respectivamente. O efeito dos inositóis foram comparáveis aos observados com acetilcolina (Figura 18).



**Figura 18.** Determinação do aumento da concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em células endoteliais utilizando a sonda intracelular fluorescente para  $Ca^{2+}$  Fluo-4AM. Os dados são expressos como a variação da intensidade de fluorescência ( $\Delta F/F_0$ , %) em função do tempo pós-estímulo com os inositóis. Traçados representativos do aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pelo mio-inositol (A), quiro-inositol (B) e bornesitol (C). O histograma (D) representa a área sob à curva (AUC) referente a relação entre o aumento da intensidade de fluorescência e o tempo na presença dos inositóis, em células endoteliais de aorta de rato. Cada barra no painel D representa a média  $\pm$  EPM obtida de 5 experimentos (n = 5).

#### 4.8 Avaliação da participação de transportadores de inosítois no mecanismo de ação vasodilatadora de inosítois.

O transporte de inosítois em células endoteliais é dependente da ativação do simporte glicose-sódio, que é completamente inibido pela florzizina (Hager *et al.*, 1995). Nos experimentos que buscaram investigar o envolvimento de co-transportadores de inosítois nos efeitos vasculares do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol, a florzizina (300  $\mu\text{M}$ ), não modificou o efeito vasodilatador dos inosítois em aorta de rato com endotélio funcional (Figura 19).



**Figura 19.** Efeito relaxante induzido pelo mio-inositol (A), quiro-inositol (B) e bornesitol (C) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraindidos com fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ) na presença e na ausência de Florzizina (300  $\mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida de cinco experimentos diferentes (n=5).

# ***Discussão***



## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho os efeitos vasodilatadores e respectivos mecanismos de ação foram avaliados para o mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol. Verificamos que estes inositóis apresentam atividade vasodilatadora, dependente da presença de endotélio funcional e da produção de NO, via a ativação da eNOS por um mecanismo dependente da formação do complexo  $Ca^{2+}/CaM$ .

O endotélio vascular desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase vascular e do tônus vascular através da produção e secreção de mediadores vasoconstritores e vasodilatadores (Furchgott & Zawadzki, 1980). A perda do equilíbrio entre a liberação destes mediadores endoteliais, resulta em uma menor resposta a agentes vasodilatadores e/ou uma maior resposta contrátil culminando em uma disfunção endotelial (Norata *et al.*, 2009). No presente estudo foi avaliado a participação do endotélio no efeito vasodilatador induzido pelos inositóis. Os nossos experimentos realizados em anéis de aorta isolada de rato (vaso de condutância) demonstraram que o mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol induzem uma resposta vasodilatadora endotélio dependente, já que a remoção do endotélio vascular aboliu o efeito relaxante destes inositóis. Estes dados sugerem que o mecanismo de ação do efeito vasodilatador dos inositóis depende da produção de EDRFs.

A literatura demonstra claramente que o NO é o principal EDRF em artérias de condutância (Pohl *et al.*, 2000), sendo um dos mediadores vasoprotetores mais importantes secretados pelo endotélio. Ele é sintetizado de maneira contínua pelas células endoteliais através da enzima NOS. Esta enzima catalisa a produção

de NO a partir do aminoácido L-arginina. O relaxamento da musculatura lisa adjacente resulta da ativação da guanilil ciclase solúvel pelo NO (Bian & Dourssout, 2008). A liberação do NO, e a sua consequente ação, pode ser estimulada por diversas substâncias, endógenas ou não, que agem em receptores localizados na membrana das células endoteliais. São exemplos, a acetilcolina (Furchgott, 1983), a bradicinina (Cherry *et al.*, 1982), a histamina (Van de Voorde & Leusen, 1983), a serotonina (Cohen *et al.*, 1983) e ainda a substância P e o ATP (Griffith *et al.*, 1984). No presente trabalho, a incubação prévia com L-NAME inibiu significativamente o relaxamento induzido pelo mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol. Portanto, estes resultados sugerem que estes inositóis ativam a NOS e induzem a formação de NO endotelial em aorta de rato.

Um estudo prévio (Nascimento *et al.*, 2006) demonstrou que o quiro-inositol possui atividade sequestradora de ânions superóxido e potencializa o efeito vasodilatador da acetilcolina em aorta de ratos diabéticos. Este relato sugere que os inositóis apresentam atividade antioxidante, que poderia ser responsável pelo aumento da biodisponibilidade do NO e, conseqüentemente, pelo efeito vasodilatador destas substâncias. No entanto, demonstramos que os inositóis apresentam um efeito vasodilatador direto, que provavelmente, não ocorre simplesmente devido a um efeito antioxidante. Para reforçar esta hipótese, o presente trabalho demonstrou através de microscopia de fluorescência com a sonda DAF-FM diacetato, que o mio-inositol, o quiro-inositol e o bornesitol são capazes de aumentar a produção de NO em endotélio de aorta de rato. Este efeito foi dependente da presença do endotélio e inibido por um inibidor não-seletivo de

NOS. Portanto, estes resultados reforçam a hipótese de ação vasodilatadora direta dos inositóis através da ativação da formação de EDRF.

