



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL DE RATOS DIABÉTICOS**

JULIANO RIBEIRO DA SILVA

RECIFE, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL DE RATOS DIABÉTICOS**

JULIANO RIBEIRO DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
Co-orientadora: Profa. Dra. Alice Valença de Araújo

RECIFE, 2014

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4-1895

S586e Silva, Juliano Ribeiro da.
Efeito protetor do ácido gálico sobre a disfunção endotelial de ratos diabéticos / Juliano Ribeiro da Silva. – 2014.
98 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2014.
Inclui referências.

1. Ácido gálico. 2. Diabetes mellitus. 3. Radicais livres. 4. Óxido nítrico.
I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017-277)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 10 de Junho de 2014.

Dissertação de Mestrado defendida e APROVADA, por decisão unânime, em 10 de Junho de 2014 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Deptº de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva (Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Sílvia Romero de Barros Marques

Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretora do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Vice-chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalcí Jose Brondani

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

DEDICATÓRIA

Ao meu pai José Ribeiro da Silva (*in memoriam*), com quem convivi pouco tempo, mas o suficiente para aprender que o ser humano é o que há de mais precioso nesse mundo, que o amor ao próximo e a solidariedade são virtudes necessárias para a construção de uma sociedade mais humana.

A minha mãe Maria Nunes da Silva, pelo amor incondicional, e mesmo com pouco acesso aos instrumentos de aprendizagens, se comporta ao longo de sua vida como uma grande formadora de homens e mulheres honradas, e que sem limites trabalhou para garantir minha formação acadêmica.

A minha esposa Izauriana Borges Lima, pela contribuição e incentivo diário para a conclusão deste trabalho, pelo estímulo à continuação de minha formação acadêmica, de quem me orgulho pelo exemplo de companheira, de mulher emancipada, de sonhadora, de perseverança, de responsabilidade e competência, pelo amor, compreensão e apoio sem limites.

As minhas irmãs Josefa Nunes de Arruda e Severina Elizabete de Arruda e aos meus irmãos João Domingos de Arruda, Manoel Domingos de Arruda Filho e José Marcelo de Arruda, pelo exemplo de companheirismo, pelas broncas e conselhos, por terem contribuído na minha formação como exemplos e por todo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter concedido a realização deste curso.

Ao meu orientador Prof^o Almir Gonçalves Wanderley, pela oportunidade concedida, por todo suporte técnico e pedagógico necessário para o desenvolvimento da pesquisa, pelo exemplo de dedicação com o serviço público, pela honra de ser orientado por ele e pela confiança.

A minha co-orientadora Prof^a Alice Valença Araújo, por toda paciência e orientação, pelo companheirismo, pelo exemplo de compromisso, pontualidade, determinação e competência, por permitir que nossa relação não se restringisse ao campo profissional, construindo assim em nosso laboratório um ambiente de grandes e fortes amizades.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela preciosa concessão de bolsa de Pós-Graduação.

Aos professores Prof^o Dr^o João Henrique da Costa Silva e a Prof^a Dr^a Simone Sette Lafayette, pela orientação e apoio.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clinica de Produtos Bioativos: Germana Rocha, Samara Brito, Rafaella Nóbrega, Jamilka Silva, Eliadna Lemos, Tadeu Peixoto Sobrinho, Anita Oliveira Brito Pereira, Eduardo Gonçalves, Carlos Fernando Brasileiro, Cristiano Ribeiro de Lima, Héllida Maranhão, Paulo Nunes, Cybelle Linard, Adriana Sereniki Pastre, Rejane de Souza, pelo auxílio indispensável para a realização deste trabalho e pela amizade e companheirismo no dia-a-dia.

Aos amigos dos demais laboratórios do CCS e do biotério: Prof^a Dr^a Ana Maria Cabral, Dr^a Dijanah Cota Machado, Sr^o Fredson, Eduardo, Dr^a Cláudia Paiva, Edson, Janílson José da Silva Júnior, Juliana Pereira de Aguiar, Prof^o Cláudio Gabriel Rodrigues e Prof^o Dr^o Leucio Duarte.

Aos amigos/irmãos Leonardo Bulhões Xavier, Felipe Vasco Siqueira, Danilo José Aires e Leandro Brito, por ter me dado o privilégio de conhecer o que é ter verdadeiros amigos e pelo apoio nos momentos difíceis.

Enfim, a todos que tiveram participação direta ou indireta para a realização deste trabalho.

"Muitos dirão que sou aventureiro, e sou mesmo, só que de um tipo diferente, daqueles que entregam a própria pele para demonstrar suas verdades."

Che Guevara

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ADA	Associação Americana de Diabetes
CAT	Catalase
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DE	Disfunção Endotelial
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EO	Estresse Oxidativo
ER	Espécies Reativas
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fen	Fenilefrina
FGFs	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
HbA1C	Glicohemoglobina
IDF	Federação Internacional de Diabetes
LADA	Latent Autoimmune Diabetes of the Adult
MS	Ministério da Saúde
NO	Óxido Nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pD ₂	-log EC ₅₀
RL	Radicais Livres
SOD	Superóxido Dismutase
TGF-β	Fatores de Crescimento e transformação

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura do ácido gálico (ácido 3,4,5- trihidroxibenzóico).	47
FIGURA 2. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre os níveis de glicose de ratos diabéticos.	56
FIGURA 3. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre a massa de ratos diabéticos.	57
FIGURA 4. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre a ingestão de água de ratos diabéticos.	58
FIGURA 5. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre o consumo de ração de ratos diabéticos.	59
FIGURA 6. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre a contração induzida pela fenilefrina (Fen) em anéis de aorta de ratos diabéticos.	60
FIGURA 7. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de ratos diabéticos.	61
FIGURA 8. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre o relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de ratos diabéticos.	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Diabetes mellitus (DM)	18
2.2. Manejo farmacológico	21
2.3. Disfunção endotelial (DE)	22
2.4. Endotélio vascular	25
2.5. Óxido nítrico (NO)	27
2.6. Estresse oxidativo	29
2.7. Radicais livres (RL)	30
2.8. Antioxidantes	33
2.8.1. Antioxidantes enzimáticos	35
2.8.2. Antioxidantes não enzimáticos	40
2.9. Polifenóis	42
3. OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo Geral	49
3.2. Objetivos Específicos	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. Animais	51
4.2. Indução ao Diabetes mellitus (DM)	51
4.3. Animais diabéticos	51
4.3.1. Tratamento	51
4.3.2. Efeito da administração oral do ácido gálico sobre a massa corporal, o consumo de água e ração e a glicemia de jejum.	52
4.3.3. Estudos in vitro: Isolamento da artéria aorta	52
4.3.2.1. Efeito do ácido gálico sobre a contração/relaxamento em anéis de aorta torácica.	53
4.4. Drogas e Reagentes	53
4.4. Análise estatística	54
5. RESULTADOS	55
5.1. O efeito da administração oral do ácido gálico sobre a glicemia de jejum	56
5.2. O efeito da administração oral do ácido gálico sobre o ganho de massa corporal	57

5.3. Efeito da administração oral do ácido gálico sobre a ingestão de água	57
5.4. Efeito da administração oral do ácido gálico sobre o consumo de ração	58
5.5. Efeito da administração oral do ácido gálico na contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta torácica	59
5.6. Efeito da administração oral do ácido gálico no relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta torácica	60
5.7. Efeito da administração oral do ácido gálico no relaxamento produzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica	61
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	73

RESUMO

O *Diabetes mellitus* (DM) é um relevante problema de saúde pública devido a sua alta prevalência, morbidade e mortalidade. É caracterizado por hiperglicemia crônica, ocasionada pela ausência ou incapacidade da insulina de exercer de maneira adequada seus efeitos nos tecidos-alvo. Complicações vasculares, como a disfunção endotelial vascular, podem ser resultado do inadequado controle da glicemia e/ou reflexo de um estresse oxidativo excessivo. Uma maior concentração de radicais livres (RL), como as espécies reativas de oxigênio (EROS), diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), que é o principal agente vasodilatador endógeno que regula o tônus vascular, caracterizando a disfunção endotelial. O tratamento farmacológico do DM envolve o uso de insulina e/ou hipoglicemiantes orais, mas dados etnofarmacológicos e experimentais mostram que extratos e compostos isolados de diversas espécies de plantas tem sido usados para tratar os sintomas desta doença. Uma hipótese é a de que as propriedades antioxidantes dos polifenóis presentes nestes extratos podem proteger os vasos sanguíneos das consequências deletérias do estresse oxidativo. Experimentos prévios mostram o efeito antidiabético do ácido gálico extraído de plantas e na forma isolada em ratos diabéticos. Nesse estudo, avaliamos a hipótese de que o ácido gálico (AG), um ácido fenólico presente em diversas plantas, pode apresentar efeito antioxidante e, consequentemente, efeito protetor bioquímico e vascular em indivíduos diabéticos. Com o intuito de avaliar a atividade antioxidante e protetora do ácido gálico, cinco grupos de ratos Wistar, um normoglicêmico e quatro diabéticos induzidos por estreptozotocina (50 mg/kg/i.p) (n=10/grupo) foram tratados oralmente com o ácido gálico (Ácido Gálico - AG) (60 ou 80 mg/kg/dia), veículo (água, Normoglicêmicos - Normog e Diabéticos não tratados - DC) ou metformina (controle positivo, Diabéticos Tratados com Metformina - DTM) (500 mg/kg/dia) durante 4 semanas. O ganho de massa, o consumo de água e ração e a glicemia de jejum foram observadas a cada sete dias. Com a utilização de um sistema AVS de banho de órgãos isolados (miógrafo), estudos de reatividade vascular foram realizados para avaliar a contração induzida por fenilefrina (Fen) e o relaxamento produzido por acetilcolina (ACh) e pelo doador de óxido nítrico (NO), nitroprussiato de sódio (NPS), em anéis de aorta torácica de ratos normoglicêmicos e diabéticos. Os resultados mostraram que o AG não reduziu o nível glicêmico dos animais diabéticos. O grupo DC apresentou perda de massa corporal e aumento da ingestão de água e ração. O tratamento com ácido gálico não foi capaz de reverter estas alterações. As curvas concentração-efeito para a fenilefrina (Fen) demonstraram que a resposta contrátil induzida foi dependente da concentração e não houve diferenças entre os grupos. Os anéis de aorta de ratos diabéticos apresentaram um relaxamento menor do que o grupo controle, o que caracteriza a disfunção endotelial. Normoglicêmicos (E_{max} : $116,317 \pm 12,432\%$; pD_2 : $7,399 \pm 0,322$; n=3) e DC (E_{max} : $73,899 \pm 8,669\%$; pD_2 : $6,476 \pm 0,379$; n=4). O relaxamento induzido pelo NPS induziu relaxamento dependente da concentração e foi semelhante entre os grupos. Portanto, o tratamento oral com ácido gálico durante 28 dias consecutivos em doses de 60 e 80 mg/kg não foi capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. No entanto, este tratamento impediu a disfunção endotelial induzida por diabetes.

Palavras-chave: Ácido Gálico, *Diabetes Mellitus*, Radicais Livres, disfunção endotelial, reatividade vascular e Óxido Nítrico.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is an important public health problem due to its elevated prevalence, morbidity and mortality. It is characterized by chronic hyperglycaemia due to the absence of insulin or by its inability to exert its effects properly. The inappropriate control of glycaemia and/or excessive oxidative stress may cause vascular complications, such as endothelial dysfunction. Great quantities of free radicals, such as oxygen or nitrogen reactive species, diminish the bioavailability of nitric oxide (NO), which is the main endogenous vasodilator that regulates the vascular tonus. This reduced bioavailability of NO characterizes the endothelial dysfunction. The pharmacological treatment of DM involves the use of insulin and/or oral hypoglycemic drugs, but ethnopharmacologic and experimental data show that extracts of or compounds isolated from plants have been used to treat the symptoms of DM. The hypothesis is that the antioxidant properties of polyphenols present in those extracts protect the blood vessels from the deleterious consequences of oxidative stress. Previous experiments have shown the antidiabetic effect of galic acid extracted from plants or in the isolated form in diabetic rats. In this study, we have evaluated the hypothesis that galic acid, a phenolic acid present in many plants, may present antioxidant effect and, thus, biochemical and vascular protector effects in diabetic animals. Male Wistar rats were randomly divided in 5 groups (n=10/group): normoglycemic rats (Normog) and streptozotocin-induced diabetic rats treated with water (vehicle), metformin (positive control, 50 mg/kg) or galic acid (AG 60 or 80 mg/kg) by oral route for 28 consecutive days. The body mass gain, the water and food intake and the fasting glucose were analyzed weekly. Vascular reactivity studies were performed and cumulative concentration-effect curves for phenylephrine, acetylcholine and sodium nitroprusside were done in thoracic aorta rings isolated from normoglycaemic and diabetic rats. Our results have shown that the oral treatment with galic acid at the doses used was not able to reduce the serum glucose levels in diabetic animals. The diabetic group presented body mass loss and augmented water and food intake, and the oral treatment with galic acid was not able to prevent these effects. The contraction induced by phenylephrine was concentration-dependent and it was not different among the groups. The aortic ring from diabetic rats presented a smaller relaxation to acetylcholine (normoglycaemic: Emax: $116,317 \pm 12,432\%$, n=3, diabetic max: $73,899 \pm 8,669\%$, n=4), characterizing endothelial dysfunction. The treatment with galic acid prevented this effect (AG 60 mg/kg: Emax: $92,403 \pm 3,172\%$, n=2; AG 80 mg/kg: Emax: $93,061 \pm 3,917\%$, n=3). The endothelium-independent relaxation induced by sodium nitroprusside was similar in aortic rings from normoglycemic and diabetic rats. Therefore, the oral treatment with galic acid for 28 consecutive days at the doses of 60 and 80 mg/kg was not able to reduce the blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic rats. However, this treatment prevented the endothelial dysfunction induced by diabetes.

Key words: Diabetes *mellitus*, endothelial dysfunction, free radicals, galic acid, nitric oxide and vascular reactivity.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grave problema de saúde pública por causa da sua alta prevalência, morbidade e mortalidade (Mendes et al., 2010). Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2009), a cada ano, 7 milhões de pessoas desenvolvem os sintomas do diabetes em todo o mundo.

A insulina produzida pelas células β -pancreáticas é agente facilitador da homeostase da glicose ao promover sua captação e estoque no músculo esquelético, fígado e adipócitos. A falta ou a ineficiência das ações da insulina nos alvos periféricos causam o diabetes, caracterizado por hiperglicemia, que ao longo do tempo, pode ocasionar uma série de alterações metabólicas e neurais (Kahn; Hull; Utzschneider, 2006).

Os dois principais tipos de *Diabetes mellitus* são o tipo 1, que corresponde a 10-20% dos casos e, o tipo 2, que corresponde a 80-90% dos casos. Esses dois tipos distinguem-se pela apresentação clínica, origem genética, patogênese, lesão das ilhotas pancreáticas e resposta à insulina (Contreras, 2004).

O tratamento farmacológico do DM envolve o uso de insulina e/ou hipoglicemiantes orais. Por outro lado, muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar dos sintomas do DM. Estas plantas representam mais de 725 gêneros em 183 famílias (Negri, 2005). Mais de 1000 plantas têm sido descritas como eficazes no tratamento do DM. No entanto, muitas dessas descrições são relatos de uso tradicional, e menos da metade destas plantas ou extratos de plantas obtiveram uma avaliação médica ou científica completa de seus supostos benefícios (Mohamed et al., 2012).

A grande diversidade de classes químicas encontradas nessas preparações vegetais usadas no tratamento desta enfermidade indica que diferentes mecanismos de ação devem estar envolvidos na regulação e/ou redução do nível glicêmico. Estas espécies vegetais podem agir aumentando a liberação de insulina através da estimulação das células β -pancreáticas; promovendo resistência aos hormônios hiperglicemiantes; produzindo um aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuindo a utilização de glicogênio; aumentando o consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminando radicais livres; promovendo a resistência à peroxidação de lipídeos; corrigindo a desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas; promovendo aumento da microcirculação do sangue no organismo e estimulando a ativação de enzimas metabólicas (Dornas e al., 2009).

Uma inadequação no controle da diabetes mellitus, muitas vezes leva a várias doenças letais, incluindo complicações vasculares (Salsali & Nathan, 2006; Balakumar & Dhanaraj,

2013; Cooper et al., 2001). Radicais livres e o estresse oxidativo estão entre os fatores envolvidos na patogênese do diabetes e, particularmente, parecem ter um papel importante na destruição das células β -pancreáticas e no desenvolvimento das complicações crônicas da doença (Baynes, 1991). A disfunção endotelial vascular (DEV), um evento inicial que corresponde à vasculopatia diabética (Srinivasan et al., 2004; Lee et al., 2012), é uma das consequências do diabetes que pode ser causada pelo estresse oxidativo excessivo.

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários de plantas. Várias propriedades químicas e efeitos biológicos dos polifenóis na dieta podem estar envolvidos na proteção contra o risco cardiovascular. Uma hipótese óbvia é a de que as propriedades antioxidantes dos polifenóis podem proteger os vasos sanguíneos das consequências deletérias do estresse oxidante associado com muitos, se não todos, os fatores de riscos cardiovasculares (Stoclet et al., 2004). O ácido gálico, importante ácido fenólico encontrado em fontes naturais, possui ação antioxidante e protetora cardiovascular (Punithavathi et al., 2011).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração por via oral do ácido gálico sobre a glicemia de ratos diabéticos, bem como o consumo de água e ração e o ganho de massa corporal. Também foi investigado o efeito do ácido gálico sobre a contração/relaxamento em anéis de aorta torácica de animais diabéticos. A nossa hipótese é a de que o ácido gálico apresenta efeito anti-hiperglicemiante, antioxidante e previne a disfunção endotelial em ratos diabéticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Diabetes mellitus* (DM)

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) representam um dos principais desafios de saúde para o desenvolvimento global nas próximas décadas. Elas ameaçam a qualidade de vida de milhões de pessoas, representam o maior custo para os sistemas de saúde de todo o mundo com grande impacto econômico para os portadores, suas famílias e a sociedade em geral dos países, especialmente os de baixa e média renda (Ministério da Saúde, 2011).

Estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta que as DCNT já são responsáveis por 58,5% de todas as mortes ocorridas no mundo e por 45,9% da carga global de doenças. No Brasil, em 2008, elas foram responsáveis por 62,8% do total das mortes por causa conhecida e séries históricas de estatísticas de mortalidade indicam que a proporção de mortes por DCNT aumentou em mais de três vezes entre as décadas de 30 e 90. As transições demográfica, nutricional e epidemiológica ocorridas no século passado determinaram um perfil de risco em que doenças crônicas como a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e o *Diabetes mellitus* (DM) assumiram ônus crescente e preocupante. Ambas são doenças muito frequentes, constituindo sérios problemas de saúde pública (Ministério da Saúde, 2011).

O DM configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O envelhecimento da população, a urbanização crescente, o sedentarismo, dietas pouco saudáveis e a obesidade são os grandes responsáveis pelo aumento da prevalência do DM (Ministério da Saúde, 2011). Segundo dados de 2013 da IDF, cerca de 8,3% da população global de adultos, o que corresponde a 382 milhões de habitantes, são diabéticos. Número que aumentará para mais de 592 milhões em menos de 25 anos. Com 175 milhões de casos não diagnosticados atualmente, o que representa 46% dos casos, uma grande parcela da população mundial irá desenvolver progressivamente complicações de forma não consciente.

A maior parte dos 382 milhões de diabéticos está compreendida na faixa etária entre 40 e 59 anos, dos quais, 80% são oriundos de países de média e baixa renda. O aumento dos casos de diabetes ocorre a cada ano, em especial os portadores de *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), que apresentam uma tendência em dobrar seu número até 2035. Estima-se que mais de 21 milhões de casos de Diabetes Gestacional contribuam para a carga global do número de

portadores da doença. Mães de 17% dos nascidos vivos em 2013 apresentaram glicemia elevada durante a gestação (International Diabetes Federation, 2013).