A fosforilação em resíduos de Ser1177 é um indicador bastante utilizado na literatura para demonstrar a ativação da eNOS (Fleming & Busse, 2003), enquanto que a fosforilação em resíduos de Thr495 indica inativação desta enzima (Dimmeler *et al.* 1999). Com o objetivo de reforçar a hipótese da ativação da eNOS pelos inositóis como mecanismo de seu efeito vasodilatador, demonstramos que o mio-inositol, o quiro-inositol e o bornesitol são capazes de aumentar o nível de fosforilação de Ser1177 da eNOS. Este aumento é compatível com a ativação da eNOS e com o aumento da produção de NO observada nos protocolos de fluorescência. No entanto, o mio-inositol e o quiro-inositol não foram capazes de reduzir o nível de fosforilação em Thr495, sugerindo a ausência da ativação de fosfatases responsáveis por este efeito. Contudo, o bornesitol apresentou uma redução significativa na fosforilação em Thr495, sugerindo que a presença de um grupo metila neste ciclitol pode permitir a ativação das fosfatases responsáveis pela desfosforilação deste sítio de inativação da eNOS. Tais resultados nos mostram claramente que o mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol podem modular a produção de NO endotelial através da estimulação da atividade da eNOS, principalmente através do aumento da fosforilação de Ser1177. Desta forma, mais uma vez demonstramos que o efeito dos inositóis sobre a via do NO vai além de um simples efeito antioxidante.

A isoforma eNOS é constitutivamente expressa nas células endoteliais, sendo a mais sensível às modificações da concentração intracelular do  $Ca^{2+}$  livre. Entretanto, a mesma pode ser ativada por certos estímulos que dispensam uma

concentração aumentada e sustentada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Busse & Mulsch, 1990; Fisslthaler *et al.*, 2000). A ativação da eNOS independente de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta na ativação da PI3K, Akt e PKA, as quais fosforilam a eNOS no resíduo Ser1177 e estimulam a sua atividade (Dimmeler *et al.*, 1999). Nos nossos experimentos de reatividade vascular que buscaram investigar o envolvimento da via PI3K/Akt nos efeitos vasculares do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol, a incubação prévia com inibidores seletivos de PI3K, não modificou o efeito vasodilatador destes inositóis. Portanto, a ativação da eNOS por um mecanismo independente de  $\text{Ca}^{2+}$  não está envolvida no efeito vasodilatador dos inositóis investigados.

Nas células endoteliais, a liberação do NO pode ocorrer em consequência do aumento da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$ , dependente ou não da ativação de receptores localizados na membrana das células endoteliais. Após o aumento da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre a associação deste íon com a CaM, formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, o qual é capaz de ativar a eNOS (Fleming *et al.*, 2001). A formação do NO e a vasodilatação ocasionada pela estimulação dessa via podem ser abolidas por substâncias antagonistas da CaM (Fleming & Busse, 1999). Além de ativar a eNOS, a CaM também pode modular outras enzimas intracelulares, como a CaMKII. Esta enzima também pode ativar a produção do NO através da adição de um fosfato na Ser1177 da eNOS, um sítio importante de ativação desta enzima (Fleming *et al.*, 2001). Uma vez descartada, em experimentos anteriores, a participação da via independente de cálcio, PI3K/Akt, na ativação da eNOS, o conjunto dos nossos resultados nos levaram a hipótese que o efeito vasodilatador destes inositóis envolve a ativação da eNOS pela via dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sendo assim, buscamos avaliar a via de ativação da eNOS

dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Verificamos que a inibição da CaM inibiu significativamente a resposta relaxante dos inositóis. Portanto, estes dados nos sugerem que o efeito vasodilatador do mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol envolve a via de ativação da eNOS dependente da ativação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . A ativação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  é melhor apoiada pelo aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido pelos inositóis no endotélio dos anéis de aorta.