Tanto em termos humanos, como financeiros, o ônus do DM é enorme. O DM é responsável por 5,1 milhões de mortes e representou aproximadamente 548 milhões de dólares em custos para o sistema global de saúde (11% da despesa mundial) em 2013 (International Diabetes Federation, 2013). O grande impacto econômico da doença ocorre notadamente nos serviços de saúde, como consequência dos crescentes custos do tratamento e, sobretudo das complicações, como as doenças cardiovasculares, diálise por insuficiência renal crônica e as cirurgias para amputações de membros inferiores (Ministério da Saúde, 2011).

No Brasil, de acordo com o VIGITEL 2009 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) que faz parte do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para DCNT do Ministério da Saúde, a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,8%, o que representa cerca de 7,5 milhões de pessoas que confirmaram ser portadoras da doença.

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica e resulta da falta de insulina ou da incapacidade desta de exercer de maneira adequada seus efeitos. Este distúrbio endócrino envolve o metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas, e está associado com graves complicações micro e macrovasculares, incluindo neuropatias, nefropatias, retinopatias, doenças cardiovasculares e vasculares periféricas (Brahmachari, 2011). O DM está relacionado a uma série de sintomas comuns tais como polifagia e polidipsia excessivas, fraqueza muscular, perda de peso, elevação da glicemia e glicosúria (Shoelson, 1995; Said et al., 2002).

A classificação atual do DM é baseada na sua etiologia. Segundo a classificação proposta pela OMS e pela American Diabetes Association (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM insulino dependente ou tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos específicos de DM (Tabela 1). Ainda existem duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares (Associação Americana de Diabetes, 2011).

TABELA 1. Classificação etiológica de *Diabetes mellitus* proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela American Diabetes Association (ADA). Fonte: Gross et al., 2002.

I. Diabetes tipo 1

- Destruição das células beta, usualmente levando a deficiência completa de insulina.
 - A. Autoimune
 - B. Idiopático
-

II. Diabetes tipo 2

- Graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina.
-

III. Outros tipos específicos

- A. Defeitos genéticos da função da célula β
 - B. Defeitos genéticos da ação da insulina
 - C. Doenças do pâncreas exócrino
 - D. Endocrinopatias
 - E. Indução por drogas ou produtos químicos
 - F. Infecções
 - G. Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
-

IV. Diabetes Gestacional

O DM1 é responsável por cerca de 5 a 10% de todos os casos de *Diabetes mellitus*, sendo subdividido em tipo 1A, tipo 1B e Latent Autoimmune Diabetes of the Adult (LADA). Geralmente o DM1 se inicia antes dos 30 anos de idade, mas pode acometer indivíduos em qualquer faixa etária. Há destruição das células β pancreáticas e seu tratamento exige o uso de insulina (Gross, 2002; Imagawa et al., 2000; Groop et al., 1986).

A forma presente na maioria dos casos (90-95%) é o DM2 e caracteriza-se por graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso e cetoacidose. Raramente desenvolve-se espontaneamente, ocorrendo apenas quando associada a outras condições como infecções graves (Torquato et al., 2003). Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, mas o tratamento com esse hormônio pode ser necessário para a obtenção de um controle metabólico adequado (Wild et al., 2004). O diagnóstico pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente feito a partir dos 40 anos de idade. É de extrema importância destacar que nos últimos anos a incidência de DM2 vem crescendo entre crianças e jovens nos Estados Unidos, em associação ao aumento da obesidade (Kempf et al., 2008).

Diabetes mellitus gestacional é definido como qualquer nível de intolerância a carboidratos, resultando em hiperglicemia de gravidade variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Sua fisiopatologia é explicada pela elevação de hormônios contrarreguladores da insulina, pelo estresse fisiológico imposto pela gravidez e a fatores predeterminantes (genéticos ou ambientais). Embora o principal hormônio relacionado à resistência à insulina durante a gravidez seja o hormônio lactogênico placentário, outros hormônios hiperglicemiantes como cortisol, estrógeno, progesterona e prolactina também estão envolvidos (Miranda & Reis, 2008). O diabetes gestacional acomete de 2-10% das mulheres americanas grávidas. Outros tipos de diabetes resultantes de cirurgia, medicações, infecções e doenças pancreáticas correspondem de 1-5% de todos os casos diagnosticados de diabetes (CDC, 2011).

Pertencem à categoria "outros tipos" as formas menos comuns, cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos associados com outras doenças, com uso de fármacos diabetogênicos e outras condições (Koro et al., 2004).

A correta classificação do tipo do DM leva precocemente ao tratamento adequado, com maior índice de sucesso na obtenção de um bom controle glicêmico, o que por sua vez comprovadamente reduz as complicações microvasculares, tanto em pacientes com DM1, quanto no DM2 (Gross et al., 2005; Campagnolo et al., 2008).

O diagnóstico do DM está baseado na identificação dos sintomas clínicos: polidipsia, poliúria, polifagia e perda de massa corporal; e em resultados de exames laboratoriais: glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL e o teste de tolerância oral à glicose (realizado 2 horas após a ingestão de uma sobrecarga de 75g de glicose) acima de 199 mg/dL. Valores de hemoglobina glicada, também conhecida como glicohemoglobina ou HbA1C maiores ou iguais a 6,5% também indicam o diagnóstico de DM (Associação Americana de Diabetes, 2009).

2.2. Manejo farmacológico

Reduzir o impacto do DM significa, antes de tudo, reduzir a incidência da doença, antecipando-se ao seu aparecimento com medidas preventivas, sobretudo em indivíduos de alto risco, tais como os portadores de tolerância diminuída à glicose e de glicemia de jejum alterada. Intervenções comportamentais e farmacológicas têm sido estudadas e aplicadas com esse objetivo. Modificações no estilo de vida, tais como controle dietoterápico e prática

sistemática de exercícios físicos, bem como o uso de alguns fármacos orais têm se mostrado eficazes (Lima et al., 2012).

O manejo farmacológico atual para o tratamento do DM é focado principalmente em elevar os níveis plasmáticos de insulina (por agentes orais que promovem secreção de insulina ou pela administração direta de insulina), melhorando a sensibilidade dos tecidos ao hormônio e eventualmente, reduzindo a taxa de absorção de carboidratos a partir do trato gastrointestinal. Estas ações são produzidas por variadas classes de fármacos como sulfonilureias, glinidas, glucagon-like peptide 1 (GLP-1), metformina, tiazolidinedionas, inibidores de α -glicosidase, entre outros (Verspohl, 2012).

Os fármacos anti-hiperglicemiantes desempenham um papel importante, pois conseguem compensar os defeitos na secreção de insulina como também a sua ação nos tecidos periféricos. No entanto, como o DM é multifacetado, diversos aspectos relevantes como a perda de células secretoras (destruição das células β pancreáticas), hiperglucagonemia, o esvaziamento gástrico retardado, neuropatia diabética, retinopatia, nefropatia e as complicações vasculares decorrente do diabetes como aterosclerose e hipertensão arterial que são principalmente desencadeadas por alterações no endotélio vascular, ainda não foram resolvidos. Uma redução contínua da hiperglicemia irá diminuir o risco do desenvolvimento de doenças microvasculares e reduzir suas complicações (Kim et al., 2006).

Dentre estes fármacos, a metformina tem sido usada como fármaco de primeira escolha para o tratamento do DM2, pois além das suas ações anti-hiperglicemiantes como aumento da sensibilidade à insulina e inibição da lipólise no tecido adiposo, melhora o perfil lipídico, reduz a pressão arterial, promove maior ação antioxidante, ativa a AMP-kinase, reduz mortalidade e morbidade macrovascular e induz proteção da função endotelial (Sena et al., 2011).

O controle do DM permanece insatisfatório na grande maioria da população mesmo com a introdução de novos fármacos e da melhor compreensão dessa entidade clínica nos últimos anos. Koro et al. (2004) analisando os níveis de hemoglobina glicada (HbA1C), mostraram que menos de 50% dos portadores do DM mantêm sua doença adequadamente tratada, tendo havido até piora no controle metabólico, quando comparados os anos de 1988-1994 (44,5%) e 1999-2000 (35,8%).

2.3. Disfunção endotelial (DE)

A disfunção endotelial pode ser definida como uma redução na vasodilatação dependente do endotélio, causada por uma redução na biodisponibilidade do NO (Cai & Harrison, 2000). Está associada a condições fisiopatológicas severas, incluindo o *Diabetes mellitus* (Savoia & Schiffrin, 2006).

O termo “disfunção endotelial” refere-se a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise, sendo o tônus vascular o aspecto mais estudado. A disfunção endotelial também é freqüentemente referida como piora no relaxamento dependente do endotélio, causado pela perda da biodisponibilidade do NO, muito embora a produção de outras substâncias vasoativas derivadas do endotélio, como a prostaciclina I₂, Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF), endotelina-1, angiotensina II, tromboxano A₂, também possa estar alterada (Mombouli & Vanhoute, 1999).

A disfunção endotelial está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como na obesidade, intolerância à glicose, hiperglicemia (*Diabete mellitus*), hipertensão arterial e dislipidemia. Em todas essas condições, ocorre resistência insulínica, a qual se apresenta como um distúrbio metabólico que se manifesta por redução na utilização da glicose pelo músculo esquelético periférico (Ferranini et al., 1997), e tem sido fortemente associada à DE, que tem se mostrado ocorrer precocemente (Hsueh et al., 2004).

A relação entre DM1 e doença cardiovascular é bem conhecida (Kannel & McGee, 1979) e tem sido atribuída à associação entre hiperglicemia crônica, DE e inflamação crônica (Schram et al., 2003; Stehouwer et al., 2002). É bem conhecido, em estudos clássicos, que a hiperglicemia crônica é um importante preditor de complicações micro e macrovasculares (Nejm, 1993; Diabetes Care, 1998; Nathan et al., 2005). A DE tem sido sugerida como um evento precoce na patogênese das complicações vasculares do DM1 (Järvisalo et al., 2004). Ela reflete a presença de um fenótipo propenso a aterogênese e pode, dessa forma, servir de marcador de risco para aterosclerose, já tendo sido demonstrada constituir-se em um fator de risco independente para eventos cardiovasculares (Juonala et al., 2004).