De acordo com a literatura um dos mecanismos que as células utilizam para a manutenção da concentração intracelular de inositol é através do transporte de inositol do meio extracelular para o meio intracelular utilizando-se de carreadores específicos que é mediado pelo SMIT (Kwon et al.1992), e HMIT (Uldry et al. 2001), um mecanismo de transporte altamente sensível à florrizina (Hager *et al.*, 1995). No entanto, o inibidor de co-transportadores de inositóis não modificou o efeito vasodilatador dos inositóis. Estes resultados nos sugerem que o efeito vasodilatador dos inositóis, mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol não depende de seu transporte para o interior das células endoteliais em anéis de aorta de rato.

Neste estudo demonstramos a capacidade dos inositóis mio-inositol, quiro-inositol e bornesitol de estimularem a produção e liberação de NO em células endoteliais com conseqüente relaxamento do músculo liso vascular em vasos de condutância. O relaxamento vascular induzido pelos inositóis ocorreu nas mesmas concentrações nas quais estão presentes na circulação sistêmica humana, sugerindo uma nova função fisiológica para os inositóis no controle do tônus vascular, assim como, o potencial terapêutico para doenças cardiovasculares. A produção endógena de NO é um importante fator no controle do tônus e da

homeostase vascular e a sua produção insuficiente contribui para a disfunção endotelial, uma alteração vascular envolvida na iniciação e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como a hipertensão arterial e a aterosclerose (Mombouli & Vanhoutte, 1999; Luscher & Noll, 1994; Busse & Flemming, 1996; Russo *et al.*, 2002). Entre os medicamentos aprovados para o tratamento de doenças cardiovasculares em humanos existem poucas drogas disponíveis capazes de modular a produção endógena do NO. Assim, existe um grande interesse em compostos químicos que possam atuar na síntese e liberação de NO nos sistemas biológicos. Este fato revela a importância dos estudos que podem contribuir com substâncias que contenham esta propriedade, tendo os produtos naturais como uma importante fonte.

# **Conclusão**

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem concluir que o mio-inositol, o quiro-inositol e o bornesitol apresentam atividade vasodilatadora, dependente da presença de um endotélio funcional e da produção de NO, através de um mecanismo dependente do aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação do sistema  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  em células endoteliais. Este trabalho demonstra que os inositóis endógenos, mio-inositol e quiro-inositol podem ser moduladores fisiológicos do tônus vascular, e que inositóis derivados de plantas, como o bornesitol, podem ser investigados para fins terapêuticos.



## **Referências Bibliográficas**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, E. W., STEGEMAN, C. A., HEERINGA, P., HENNING, R. H. & VAN GOOR, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **J Pathol**, v.199, p.8-17, 2003.

ALDERTON, W. K., COOPER C. E., KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v.357, p.593-615, 2001.

ALMEIDA, M. V., SILVA, A. D., SOUZA, M. V. N., BENÍCIO, A. A. A. A cascata dos fosfoinositídeos. **Química Nova**, v.26, p.105-111, 2003.

ANDREW, P. J. & MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, v.43, p.521-31, 1999.

ASPLIN, I., GALASKO, G., LARNER, J. Chiro-inositol deficiency and insulin resistance: A comparison of the chiro-inositol – and the myo-inositol-containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.90, p.5924–5928, 1993.

AYAJIKI, K., M. KINDERMANN, HECKER, M., FLEMING, I., BUSSE, R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxideproduction in native endothelial cells. **Circ Res**, v.78, p.750-8, 1996.

BAHIA, L.; AGUIAR, I. G. K. ; VILLELA, N. R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. Endotélio na Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50/2, p.291-303, 2006.

BAILLARGEON J. P. Use of insulin sensitizers in polycystic ovarian syndrome. **Curr Opin Investig Drugs**, v.6, p.1012-22, 2005.

BARAK, Y., LEVINE, J., GLASMAN, A. Inositol treatment of Alzheimer's disease: a double blind, cross-over placebo controlled trial. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.20, p.729-735, 1996.

BATES S. H.; JONES R. B.; BAILEY C. J. Insulin-like effect of pinitol. **Br J Pharmacol**, v.130, p.1944-1948, 2000.

BEEMSTER, P., GROENEN, P., STEEGERS-THEUNISSEN, R. Involvement of inositol in reproduction. **Nutr Rev**, v.60, p.80-87, 2002.

BENJAMIN, J., LEVINE, J., FUX, M. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of inositol treatment for panic. **Am J Psychiatry**, v.15, p.1084-1086, 1995.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**. v.361, p.315 – 325, 1993.

BIAN, K. & M. DOURSOUT F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **J Clin Hypertens** (Greenwich), v.10, n.4, p.304-10, 2008.

BIECKER, E., NEEF, M., SAGESSER, H., SHAW, S., KOSHY. A. & REICHEN, J. Nitric oxide synthase 1 is partly compensating for nitric oxide synthase 3 deficiency in nitric oxide synthase 3 knock-out mice and is elevated in murine and human cirrhosis. **Liver Int**, v.24, p.345-353, 2004.

BIZZARRI, M. & CARLOMAGNO, G. Inositol: history of an effective therapy for polycystic ovary syndrome. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.18, p.1896-1903, 2014.

BOHN, L., MEYER, A. S., RASMUSSEN, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **J Zhejiang Univ Sci**, v.9, (3): p.65-91, 2008.

BRANDAO, A. F. & PINGE, M. C. M. Nitric oxide alteration in the cardiovascular function by exercise training. **Semina. Ciências Biológicas e da Saúde**, v.28, n.1, p. 53-68, 2007.

BREDT, D. S., HWANG, P. M., GLATT, C. E., LOWENSTEIN, C., REED, R. R., SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v.35, p.714-718, 1991.

BROPHY, C. M., KNOEPP, L., XIN, J. & POLLOCK, J. S. Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.278, p.H991-997, 2000.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, p.813-820, 2001.

BUSSE, R. & FLEMING I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. **J Vasc Res**, v.33, p.181-94, 1996.

BUSSE, R. & MULSCH, A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS**, v.265, p.133-6, 1990.

CAPETTINI, L. S. A., CORTES, S. F., GOMES, M. A., SILVA, G. A. B., PESQUERO, 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. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.295, p.H2503–H2511, 2008.

CAPETTINI, L. S. A., CORTES, S. F. & LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **Eur J Pharmacol**, v.643, p.260–266, 2010.

CHAU, J. F. L., LEE, M. K., LAW, J. W. S., CHUNG, S. K., CHUNG, S. S. M. Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves. **FASEB**, v.19, p.1887-1889, 2005.

CHERRY, P. D., FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V., JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc Natl Acad Sci** , v.79, p.2106-2110, 1982.

CLEMENTS R. S. Jr & DIETHELM A. G. The metabolism of myo-inositol by the human kidney. **J Laboratory Clin Med**, v.93, p.210-219, 1979.

COHEN, R. A., SHEPHERD, J. T., VANHOUTTE, P. M. 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. **Am J Physiol**, v.245, p.H1077-1080, 1983.

COLODNY, L & HOFFMAN, L.R. Inositol – Clinical applications for exogenous use. **Alter Med Rev**. v.3, p.432–447, 1998.

CORNWELL, T. L., PRYZWANSKY, K. B., WYATT, T. A. & LINCOLN, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v.40, p.923-31, 1991.

CORRADO, F., D'ANNA, R., DI VIESTE, G., GIORDANO, D., PINTAUDI, B., SANTAMARIA, A., DI BENEDETTO, A. The effects of myo-inositol supplementation on insulin resistance in patients with gestational diabetes. **Diabet Med**, v.28, p.972-975, 2011.

COSENTINO, F.; LUSCHER, T. F. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. **Cardiovasc Res**, v.43, p.274-278, 1999.

COSTANTINO, D., MINOZZI, G., MINOZZI, E., GUARALDI, C. Metabolic and hormonal effects of myo-inositol in women with polycystic ovary syndrome: a Double-blind trial. **Eur Rev Pharmacol Sci**, v.13, p.105-110, 2009.

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

CURTIS, M. J. & PABLA, R. Nitric oxide supplementation or synthesis block--which is the better approach to treatment of heart disease? **Trends Pharmacol Sci**, v.18, p.239-44, 1997.

DAI, Z., CHUNG, S. K., MIAO, D., LAU, K.S., CHAN, A. W. H., KUNG, A. W. C. Sodium/myo-inositol cotransporter 1 and myo-inositol are essential for osteogenesis and bone formation. **JBMR**, v.26, p.582-590, 2011.

DAVIGNON, J. & GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circ**, v.109, p.III27-32, 2004.

DIAS, R. G; NEGRAO, C. E; KRIEGER, M. H. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. **Arq Bras Cardiol**, v.96 (1): p. 68-75, 2011.

DONÀ, G., SABBADIN, C., FIORE, C., BRAGADIN, M., GIORGINO, F. L., RAGAZZI, E., CLARI, G., BORDIN, L., ARMANINI, D. Inositol administration reduces oxidative stress in erythrocytes of patients with polycystic ovary syndrome. **Eur J Endocrinol**, v.166, p.703-710, 2012.

DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSALTHALER, B., HERMANN, C. BUSSE, R., ZEIHNER, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v.399, p.601-5, 1999.

DUCHEK, J., ADAMS, D. R., HUDLICKY, T. Chemoenzymatic Synthesis of Inositol, Conduritols, and Cyclitol Analogues. **Chem. Rev.**, v.111, p.4223-4258, 2011.