Embora a natureza da ligação patogênica entre níveis elevados de glicose circulantes e complicações cardiovasculares seja uma fonte de debate, é reconhecido que a hiperglicemia é a responsável pela patogênese de complicações vasculares associadas com o DM. Demonstrou-se que a hiperglicemia pode causar várias alterações na função vascular, incluindo uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio (Pieper, 1999; Davel et al., 2000; Akamine et al., 2006), um aumento da resposta de contração do músculo liso vascular (Davel et al., 2000; Abebe & MacLeod, 1990; Xavier et al., 2003) e uma

predisposição para o desenvolvimento de eventos inflamatórios, trombóticos e ateroscleróticos (Cohen & Tong, 2010). Fatores de risco recentemente reconhecidos como obesidade (Steinberg et al., 1996), a proteína C-reativa elevada (Fichtlscherer et al., 2000), e infecção sistêmica crônica (Prasad et al., 2000) também estão associados à disfunção endotelial.

São mecanismos causais da disfunção endotelial nos estados de resistência à insulina e DM: alteração de vias de sinalização que levam à inativação da eNOS, ativação do endotélio por moléculas pró-inflamatórias, disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo na vasculatura (Tabit et al., 2010), os quais podem ser particularmente importantes de acordo com fatores genéticos predisponentes (Piccoli et al., 2008). O estresse oxidativo é induzido pelas espécies reativas, por exemplo, o ânion superóxido, que reage com o NO para formar peroxinitrito (ONOO^-), substância altamente reativa.

A progressão da doença vascular no DM é em grande parte relacionada com os mecanismos da disfunção endotelial. Uma redução da vasodilatação dependente do endotélio tem sido demonstrada em diversos leitos vasculares de modelos experimentais em animais diabéticos e em pacientes humanos com os tipos 1 e 2 da doença (Pieper, 1999; Davel et al., 2000; Akamine et al., 2006). Nestas condições existe a vasoconstrição, aumento da adesão de plaquetas e de leucócitos, crescimento descontrolado de células, especialmente as células do músculo liso nas paredes dos vasos, aumento da deposição de lipídeos no subendotélio e uma elevação da tendência para o desenvolvimento de trombose vascular. Os mecanismos associados a estes eventos podem ser múltiplos e incluem mudanças na síntese, liberação, difusão ou degradação de vários fatores produzidos pelas células endoteliais (óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, prostaciclina, prostaglandina H_2 , tromboxana A_2 , angiotensina II, endotelina-1, ânions superóxido ou espécies reativas de oxigênio).

Vários estudos demonstram as evidências da ocorrência de DE no *Diabetes mellitus*. Na década de 80, equipes de pesquisadores já demonstravam a disfunção vasomotora em modelos experimentais, onde podemos citar os estudos desenvolvidos por Oyama et al. (1986) e Tesfamariam et al. (1989). Na década de 90, estudos clínicos desenvolvidos por Calver et al. (1992) e Johnstone et al. (1993), com portadores do DM1 e os desenvolvidos por McVeigh et al. (1992) e Williams et al. (1996) com portadores do DM2, também apresentaram evidências de disfunção endotelial.

A função endotelial no DM1 é modulada pelo grau de hiperglicemia (Williams et al., 1998), pela duração do diabetes (Järvisalo et al., 2004; Houben et al., 1996; Singh et al., 2003), pelas concentrações séricas de insulina (Steinberg et al., 1994), pela presença de

complicações crônicas, especialmente neuropatia autonômica (Makimattila et al., 1997) e microalbuminúria (Elliott et al., 1993).

No DM1 o tempo com a doença é um determinante relevante para a presença da DE. Pacientes que são portadores da doença há mais de 10 anos, a disfunção endotelial é um achado relativamente comum. No período compreendido entre cinco e dez anos de DM1, a DE ocorre ocasionalmente. No estudo de Singh et al. (2003), adolescentes com pelo menos um ano de DM1 e mau controle glicêmico apresentaram comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio quando comparados a indivíduos normoglicêmicos. Quando avaliadas a vasodilatação independente do endotélio e a espessura da camada íntima-média da carótida, nenhuma diferença foi encontrada entre os dois grupos.

Resultados de outros estudos sugerem que a DE pode ser ainda mais precoce, ocorrendo antes de cinco anos do início da doença. A pesquisa realizada por Järvisalo et al. (2004) comparou crianças de 11 anos de idade, com DM1 há quatro anos, não-obesas, com mau controle glicêmico a crianças sem DM, em relação à dilatação mediada por fluxo (DMF) e à espessura íntima-média da carótida. Como resultado, em 36% dos casos ficou evidente a presença de DE e a espessura íntima-média da carótida foi maior nas crianças com DM1. Os autores concluíram que DE é comum em crianças com DM1 inicial e pode ser um preditor para o desenvolvimento de aterosclerose prematura.

Os mais diversos mecanismos pelo qual o DM1 leva à DE são complexos e parcialmente compreendidos. Embora a presença concomitante de hipertensão e dislipidemia possa contribuir diretamente para a DE, uma combinação de diversos mecanismos diretamente relacionados é determinante para o desenvolvimento desta condição.

A maioria, se não todos os fatores de risco que estão relacionados com aterosclerose, morbidade e mortalidade cardiovascular, incluindo os fatores de risco tradicionais e não tradicionais, também estão associados à disfunção endotelial. Muitos deles, incluindo hiperlipidemia, hipertensão, diabetes e tabagismo estão associados com excesso de produção de espécies reativas de oxigênio ou aumento do estresse oxidativo (Cai & Harrison, 2010). Além disso, embora o radical NO atue como um antioxidante e limite as reações em cadeia de peroxidação lipídica, ele também possui efeitos pró-oxidantes por formação de peroxinitrito a partir de sua reação com o ânion superóxido (Patel et al., 2000).

2.4. Endotélio vascular

O primeiro sistema a ser estabelecido durante o processo embrionário é o vascular (Manner et al., 2001; Brade et al., 2006). Na fase embrionária, durante o processo de gastrulação, se estabelecem os três folhetos germinativos: endoderme, ectoderme e mesoderme (Risau, 1997). A indução da mesoderme por morfógenos da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) tem papel essencial na indução da mesoderme lateral e paraxial e na formação dos angioblastos e células hematopoiéticas. Além dos FGFs, membros da família dos fatores de crescimento e transformação (TGF- β) também foram encontrados induzindo mesoderme, incluindo notocorda e somitos, o que sugere uma atuação sinérgica desses morfógenos durante a formação da mesoderme (Risau & Flamme, 1995).

Nos mamíferos, observam-se na formação da mesoderme lateral do saco vitelínico os primeiros sinais do desenvolvimento de um plexo vascular primitivo. Os hemangioblastos induzidos na mesoderme pela sinalização de FGF são os precursores das células hematopoiéticas e endoteliais (Risau & Flamme, 1995). O agregado celular formado por esses hemangioblastos no saco vitelínico é conhecido por ilhotas sanguíneas.

Estas ilhotas sanguíneas são aglomerados celulares sólidos originados do mesoderma esplâncnico. Na porção periférica desses agregados celulares estão localizados os angioblastos, enquanto que a porção central é constituída por precursores hematopoiéticos (Risau, 1997; Carmeliet, 2000). A diferenciação dos precursores endoteliais em células endoteliais vasculares é o primeiro passo na formação dos vasos sanguíneos, que mais tarde irão constituir a superfície interna de revestimento dos vasos maduros. Todo este processo é denominado vasculogênese e se dá através da diferenciação *in situ* dos hemangioblastos em angioblastos (Ratajska et al., 2006).

As células formadoras da camada íntima dos sistemas vasculares sanguíneos e linfáticos, tipicamente epiteliais quanto à sua estrutura, posição e função, desenvolvem-se a partir do mesoderma são chamadas de células endoteliais. A membrana que essas células constituem é denominada endotélio (Marsh & Coombes, 2005; Kelishadi et al., 2008).

O endotélio vascular é considerado um tecido ativo e dinâmico. Controla funções importantes, tais como a regulação do tônus vascular, fluidificação, coagulação, manutenção da circulação sanguínea, assim como respostas inflamatórias. Dessa forma, o endotélio representa uma interface entre os elementos da circulação e os vários sistemas do organismo (Marsh & Coombes, 2005).

O endotélio vascular é uma única camada de células que reveste todo o sistema vascular. Em adultos, aproximadamente 10 trilhões de células formam um “órgão” de quase 1 kg. A integridade estrutural e funcional das células endoteliais é importante na manutenção da

parede do vaso e da função circulatória. Como uma barreira, o endotélio é semipermeável e regula a transferência de moléculas. As células endoteliais são dinâmicas e têm funções metabólicas e sintéticas. Exercem ações endócrinas, autócrinas, parácrinas e influenciam as células musculares lisas, plaquetas e leucócitos periféricos (Galley & Webster, 2004).

Elas mantêm a homeostase da vasculatura por meio da síntese de substâncias vasoativas que modulam o tônus vascular, inibem a agregação plaquetária e a proliferação das células musculares lisas vasculares. O óxido nítrico (NO) tem papel fundamental neste equilíbrio (Palmer & Moncada, 1987).

Foi em 1980 que se tornou evidente que o endotélio vascular não se restringe a ser apenas uma monocamada que funciona como uma barreira física entre o sangue e o tecido subjacente, mas também funciona como um órgão endócrino com capacidade de produzir e liberar as substâncias ativas metabolicamente diferentes. Em 1980, Furchgott e Zawadzki mostraram pela primeira vez que as células endoteliais são fundamentais no relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de coelho.

Estes pesquisadores também demonstraram que a acetilcolina ativa receptores muscarínicos em células endoteliais e que esta ativação libera uma substância que foi denominada "Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF)". O EDRF se difunde para o músculo liso e induz o relaxamento. Rapoport et al. (1983), verificaram que agentes que induzem relaxamento devido à liberação de EDRF também são responsáveis pela ativação da enzima guanilil ciclase e a conseqüente formação de 3',5'-monofosfato de guanosina (GMPc). Estudos desenvolvidos por Arnold et al. (1977) já tinham apresentado resultados parecidos para soluções saturadas com NO. As semelhanças químicas e biológicas existentes entre o EDRF e o NO se tornaram objetos de pesquisas, e em 1987, Ignarro et al. e Palmer et al. identificaram o EDRF como sendo o óxido nítrico.

2.5. Óxido nítrico (NO)

A biossíntese do óxido nítrico ocorre a partir da oxidação de um dos dois nitrogênios da L-arginina, que é convertida em L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (Moncada et al. 1991). Existem três isoformas da NOS, uma induzida pelo estímulo imunológico (iNOS) e duas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) (Moncada et al., 1991). A NOS induzida (iNOS) é predominantemente associada com macrófagos, mas já foi isolada do músculo liso, hepatócitos, condrócitos, células microgliais, neutrófilos, células endoteliais vasculares e outras células parenquimais. A NOS endotelial

(eNOS) está associada à membrana e é expressa nas células endoteliais, e a NOS neuronal (nNOS) é expressa no citoplasma de neurônios e de outros tipos de células (Di Rosa et al. 1971; McCall et al. 1989; Bredt & Snyder, 1990; Pollock et al. 1991; Schmidt & Murad, 1991; Fukuto & Chadhuri, 1995; Evans et al. 1996; Kirkeboen et al., 1999). As isoformas constitutivas dependem de íons cálcio (Ca^{2+}) e da proteína calmodulina para sua ativação. Os íons Ca^{2+} complexam com a calmodulina para formar o complexo Ca^{2+} -calmodulina (Moncada et al., 1991). As três isoformas da NOS são hemoproteínas e há mais de 50% de homologia entre elas (Li & Förstermann, 2000; Li & Poulos, 2005).

À medida que o NO é gerado no endotélio, ele difunde-se rapidamente para o lúmen vascular e para as células alvo vizinhas, as células do músculo liso vascular, determinando a comunicação intercelular (Busconi & Michel, 1993). Algumas características, como alta lipofilicidade, pequeno tamanho molecular e natureza gasosa favorecem a difusão do NO (Ignarro, 1991). O NO possui ação fisiológica sobre diversos leitos vasculares, produzindo vasodilatação por diversos mecanismos que possuem como finalidade diminuir a concentração citoplasmática de cálcio no músculo (Ignarro, 1989).

Existem diversos alvos para atuação do NO, mas o principal deles é a enzima guanilil ciclase, que se apresenta em duas isoformas: uma ligada à membrana, denominada particulada e uma solúvel no citoplasma, denominada guanilil-ciclase solúvel (GCs). Apenas a isoforma GCs é alvo para ação do NO (Thippeswamy et al., 2006). A elevação dos níveis intracelulares de GMPc é feita pela ativação da GCs pelo NO, que atua como segundo mensageiro intracelular amplificando a resposta celular (Arnold et al., 1977; Ignarro, 1991). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilil ciclase solúvel, acarretando alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A guanilil ciclase catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), que tem como resultado a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Dusse et al., 2003). O principal alvo do GMPc é a família das proteína-quinases dependentes do GMPc, denominadas G quinases (GKs). A ativação da GK e a conseqüente fosforilação de várias proteínas constitui uma cascata, que leva à redução da concentração citoplasmática de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) e, assim, ao relaxamento vascular.

Outro mecanismo de ação do NO também pode ser a ativação direta de canais iônicos, principalmente canais para potássio, contribuindo para o relaxamento muscular via hiperpolarização de membrana (Bolotina et al., 1994). A instabilidade do NO em condições fisiológicas é muito alta e, assim, ele pode reagir quase instantaneamente com moléculas que apresentem elétrons desemparelhados (McIntyre et al., 1999), fundamentalmente outros

radicais livres e metais de transição como o ânion superóxido (O_2^-) e o átomo de ferro localizado no sítio heme de várias proteínas. Esta alta reatividade explica o curto tempo de meia vida do NO, tanto *in vitro* (de aproximadamente 5 segundos) quanto *in vivo* (0,1 segundos) (Nishida et al., 1992). O mecanismo pelo qual o NO é removido da GC após ocorrer a vasodilatação necessária é desconhecido. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima guanilil ciclase (Beckman & Koppenol, 1996).

O NO que deixa a célula endotelial em direção à corrente sangüínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemácias. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o NO promove um aumento de GMPc e a conseqüente diminuição do Ca^{++} livre. Como o Ca^{++} é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo estará inibido (Wolin, 2000). As plaquetas humanas possuem e-NOS e são também produtoras de NO. Tanto o NO oriundo das células endoteliais quanto o produzido endogenamente são importantes no controle da função plaquetária (Radomski, 1990; Vasta et al., 1995). Das et al. (1995) sugeriram que a propriedade de inibir a agregação plaquetária apresentada pelo alho resulta da sua capacidade de estimular a c-NOS.

Se o NO penetra nas hemácias, ele é eliminado através de sua reação com o ferro da hemoglobina, tanto oxigenada ($Hb-O_2$) quanto desoxigenada (Wolin, 2000). Recentemente, o citrato de sildenafil mostrou-se eficaz para tratamento da disfunção erétil. A ação deste medicamento se dá pela inibição potente e seletiva da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), que promove a degradação da GMPc. Com a inibição a concentração de GMPc que é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa se mantém elevada (Dusse, 2003).

2.6. Estresse oxidativo

Diversas pesquisas que foram desenvolvidas nos últimos anos apresentaram uma elevada quantidade de evidências que demonstram a relevância dos radicais livres (RL) e outros oxidantes no processo do envelhecimento e das doenças degenerativas associadas a ele, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e *Diabetes mellitus* tipo 1 (Atoui et al., 2005; Barreiros et al., 2006; Sousa et al., 2007; Fukai & Ushio-Fukai, 2011). Os radicais livres quando em altas concentrações podem gerar o estresse oxidativo (EO) (Nascimento et al., 2011), que é caracterizado pelo

desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares (Sies, 1993).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (Bianchi et al., 1999). Contudo, na condição de pró-oxidante, a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (Cerutti, 1991; Cerutti, 1994). O EO está presente em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogénico em muitas delas.

As anormalidades metabólicas relacionadas com DM são complexas e de forma direta ou indireta resultam em disfunção do endotélio e da musculatura lisa vascular (Creager et al., 2003) e o estresse oxidativo tem um papel primordial no desenvolvimento de tal disfunção (Schalkwijk & Stehouwer, 2005; Rask-Madsen & King, 2007). Além disso, demonstrou-se que os portadores de DM apresentam concentrações abaixo do ideal de vários antioxidantes, que predispõe para o desenvolvimento do estresse oxidativo (Peerapattit et al., 2006; Ford et al., 2003).

O EO é a causa final das alterações estruturais e funcionais nas células vasculares em pacientes diabéticos, e o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é responsável pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (Capellini et al., 2010). A reação entre $O_2^{\cdot-}$ e NO forma o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Nishikawa et al., 2000), o qual é capaz de promover a peroxidação lipídica (Wajchenberg, 2002). Além disso, $ONOO^-$ pode oxidar a tetrahydrobiopterina (BH_4), que leva ao desacoplamento da NOS, resultando na síntese de $O_2^{\cdot-}$ em substituição à síntese de NO pela NOS (Satoh et al., 2005).

2.7. Radicais livres (RL)

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (Halliwell, 1994). Essa configuração faz dos RL moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Pompella, 1997).

Os RL podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Anderson, 1996; Yu & Anderson, 1997). Esses RL cujo elétron desemparelhado

encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO ou ERN (espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio) (Finkel & Holbrook, 2000; Halliwell, 2000; Pietta, 2000). O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radiculares: hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}^\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (Halliwell, 1999; Chatgililoglu & O'Neill, 2001; Wiseman et al., 1995; Cadet et al., 1999).

Entre as principais formas reativas de oxigênio, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o $\text{HO}^\bullet$ mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (Anderson, 1996). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídeos, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídeos. Existem ainda alguns que são pouco reativos, embora ainda assim possam gerar espécies danosas.

O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode ser sintetizado *in vivo* tanto enzimaticamente quanto não enzimaticamente. Enzimaticamente o $\text{O}_2^{\bullet-}$ é produzido por reações mediadas por NADPH oxidase (Babior, 2000; Vignais, 2002; Babior et al., 2002), citocromo P_{450} (Coon et al., 1992) ou Xantina oxidase (Yokoyama et al. 1990). A auto oxidação em exposição ao ar, onde moléculas não radicais como epinefrina, dopamina, tióis, entre outros, reagem lentamente com o oxigênio molecular (O_2) produzindo $\text{O}_2^{\bullet-}$ são vias não enzimáticas de produção de ânion superóxido.

A reação enzimática por NADPH oxidase consiste em um complexo protéico composto por um citocromo de baixo potencial associado à membrana (b_{558}), constituído pelas unidades ($\text{gp91}^{\text{phox}}$ e p22^{phox}), por algumas subunidades regulatórias encontradas no citosol (p47^{phox} , p40^{phox} e p67^{phox}) e uma pequena proteína G (Rac1 ou Rac2). Apesar dessa enzima ser melhor caracterizada em células fagocíticas, outras células apresentam semelhança quanto à produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ via NADPH oxidase, diferenciando-se quanto ao local (intra e extracelular) e ao ritmo de produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Li & Shah, 2004). A produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ via Xantina oxidase, que é uma enzima envolvida em processos de isquemia-reperusão, se dá

pela oxidação dos compostos hipoxantina à xantina e da xantina a urato com concomitante redução monoelétrica do O_2 e formação do radical superóxido (Pritsos, 2000).