EISENBERG, F. Jr., BOLDEN, A. H. Biosynthesis of inositol in rat testis homogenate. **Biochem Biophys Res Commun**, v.12, p.72-77, 1963.

ENDRINGER, D. C., PEZZUTO, J. M., SOARES, C. M., BRAGA, F. C. L-(+)-Bornesitol. **Acta Cryst. E**, v.63, p.o1067–o1068, 2007.

FERREIRA, H. C., SERRA, C. P., LEMOS, V. S., BRAGA, F. C., CORTES, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **J Ethnopharmacol**, v.109, p.161–164, 2007a.

FERREIRA, H. C., SERRA, C. P., ENDRINGER, D. C., LEMOS, V. S., BRAGA, F. C., CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomed**, v.14, p.473-478, 2007b.

FISHER, A. B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A. I.; NEREM, R. N. Endothelial cellular response to altered shear stress. **Am J Physiol**, v.281, p.L529-L533, 2001.

FISHER, S. K., NOVAK, J. E., AGRANOFF, B. W. Inositol and higher inositol fosfates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. **J Neurochem**, v.82, p.736-54, 2002.

FISHER, S. K., HEACOCK, A. M., AGRANOFF, B. W. Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: au update. **J Neurochem**, v.58, p.18-38, 1992.

FISLTHALER, B., DIMMELER, S., HERMANN, C., BUSSE, R., FLEMING, I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. **Acta Physiol Scand**, v.168, p.81-8, 2000.

FLEMING, I., BAUERSACHS, J., FISSALTHALER, B. & BUSSE, R. Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. **Circ Res**, v.82, p.686-95, 1998.

FLEMING, I. & BUSSE R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.284, p.R1-12, 2003.

FLEMING, I. & BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res**, v.43, p.532-41, 1999.

FLEMING, I., FISSALTHALER B., DIMMELER, S., KEMP, B. E., BUSSE, R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ Res**, v.88, p.E68-75, 2001.

FORSTERMANN, U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. **Biol Chem**, v.387 (12): p.1521-33, 2006.

FROLICH, J. C. & FORSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res**, v.19, p.211-5, 1989.

FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p.373-6, 1980.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res**, v.53, p.557-73, 1983.



FURUKAWA, K., OHSHIMA, N., TAWADA-IWATA, Y. & SHIGEKAWA, M. Cyclic GMP stimulates Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. **J Biol Chem**, v.266, p.12337-41, 1991.

GARCIA-CARDENA, G., FAN, R., STERN, D. F., LIU, J., SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. **J Biol Chem**, v.271, p.27237-40, 1996.

GARG, U. C. & HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest**, v.83, p.1774-1777, 1989.

GENAZZANI, A. D., LANZONI, C., RICCHIERI, F., JASONNI, V. M. Myo-inositol administration positively affects hyperinsulinemia and hormonal parameters in overweight patients with polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol**, v.24, p.139-144, 2008.

GERLI, S., PAPALEO, E., FERRARI, G. C., DI, RENZO. Randomized, Double blind placebo-controlled trial: effects of myo-inositol on ovarian function and metabolic factors in women with PCOS. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.11, p.347-354, 2007.

GHOSH, S., GACHHUI, R., CROOKS, C., WU, C., LISANTI, M. P. & STUEHR, D.J. Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric oxide synthase. Consequences for catalysis. **J Biol Chem**, v.273, p.22267-71, 1998.

GRANDI, T. M. S., LIMA-FILHO, F. M., FERREIRA, S. M. Levantamento das plantas medicinais de Grão Mogol. **Oréades**, v.8 p.116–125. 1981/1982.

GRANDI, T. M. S., TRINDADE, J. A., PINTO, M. J. F., FERREIRA, L. L., CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras**, v. 3, p.185-224, 1989.

GRASES, F. & COSTA BAUZÁ, A. Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. **Anticancer Res**, v.19, p.3717-22, 1999.

GREEN, J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **J Physiol**, v.561, n.1; p.1-25, 2004.

GRIFFITH, O. W. & STUEHR D. J. Nitric Oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. **Annu Rev Physiol**, v.57, p.707-734, 1995.

GRIFFITH, T. M., EDWARDS, D. H., LEWIS, M. J., NEWBY, A. C., HENDERSON, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**, v.308, p.645-647, 1984.

HAGER, K., HAZAMA, A., KWON, H. M., LOO, D. D. F., HANDLER, J. S., WRIGHT, E. M. Kinetics and specificity of the renal Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter expressed in xenopus oocytes. **J Membrane Biol**, v.143, p.103-113, 1995.