Apesar destas formas de produção de superóxido, para alguns tipos celulares a principal fonte é a mitocôndria através da atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Halliwell, 2006; Jackson, 2008). A CTE é constituída por cinco distintos complexos, dos quais quatro possuem uma variedade de componentes potencialmente capazes de receber e doar elétrons na forma de hidrogênio ($H^+ + e^-$) ou como íon hidreto (H^-). O complexo IV é o responsável por reunir os elétrons transferidos através da cadeia e reduzir completamente o oxigênio molecular através da transferência de quatro elétrons e conseqüente formação de duas moléculas de água ($2H_2O$). Contudo, estima-se que, em condições fisiológicas normais, 2-5% do O_2 utilizado na CTE seja reduzido de forma incompleta, principalmente pelos complexos I e III, onde a transferência de apenas um elétron para o oxigênio origina o íon $^{\bullet}O_2^-$ (Raddatz et al., 2011; Turrens, 2003; Wang & Michaelis, 2010). Em solução aquosa o ânion $^{\bullet}O_2^-$ é um forte agente redutor e um fraco oxidante. Como agente redutor sua habilidade em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} pode acelerar a reação de Fenton. Embora seja um oxidante fraco em soluções aquosas, sua reação com o $NO^{\bullet}$ tem como produto o $ONOO^-$ que é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) (Vasconcelos et al., 2007).

O superóxido é um íon negativamente carregado e com relativa impermeabilidade à membrana sendo a primeira espécie reativa de oxigênio formada pelas células. Comparado a outras espécies reativas, possui um tempo de meia vida relativamente alto o que lhe permite uma maior difusão intracelular e conseqüente propagação de reações oxidativas seqüenciais que lhe necessitem como precursor (Fridovich, 1989; Fridovich, 1999; Powers & Jackson, 2008; Turrens, 2003).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto intermediário formado pela reação de dismutação de $^{\bullet}O_2^-$ catalisada pela enzima SOD, pela redução de 2 e^- na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases *in vivo*, localizadas nos peroxissomas (Vasconcelos et al., 2007). O peróxido de hidrogênio possui permeabilidade e tempo de vida superior ao superóxido (Halliwell & Gutteridge, 2007). É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radiculares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera $^{\bullet}OH$, através da reação de Fenton, é incapaz de oxidar diretamente DNA ou lipídeos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa. Ele reage

com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica (Vasconcelos et al., 2007). O $\text{OH}^\bullet$ é uma espécie reativa de oxigênio que pode ser formada pelas reações de H_2O_2 com íons metálicos, principalmente aquelas que envolvem sais de ferro (Fe^{2+}) devido ao seu favorecimento termodinâmico (reação de fenton) e a partir da fissão homolítica do ONOO^- em sua forma prontonada (ONOOH); através de uma fissão homolítica do H_2O_2 induzida pela luz solar ou por uma fonte de UV em baixo comprimento de onda em laboratório (Alvarez & Radi, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2007). O $\text{OH}^\bullet$ destaca-se ainda quanto à sua variabilidade de reação com não radicais através de: abstração de um átomo de hidrogênio; adição de grupamento hidroxila ou transferência de elétrons; e por não possuir permeabilidade as membranas celulares. Estima-se que o dano celular provocado pela mesma ocorra próximo aos seus locais de formação (Powers & Jackson, 2008).

Classificada como uma Espécie Reativa de Nitrogênio (ERN) (Vasconcelos et al., 2007), o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é sintetizado nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

O peroxinitrito (ONOO^-) é um agente oxidante relativamente forte, que pode causar depleção de grupos tióis, nitração de proteínas e danos ao DNA. Formado da reação espontânea entre os radicais $^\bullet\text{O}_2^-$ e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), estima-se que sua formação sempre ocorra na presença de ambos, uma vez que a velocidade desta reação é aproximadamente três vezes maior que a velocidade de dismutação do íon superóxido (Powers & Jackson, 2008; Radak et al., 2008). A reação do peroxinitrito com alvos moleculares ocorre em três formas: reação direta com aminoácidos tais como cisteína, triptofano e metionina; reação com centros metálicos de forma monovalente e através de radicais derivados (carbonato de dióxido de nitrogênio), além de hidroxila. Se tais reações não ocorrem, o peroxinitrito é rapidamente prontonado a ácido peroxinitroso, o qual pode reagir com um metal de forma bivalente ou sofrer uma fissão homolítica e originar dois radicais livres (Alvarez & Radi, 2003).

2.8. Antioxidantes

Devido principalmente as descobertas sobre os efeitos dos radicais livres no organismo, tem-se observado um enorme interesse no estudo de antioxidantes (Barreiros et al., 2006). De acordo com Halliwell (2000) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Os antioxidantes produzidos pelo corpo ou

absorvidos na dieta são fundamentais no combate ao excesso de radicais livres no organismo (Barreiros et al., 2006). Tanto a utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta quanto os sintéticos funcionam como mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de cosméticos, bebidas, alimentos e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (Doroshov, 1983; Halliwell et al., 1995; Weijl et al., 1997).

Em condições normais, os sistemas antioxidantes controlam os níveis das espécies reativas (ER), protegendo as células contra excessiva exposição aos radicais livres (RL) através da diminuição na sua formação e biodisponibilidade; conversão a biomoléculas menos ativas; ou pela substituição de biomoléculas a serem oxidadas. Essas defesas antioxidantes são formadas por vitaminas, tióis protéicos ou não protéicos e enzimas (Blokhina et al., 2003; Halliwell & Gutteridge, 2007; Powers & Jackson, 2008; Radovanovic et al., 2009).

Os agentes antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos ou não-enzimáticos (Sies, 1993). O corpo produz antioxidantes que agem enzimaticamente, a exemplo da SOD, CAT e GPx (Finkel & Holbrook, 2000) ou, não enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH₂. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o *α*-tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (Pietta, 2000; Halliwell et al., 1995).

São diferentes os níveis de atuação dos antioxidantes na proteção dos organismos. O mecanismo de defesa inicial contra os radicais livres é o impedimento de sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. A interceptação dos radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas impede os ataques dos RL aos lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides também são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado à remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações, pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (Bianchi & Antunes, 1999).

O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (Barnett & King, 1995).

Além dos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância e o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de RL (Pompella, 1997).

Embora os estudos sobre antioxidantes ressaltem o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças, o sinergismo entre uma grande variedade de substâncias encontradas nos alimentos pode atuar na proteção de células e tecidos (Jacob, 1995; Niki et al., 1995; Hercberg et al., 1998). O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é freqüentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (Gey, 1998).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros tecidos ou sistemas (Halliwell et al., 1995).

2.8.1. Antioxidantes enzimáticos

Um grupo de enzimas oxirredutases conhecidas como Superóxido Dismutases (SOD) é a primeira e principal forma enzimática de defesa celular contra algumas espécies reativas de oxigênio (EROS) (Fridovich, 1999). O combate à produção de ERO ocorre por meio da dismutação do ânion superóxido em O_2 e H_2O_2 , reação catalisada por esse grupo de enzimas. A SOD é classificada de acordo com os tipos de cofatores metálicos presentes em seu sítio ativo, os quais atuam alternadamente como agentes redutores e oxidantes para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Nos mamíferos, existem três isoformas de SOD (SOD1 [CuZnSOD]; SOD2 [MnSOD]; SOD3 [ecSOD]), e cada uma é um produto de genes distintos e localização subcelular diferente, mas catalisam a mesma reação (Fridovich, 1989; Fukai & Ushio-Fukai, 2011; Halliwell & Gutteridge, 2007; Abreu & Cabelli, 2010).

A matriz mitocondrial contém uma forma específica de SOD, com o manganês no sítio ativo (Fridovich, 1995), que elimina o O_2^- formado na matriz ou no lado interno da membrana

interna. A expressão de MnSOD é ainda induzida por agentes que causam o estresse oxidativo, incluindo a radiação e hiperoxia, num processo mediado pela ativação oxidativa do fator nuclear de transcrição NFkB (Oberley et al., 1987; Das et al., 1995; Warner et al. 1996; Tsan et al. 2001; Murley et al. 2001).

A concentração em estado estacionário de O_2^- no espaço intermembranar é controlada por três mecanismos diferentes. Em primeiro lugar, este compartimento contém uma isoforma de SOD diferente, que contém cobre e zinco no lugar de manganês (CuZnSOD) (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001) e é também encontrada no citoplasma de células eucarióticas. Em segundo lugar, o espaço intermembranar contém citocromo C, que pode ser reduzido pelo O_2^- (Butler et al., 1975) regenerando oxigênio no processo. O citocromo c reduzido pode então transferir elétrons para a oxidase terminal. Assim, alguns dos elétrons que escaparam da cadeia respiratória produzindo O_2^- pode voltar a reduzir citocromo c e ainda contribuir para a produção de energia, fornecendo a energia necessária para bombear H^+ através do Complexo IV. Finalmente, a dismutação espontânea de O_2^- no espaço intermembranar é facilitado pelo baixo pH neste compartimento, resultante da extrusão de H^+ acoplado a respiração (Guidot et al., 1995).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. A catalase também tem função na destoxificação de diferentes substratos, ex. fenóis e alcoóis, via redução acoplada do peróxido de hidrogênio. Um papel antioxidativo da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton. Para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase se liga ao NADPH (Ferreira & Matsubara, 1997; Nordberg & Arnér, 2001).

A catalase (CAT) é uma enzima localizada principalmente em peroxissomas de células de mamíferos onde, juntamente com β -nicotinamida adenina dinucleótido reduzido 2'fosfato (NADPH), que a protege da inativação e aumenta a sua eficiência, catalisa a dismutação do H_2O_2 para água (H_2O) e O_2 . Também cumpre a função de destoxificar outros substratos, tais como fenóis e alcoóis, mediante uma via de redução acoplada ao H_2O_2 , e tem atribuído a ela um papel antioxidante de grande importância ao diminuir o nível de H_2O_2 , reduzindo conseqüentemente o risco de formação de OH por reação Fenton (Martínez et al., 2011). Na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada pela enzima CAT, ocorrem duas reações entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com o grupo ferro heme, constituído por um anel orgânico com um átomo de ferro no seu centro catalítico e capaz de realizar ligações com o oxigênio (Fridovich, 1999).

Na primeira reação, o peróxido de hidrogênio irá oxidar o grupo ferro heme contido em uma das subunidades da enzima alterando conseqüentemente o estado fundamental da mesma, onde teremos a formação de uma radical porfirina (Por) de carga positiva ligado ao (Fe) e ao (O), chamado de composto I (Cpd I) e a liberação de uma molécula de H_2O . Cpd I é um potente oxidante e na segunda reação o mesmo atuará oxidando uma molécula de H_2O_2 , restabelecendo o estado fundamental da enzima, liberando O_2 e formando mais uma molécula de H_2O (Kirkman & Gaetani, 2007).

Um dos sistemas antioxidantes mais importantes em animais superiores é o sistema das glutations. O sistema é constituído por três enzimas, Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione reductase (GR) e a Glutathione-S-Transferase (GST), e ainda a glutathione reductase (GSH) que é um tiol intracelular. Tem como objetivo a detoxificação de agentes tóxicos provenientes do estresse oxidativo ou de fatores exógenos tóxicos (Circu & Aw, 2008; Fridovich, 1999; Halliwell & Gutteridge, 2007). As peroxidases constituem uma família que utiliza uma variedade de agentes, tais como: ascorbato; ferrocitocromo c; tioredoxina; NADH e glutathione, para reduzir H_2O_2 à H_2O , porém sua atividade é relativamente baixa quando comparada a catalase. Como exemplos, temos a Glutathione peroxidase, a Tioredoxina peroxidase e a Citocromo c peroxidase (Fridovich, 1999; Chance et al., 1979).

O peróxido de hidrogênio, o produto da dismutação O_2 é o precursor principal do OH na presença de metais de transição reduzidos, é principalmente decomposto pela enzima glutathione peroxidase. No fígado, as mitocôndrias são responsáveis por cerca de um terço do total da atividade da glutathione peroxidase (Chance et al. 1979).

Glutathione peroxidase, descrita inicialmente por Mills (1957), não tem sido encontrada em plantas superiores ou bactérias. A atividade enzimática de GSH-Px é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (Meister & Anderson, 1983; Cohen & Hochstein, 1963). A enzima glutathione peroxidase possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. O selênio foi caracterizado como um componente essencial da enzima (Rotruck et al., 1973) e a forma do selênio na enzima, presente em fígado de rato, foi identificada em 1978 como uma selenocisteína (Forstrom et al., 1978). A deficiência de selênio no organismo, um nutriente essencial, apresenta uma diminuição na atividade desta enzima em sua forma reduzida, e tem sido associada com alterações no metabolismo celular (Ip et al., 1991; Foster & Sumar, 1997). Plecko et al., (1999) determinou a distribuição de selênio em plasma humano por cromatografia líquida, onde as maiores frações deste elemento encontram-se associadas junto

à enzima GSH-Px e albumina. Neste sentido, um controle dos níveis de glutathiona (GSH) torna-se importante, já que níveis normais de GSH em células de mamíferos estão na faixa de 0,5 a 10 mmol L⁻¹.

A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos (ex: peróxidos de lipídeos na membrana celular) para seus álcoois correspondentes, convertendo GSH a GSSG (Ferreira & Matsubara, 1997; Nordberg & Arnér, 2001).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis, convertendo glutathiona (GSH) à glutathiona oxidada ou glutathiona dissulfeto (GSSG) (Shan et al., 1990). Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, in vitro ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (Hebbel, 1986). Em modelo de hemocromatose experimental foi demonstrada redução de 36% na atividade da GSHPx em fígado de ratos (Galleano & Puntarulo, 1994).

Uma segunda glutathiona peroxidase associada com a membrana mitocondrial, conhecido como fosfolípido-hidroperóxido de glutathiona peroxidase, está especificamente envolvido na redução peróxidos lipídicos associados com a membrana (Ursini et al., 1999; Nomura et al., 2000).

Quatro diferentes tipos de glutathiona peroxidases são conhecidas (GPx1 a 4), dentre as quais a fosfolípido hidroperóxido glutathiona peroxidase (PHGSH-Px) também consegue promover a redução de hidroperóxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando os peróxidos estão presentes na membrana celular (Lehmann et al., 1998).

Foi descoberta que a GPx4 tem dupla função na célula espermática: é enzimaticamente ativa na espermátide e insolúvel funcionando como uma proteína estrutural, no espermatozóide maduro. Uma variante da GPx4 diferindo no N-terminal é também, específica do núcleo do espermatozóide onde participa na condensação da cromatina espermática (Nordberg & Arnér, 2001). Segundo Imai & Nakagawa (2003) a GPx4 pode reagir com peróxido de hidrogênio e uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios sendo, portanto, considerada responsável pela proteção da membrana contra os danos oxidativos.

Outra enzima que age conjuntamente com a *glutathiona peroxidase* é a enzima *glutathiona redutase* (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radiculares, porém é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (Meister & Anderson, 1983).

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (Hebbel, 1986). A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (Gilbert & Lean, 1990). Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (Frischer & Ahmad, 1987). A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (Ross & Moldeus, 1991). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd (Shan et al., 1990).

As enzimas glutathione transferases, também conhecidas como glutathione S transferases ou GSTs, fazem parte de três grandes famílias de proteínas: citosólicas, mitocondriais e microssomais ou associadas a membranas, onde as GSTs citosólicas constituem a maior família. Envolvidas no metabolismo de fármacos, sua principal função metabólica é proteger a célula contra agentes tóxicos tanto endógenos quanto exógenos. A capacidade de metabolizar vários substratos através de reações com a glutathione no seu estado reduzido (GSH), ela detoxifica diferentes compostos eletrofílicos, reduzindo ou até mesmo inibindo os danos causados por essas espécies a componentes celulares como ácidos nucleicos e proteínas (Litwack et al., 1971; Habig et al., 1974; Laborde, 2010; Raza, 2011).

Os avanços na biologia molecular das GSTs ao longo dos últimos anos têm revelado um papel mais amplo para estas enzimas. As GSTs estão envolvidas na biossíntese e metabolismo de prostaglandinas (Beuckmann et al., 2000), esteróides (Johansson & Mannervik, 2001), e leucotrienos (Anuradha et al., 2000); no controle de produtos tóxicos oriundos da oxidação de lipídeos e de proteínas S-glutathiolated geradas pelo estresse oxidativo (Alin et al., 1985; Awasthi et al., 2004; Listowsky, 2005); e na aquisição de resistência a agentes quimioterápicos (Tew, 1994; Hayes & Pulford, 1995; Lo & Ali-Osman, 2007). Recentemente, foi demonstrado que várias isoenzimas de GST modulam as vias de sinalização de células que controlam a proliferação e a morte celular (apoptose) (Adler et al., 1999; Ruscoe et al., 2001; Cho et al., 2001; Ryoo et al., 2004; Romero et al., 2006). Por apresentar um papel citoprotetor e envolvimento no desenvolvimento de resistência aos agentes anticancerígenos, GSTs tornaram-se alvos de drogas (Laborde, 2010).

A glutathione reduzida (GSH, L- γ -glutamyl-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (Meister & Anderson, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da

célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (Galleano & Puntarulo, 1994), oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta (Deneke & Fanburg, 1989). Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão (Shan et al., 1990); atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (Deneke & Fanburg, 1989). Uma alteração nos níveis de Glutathione em direção ao seu estado oxidado indica um desequilíbrio entre os elementos pro-oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros.

O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevivência de 90% de ratos submetidos à hiperoxia e tratados com instilação de eritrócitos na traquéia. Este resultado foi atribuído à GSH intra-eritrocitária, que protege contra o “pulmão de choque” induzido pelo estresse oxidativo resultante da hiperoxia (van Asbeck, 1985).

Quando comparado ao grupo controle, o nível de GSH está aumentado em pacientes com diabetes melito tipo II tratados com sulfoniluréia; é possível que isto se relacione com a disponibilidade de grupamentos -SH presentes no medicamento (Matsubara et al., 1992).

2.8.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. Fazem parte do sistema não enzimático, um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipóico (Nordberg e Arnér, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathionas, betacaroteno e caroteno (Maia, 2006). Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Ferreira & Matsubara, 1997).

A vitamina E ou α -tocoferol é uma vitamina lipossolúvel presente nas membranas biológicas. Ela contém um grupo hidroxila através do qual ela rege com elétrons desemparelhados, podendo assim, reduzir radicais peroxil (Nordberg & Arnér, 2001). Segundo Halliwell & Gutteridge (1999) a vitamina E é provavelmente, o mais importante (mas não o único), inibidor da reação em cadeia da peroxidação de lipídeos em animais.

Confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro (Ross & Moldeus, 1991; Hebbel, 1986).

Os carotenóides destacam-se também como agentes antioxidantes, dentre os quais a pró-vitamina A (β -caroteno), pigmento responsável pela cor característica da cenoura, é o carotenóide mais abundante e de maior atividade. Estudos recentes indicam uma possível atividade anticancerígena do β -caroteno, sendo usado como corante e antioxidante em alimentos (Burton, & Ingold, 1984). Especificamente, o β -caroteno exibe uma boa capacidade de captura de radicais livres somente a pressões parciais normais de oxigênio no ar, comumente encontrada na maior parte dos tecidos biológicos sob condições fisiológicas (Cardoso, 1997).

O ácido ascórbico (Vitamina C) ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. Ele reduz o α -tocoferol, peróxidos e ROS, como superóxido. Esta vitamina serve principalmente, para prevenir a formação de hidroperóxido de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas. Também protege lipídeos nas membranas celulares. O ascorbato atua juntamente com GSH para proteger a célula dos danos oxidativos (Nordberg & Arnér, 2001). Porém, quando em dose elevada ou na presença de metais (ferro ou cobre) a vitamina C pode agir como um pró-oxidante, levando à lipoperoxidação. In vitro, tanto a mistura Cu-ascorbato como Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos, causados por radicais livres, ao DNA, lipídios e proteínas (Ferreira & Matsubara, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999).

O ácido α -lipóico (ALA - nome químico: ácido 1,2 ditiolano-3-valérico ou ácido 6,8-ditio-octanoico) é um composto natural conhecido por suas complexas propriedades antioxidantes (Moini et al., 2002; Bilska e Wlodek, 2005; Guibu et al., 2009). O ALA pode ser obtido a partir da dieta e pela síntese mitocondrial (Teichert et al., 2005). O ALA exógeno é rapidamente absorvido e transportado para o compartimento intracelular, sendo reduzido a ácido dihidrolipóico (DHLA). O processo de redução resulta em dois grupos tiol livres, que são responsáveis pelo efeito antioxidante superior da forma reduzida (DHLA) em comparação com a forma oxidada (ALA) (Guibu et al., 2009).