HARVEY, B. H., BRINK, C. B., SEEDAT, S., STEIN, D. J. Defining the neuromolecular action of myo-inositol application to obsessive-compulsive disorder. **Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psych**, v.26, p.21-32, 2002.

HAUSER, G. & FINELLI, V. N. The biosynthesis of free and phosphatide myo-inositol from glucose in mammalian tissues. **J Biol Chem**, v.238, p.3224-3228, 1963.

HECKER, M.; MULSCH, A.; BASSENGE, E.; FORSTERMANN, U.; BUSSE, R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase in endothelial cells: physiological implications. **Biochem J**, v.299. p.247-252, 1994.

HIRSCHMANN, G. S. & ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 29, p.159–172, 1990.

HOLUB B. J. Metabolism and function of myo- inositol and inositol phospholipids. **Annu Rev Nutr**, v.6, p.563-597, 1986.

IGNARRO, L. J., BYRNS, R. E., BUGA, G. M., WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ Res**, v.61, p.866-79, 1987.

JACKSON, P. S. & STRANGE, K. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. **Am J Physiol**, v.265, p.C1489-C1500, 1993.

JACKSON P.S., MORRISON R., STRANGE K. The volume –sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. **Am J Physiol**, v.267, p.C1203-C1209, 1994.

JARIWALLA, R. J. Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. **Anticancer Res**, v.19, p.3699-702, 1999.

JOHN, S. & SCHMIEDER, R. E. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. **J Hypertens**, v.18, p.363-74, 2000.

JONES, D. R. & VARELA-NIETO, I. Diabetes and the role of inositol-containing lipids in insulin signaling. **Mol Med**, v.5, p.505-514, 1999.

KEDZIERSKI, R. M. & YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p.851-76, 2001.

KIECHELE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol**, v.100, p.567-75, 1993.

KIM F., GALLIS B., CORSON, M. A. TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.280, p.C1057-65, 2001.

KINGWELL B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB J**, v.14, p.1685-1696, 2000.

KLATT, P., PFEIFFER, S., LIST, B. M., LEHNER, D., GLATTER, O., BACHINGER, H. P., WERNER, E.R., SCHMIDT, K. & MAYER, B. Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. **J Biol Chem**, v.271, p.7336-42, 1996.

KWON, H. M., YAMAUCHI, A., UCHIDA, S. Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. **J Biol Chem**, v.267, p.6297-6301, 1992.

LANG, F., BUSCH, G. L., RITTER, M. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiol. Rev**, v.78, p.247-306, 1998.

LANTINHERMOSO, R. L., ROSENFELD, C. R., YOHANNA I. S., GERMAN Z., SHAUL P. W. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. **Am J Physiol**, v.273, p.L119-126, 1997.

LARNER, J., HUANG, L. C., TANG, G., SUZUKI, S., SCHWARTZ, C. F., ROMERO, G., ROULIDIS, Z., ZELLER, K., SHEN, T. Y., OSWALD, A. S. Insulin

mediators: structure and formation. **Cold Spring Harb Quant Biol.** v.53, p.965-971, 1988.

LEE, J. H., LEE, A. S., CHOI, H. Dietary administration of inositol and/or inositol-6-phosphate prevents chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. **Asian Pacific J Cancer Prev**, v.6. p.41-47, 2005.

LEE, M. W & SEVERSON, D. L. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. **Am J Physiol**, v.267, p.C659 – C678, 1994.

LEFER, D. J., JONES, S. P., GIROD, W. G, BAINES A, GRISHAM, M. B, COCKRELL, A. S, HUANG, P. L & SCALIA, R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. **Am J Physiol**, v.276, p.H1943-1950, 1999.

LEMONS, V., SILVA, D., WALTHER, T., ALENINA, N., BADER, M. & SANTOS, R. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7)mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.46, p.274-279, 2005.

LEVINE, J., RING, A., BARAK, Y. Inositol may worsen attention deficient disorder with hyperactivity. **Hum Psychopharmacol**, v.10, p.481-484, 1995

LIMA, J. C. S. & MARTINS, D. T. Screening farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente com antiinflamatória. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 14, Florianópolis. Resumos Florianópolis: Universidade Federal do Paraná. p.891, 1996.

LINCOLN, T. M., KOMALAVILAS, P. & CORNWELL, T.L. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Hypertens**, v.23, p.1141-7, 1994.

LIU, V. W & HUANG, P. L. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. **Cardiovasc Res**, v.77, p.19-29, 2008.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J, FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.265-275, 1951.

LUCKHOFF, A. U., POHL MÜLSCH, A., BUSSE, R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v.95, p.189-96, 1988.

LUSCHER, T. F. & NOLL, G. Endothelium dysfunction in the coronary circulation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.24, p.S16-26, 1994.

MACHICAO, F., MUSHACK, J., SEFFER, E., ERMEL, B., HARING, H. U. Mannose, glucosamine and inositol monophosphate inhibit the effects of insulin on lipogenesis further evidence for a role for inositol phosphate-oligosaccharides in insulin action. **Biochem J**, v.266, p.909-916, 1990.

MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A.; RUNGE, M. S. Oxidative stress and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, p.29-38, 2005.

MAEDA, S.; TANABE, T.; OTSUKI, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; MIYAUCHI, T.; KUNO, S.; AJSKA, R.; MATSUDA, M. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. **Hipertens Res**. v.27, n.12: p.947-953, 2004.

MALEK, A. M., IZUMO, S. & ALPER, S.L. Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. **Neurosurgery**, v.45, p.334-44, 1999.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cells**, v.78, p.927-30, 1994.

MASTERS, B. S., MCMILLAN, K., NISHIMURA, J., MARTASEK, P., ROMAN, L. J., SHETA, E., GROSS, S. S. & SALERNO, J. Understanding the structural aspects of neuronal nitric oxide synthase (NOS) using microdissection by molecular cloning techniques: molecular dissection of neuronal NOS. **Adv Exp Med Biol**, v.387, p.163-169, 1996a.

MASTERS, B. S., MCMILLAN, K., SHETA, E. A., NISHIMURA, J. S., ROMAN, L. J. & MARTASEK, P. Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-ligated heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal. **FASEB J**, v.10, p.552-558, 1996b.

MERY, P. F., LOHMANN, S. M., WALTER, U. & FISCHMEISTER, R. Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci**, v.88, p.1197-201, 1991.

MICHEL, T., LI, G.K. & BUSCONI, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci**, v.90, p.6252-6, 1993.

MICHELL, R. H. Inositol derivatives: evolution and functions. **Nature**, v.9 p.151-161, 2008.

MICHIELS, C. Endothelial Cell Functions. **J. Cell. Physiol**, v.196, p.430-443, 2003.

MOMBOULI, J. V. & VANHOUTTE P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**, v.31, p.61-74, 1999.

MONCADA, S. Nitric Oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **An New Yorkn Acad Sci**, v.811, p.60-7, 1997.

MONCADA, S., HERMAN, A. G., HIGGS, E. A., VANE, J. R. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. **Thromb. Res**, v.11, p.323–344, 1977.

MONCADA, S., HIGGS, A. & FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacol Rev**, v.49, p.137-42, 1997.

MONCADA, S., PALMER R. M., HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol**, v.38, p.1709-15, 1989.

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

MOUNT, P. F.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **J Mol Cell Cardiol**, v.42, p.271-279, 2007.

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. **PNAS**, v.103, p.218-223, 2006.



NAVA, E. & LUSCHER, T. F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **J Hypertens**, v.13 (suppl.2) p.S39-S48, 1995.

NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J. F.; STANDEN, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am J Physiol**, v.259, p.C3-18, 1990.

NORATA, G. D., RASELLI, S., GRIGORE, L., GARLASCHELLI, K., VIANELLO, D., BERTOCCO, S., ZAMBON, A. & CATAPANO, A. L. Small dense LDL and VLDL predict common carotid artery IMT and elicit an inflammatory response in peripheral blood mononuclear and endothelial cells. **Atheroscler**, v.206, p.556-562, 2009.

OHANIAN, V., OHANIAN, J., SHAW, L., SCARTH, S., PARKER, P. J., HEAGERTY, A. M. Identification of protein kinase C isoforms in rat mesenteric small arteries and their possible role in agonist-induced contraction. **Circ Res**, v.78, p.806–812, 1996.

ORTMEYER, H. K. Dietary myo-inositol results in lower urine glucose and in lower postprandial plasma glucose in obese insulin resistant rhesus monkeys. **Obes Res**, v.4, p.569-575, 1996.

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

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v.57, p.313-70, 1977.

PEPINE, C. J. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. **Am J Med**. 122 (5 Suppl): S10–5, 2009.

POHL, U. D. E., WIT, C., & GLOE, T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. **Acta Physiol Scand**, v.168, p.505-510, 2000.

PRESTA, A., LIU, J., SESSA, W. C. & STUEHR, D. J. Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity. **Nitric Oxide**, v.1, p.74-87, 1997.

RAMAN, C. S., LI, H., MARTASEK, P., KRAL, V., MASTERS, B. S. & POULOS, T. L. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. **Cell**, v.95, p.939-50, 1998.

RODRIGUES, V. E. G. & CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Cienc. Agrotec**, v.25, p.102–123, 2001.

RUSSO, G., LEOPOLD J. A., LOSCALZO, J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Vascul Pharmacol**, v.38, p.259-69, 2002.

SAHA, L., KAUR, S., SAHA, P. K. Pharmacotherapy of polycystic ovary syndrome – an update. **Fund Clin Pharmacol**, v.26, p.54-62, 2012.

SANTAMARIA, A., GIORDANO, D., CORRADO, F., PINTAUDI, B., INTERDONATO, M. L., VIESTE, G. D., BENEDETTO, A. D., D'ANNA, R. One-year effects of myo-inositol supplementation in postmenopausal women with metabolic syndrome. **Climacteric**, v.15, p.490-495, 2012.

SILVA, A. S. & ZANESCO, A. Physical exercise,  $\beta$ -adrenergic receptors, and vascular response. **J Vasc Bras**, v.9 (2): p.47-56, 2010.

SOMLYO, A. P & SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v.372, p.231-236, 1994.

STEVENS-TRUSS, R., BECKINGHAM, K., MARLETTA, M. A. Calcium binding sites of calmodulin and electron transfer by neuronal nitric oxide synthase. **Biochem**, v.36, p.12337-12345, 1997.

STRANGE, K. Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. **J. Am. Soc. Nephrol**; v.3, 12-27, 1992.

TAMBASCIA, R. C., FONSECA, P. M., CORAT, P. D., MORENO, H. JR., SAAD, M. J. & FRANCHINI, K. G. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. **Hypertens**, v.37, p.1423-1428, 2001.

TARE, M., PARKINGTON, H. C., COLEMAN, H. A., NEILD, T. O. & DUSTING, G. J. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. **Nature**, v.346, p.69-71, 1990.

TARNOW, P., CASSUTO, J., JONSSON, A. Postoperative analgesia by D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate in patients undergoing cholecystectomy. **Anesth Analg**, v.86, p.107-110, 1998.

ULDRY, M., IBBERSON M., HORISBERGER, J. D. Identification of a Mammalian H (+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. **EMBO J**, v.20, p.4467-4477, 2001.

VAN DE VOORDE, J. & LEUSEN, I. Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. **Eur J Pharmacol**, v.87, p.113-120, 1983.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. **Circ J**, v.67, p.572-5, 2003.

VILLENEUVE, M. C., OSTLUND, R. E., BAILLARGEON, J. P. Hyperinsulinemia is closely related to low urinary clearance of D-chiro-inositol in men with a wide range of insulin sensitivity. **Metab Clin Exp**, v.58, p.62-68, 2009.

VUCENIK, I. & SHAMSUDDIN, A.M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: From laboratory to clinic. **J. Nutr**, v.133, p.3778S-3784S, 2003.

WALSH, M. P. Regulation of the smooth muscle tone. **Can J Physiol Pharmacol**, v.72, p.919–936, 1993.

WEEB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**, v.27 (1-4): p.201-6, 2003.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, p.1430-42, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on Hypertension. Geneva, **WHO, 2013**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva, **WHO, 2011**.

WYNNE, B. M.; CHIAO, C. W.; WEBB, R. C. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. **J Am Soc Hypertens**, v.3, p.84-95, 2009.

WYMANN, M. P. & SCHNEITER, R. Lipid signaling in disease. **Nature Rev. Mol Cell Biol**. v.9, p.162–176, 2008.

YOREK M. A., WIESE T. J., DAVIDSON E. P. Reduced motor nerve conduction velocity and Na(+)-K(+)-ATPase activity in rats maintained on D-fructose diet. Reversal by myo-inositol supplementation. **Diabet**, v.42, p.1401-1406, 1993.

ZANESCO, A. & ANTUNES, E. Células endoteliais. In: Carvalho H, Collares-Buzato C, editores. Células. Barueri: Manole: p.184-91, 2005.

ZANESCO, A. & ANTUNES, E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. **Pharmacol Ther**, v.114, p.307-17, 2007.

ZAGO, A. S. & ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arq Bras Cardiol**, v.87, p.e264-e270, 2006.

ZHU, X., & EICHBERG, J. A myo-inositol pool utilized for phosphatidylinositol synthesis is depleted in sciatic nerve from rats with streptozotocin-induced diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.87, p.9818-9822, 1990.

ZIYADEH, F. N., SIMMONS, E. R., SNIPES, E. R., GOLDFARB, S. Effect of myo-inositol on cell proliferation and collagen transcription and secretion in proximal tubule cells cultured in elevated glucose. **J Am Soc Nephrol**, v.1, p.1220-1229, 1991.