ALA e DHLA parecem ser uma dupla antioxidante ideal devido a várias de suas propriedades: i) têm a capacidade de sequestrar algumas espécies reativas, (ii) podem reduzir as formas oxidadas do ácido ascórbico, glutatona e coenzima Q10, que são capazes de regenerar o tocoferol oxidado, formando uma rede antioxidante, e (iii) ambos têm atividade quelante de metal (Packer et al., 1995; Biewenga et al., 1997). A capacidade do ALA de

atravessar a barreira hematoencefálica também é uma vantagem porque o cérebro é um importante alvo para a intoxicação por chumbo (Gurer et al., 1999).

Atualmente, apenas a forma oxidada (ALA) é utilizada (Melli et al., 2008). Vários estudos têm mostrado que o ALA exerce múltiplas ações farmacológicas capazes de prevenir a degeneração nervosa em modelos experimentais de doenças como diabetes (Vincent et al., 2005), Parkinson (Bharat et al., 2002), Alzheimer (Abdul e Butterfield, 2007) e síndrome metabólica (Guibu et al., 2009). Ele também inibe o estresse oxidativo na infecção por HIV em estudos experimentais (Packer et al., 1995) e reduz danos decorrentes de isquemia e reperfusão no sistema nervoso central e sistema cardiovascular em estudos com animais (Cao e Phillis, 1995; Freisleben, 2000).

A relação inversa entre o consumo de frutas e hortaliças e a incidência de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), como câncer e doenças cardiovasculares, já era conhecida há aproximadamente dois mil anos, apesar dos primeiros estudos epidemiológicos datarem da década de 1930 (Williamson, 1996). Frutas e hortaliças, além de fornecerem componentes importantes para desempenharem funções básicas do organismo como, por exemplo, ácido ascórbico, betacaroteno e ácido fólico, são fontes de compostos bioativos diretamente associados à prevenção de doenças. Os fenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância (Arts & Hollman, 2005).

2.9. Polifenóis

Uma das características mais importantes das plantas é sua capacidade de sintetizar uma variedade de compostos com baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, que apresentam um papel essencial ou não ao metabolismo vegetal. Em torno de 20 a 30% dos vegetais superiores têm sido investigados quanto aos seus constituintes do metabolismo secundário, permitindo a elucidação da estrutura química de cerca de 50.000 compostos (De Luca & St Pierre, 2000).

Durante muito tempo acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produtos finais das reações e/ou erros do metabolismo, sem uma função específica. Esta visão vem mudando à medida que descobertas sobre a função desses compostos, principalmente em relação aos processos de desenvolvimento vegetal, e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos têm sido alcançadas (Rockenbach, 2008).

Algumas hipóteses são levantadas para explicar esses efeitos benéficos que estão associados com o aumento do consumo desses alimentos. A presença de compostos com efeitos protetores contra as doenças em frutas e vegetais, independente dos nutrientes e micronutrientes já conhecidos, é uma das hipóteses. Um grande grupo de antioxidantes naturais presentes em uma dieta rica em vegetais e frutas, e classificados como polifenóis, são os possíveis compostos portadores dos efeitos protetores (Arts & Hollman, 2005). Esta associação se dá, principalmente, pela composição química natural desses alimentos.

Os compostos fenólicos, produto do metabolismo secundário de plantas, são amplamente encontrados em plantas e constituem um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina. Os compostos fenólicos, em plantas, são fundamentais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação (Shahidi & Naczk, 1995). Em alimentos, são responsáveis pela adstringência, cor e aroma (Peleg et al., 1998) e estabilidade oxidativa (Naczk & Shahidi, 1994).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização e estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, além disso, estes compostos se formam em condições de estresse, como infecções, fermentos, radiações UV, dentre outras (Bravo, 1998; Naczk e Shahidi, 2004). São compostos bioativos, ou seja, constituintes extranutricionais que ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos e possuem efeitos para a saúde (Kris-Etherton et al., 2002).

De acordo com as classificações de Harborne (1989; 1999) estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes. Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (King, 1999).

Quimicamente, os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (Croteau, 2000). Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais (Angelo & Jorge 2007). Os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos, através de um ou mais dos grupos fenólicos, e podem também ocorrer como derivados funcionais, como ésteres e metil ésteres. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Existem cerca de 8.000 diferentes compostos fenólicos, que de acordo com sua estrutura química são divididos em classes:

ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos. Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como componentes da dieta estão principalmente os ácidos fenólicos e flavonóides (Balasundram et al., 2006). Este último grupo é o maior e mais estudado, possuindo mais de 5.000 compostos identificados, e tem como principais fontes frutas e hortaliças, chás, cacau, soja, dentre outros (Ross & Kasum, 2002).

Os polifenóis apresentaram vários efeitos interessantes em modelos de experimentação *in vivo* e em sistemas *in vitro*; eles interceptam e eliminam os radicais livres, regulam a liberação do óxido nítrico, diminuem a imobilização dos leucócitos (facilitam o combate a infecções), induzem a apoptose (morte programada de células doentes), inibem a proliferação celular e angiogênese (combate a tumores) e exibem atividades fitoestrogênica (Higdon & Frei, 2003; Yang et al., 2001; Nijveldt et al., 2001; Adlercreutz & Mazur., 1997).

Várias propriedades químicas e efeitos biológicos dos polifenóis na dieta podem estar envolvidos na proteção contra o risco cardiovascular. Uma hipótese óbvia é a de que as propriedades antioxidantes dos polifenóis podem proteger os vasos sanguíneos das consequências deletérias do estresse oxidativo associado com muitos, se não todos os fatores de riscos cardiovasculares (Stoclet et al., 2004). Segundo essa hipótese, os polifenóis produziram uma ação antioxidante direta por meio de suas interações com ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidróxi e peróxi (Hu et al., 1995; Nijveldt et al., 2001).

Um fenômeno importante é que, após a absorção, os polifenóis estão sujeitos a metabolismo de fase II, produzindo compostos metoxilados, glucoronidados, e sulfatados (Hollman & Arts, 2000). Isso pode influenciar muito a sua bioatividade, mas poucos estudos nesse sentido foram desenvolvidos até o momento. Além disso, as bactérias presentes no cólon humano metabolizam polifenóis em uma variedade de ácidos fenólicos (Olthof et al., 2003), que tem como consequência uma elevação da concentração desses metabólitos aos quais os tecidos do corpo ficam expostos.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas de oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos incluem-se na segunda classe segundo a classificação de Moreira & Mancini-Filho (2004).

Adegoke et al. (2008) classificou os antioxidantes em primários e secundários dependendo do seu modo de ação. Os antioxidantes primários atuam na interrupção da cadeia

da reação doando elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo diretamente com os radicais livres, formando o complexo lipídeo-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singleto.

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (Decker, 1998). O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (Shahidi et al., 1992; Jadhav et al., 1995).

As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas a exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos (Pimentel et al., 2005).

Os ácidos fenólicos são compostos simples formados por um anel aromático e os substituintes ligados à sua estrutura, conferindo capacidade de seqüestrar espécies reativas, como o radical hidroxila e o oxigênio singleto (Marinova & Yanishlieva, 2003). Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (Soares, 2002). Consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico, que têm estrutura comum, C6–C1 (Balasundram et al., 2006); enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns (Bravo, 1998).

Os ácidos sinápticos, ferúlico e p-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido protocatecuico, sirínico e vanílico

(Balasundram et al., 2006). Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (Wanasundara et al., 1994).

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (Soares, 2002).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número e posição de grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila. Ácidos monohidroxibenzóicos com o grupo OH ligado nas posições *orto* ou *para* em relação ao grupo COOH não apresentam atividade antioxidante, porém, isso não acontece para o ácido *m*-hidroxibenzóico. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, como é o caso do trihidroxilado ácido gálico, que apresenta alta atividade antioxidante. Em contrapartida, a substituição dos grupos hidroxila nas posições 3 e 5 por grupos metoxila, como no caso do ácido sirínico, reduz a atividade. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes. Isso pode ser devido ao grupo CH=CH-COOH, que garante maior habilidade de doar íons H⁺ e estabilizar radicais que o grupo COOH (Balasundram et al., 2006).

Diversos autores realizaram estudos visando verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos, largamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por chegarem a aumentar a vida útil de muitos produtos entre 15 e 200% (Durán & Padilla, 1993).

A prevenção do DM tem sido associada com a ingestão de frutas, vegetais ou plantas ricas em antioxidantes naturais. Compostos polifenólicos derivados de plantas possuem uma vasta gama de propriedades farmacológicas e o estudo do seu mecanismo de ação tem sido objeto de grande interesse nos últimos anos. Neste contexto, o ácido gálico tem recebido muita atenção devido à sua potente eliminação de radicais livres e ação antioxidante. O ácido gálico (ácido 3,4,5- trihidroxibenzóico) (Figura 1), é um ácido fenólico endógeno de plantas, encontrado em abundância no chá, uvas, frutas vermelhas, frutas diferentes, assim como o vinho (Ma et al., 2003; Singh et al., 2004). Ele apresenta ação antiinflamatória (Kroes et al., 1992), anticancerígena (Inoue et al., 1995) e um potente efeito antioxidante (Kim et al., 2002).

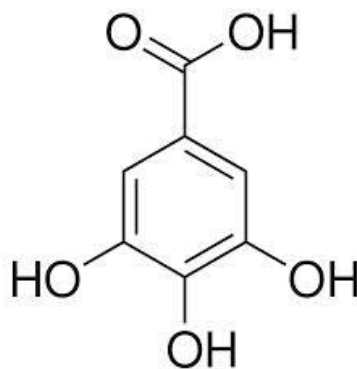


FIGURA 1. Estrutura do ácido gálico (ácido 3,4,5- trihidroxibenzóico).

As atividades biológicas e farmacológicas dos derivados de ácido gálico, incluem a eliminação de radicais livres (Dwibedy, Kishore, & Moorthy, 1999), induzem a apoptose de células cancerosas (Saeki et al., 2000) e da inibição da enzima esqualeno epoxidase (Abe, Seki, & Noguchi, 2000).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) e seus derivados são fortes antioxidantes naturais presentes em muitas frutas (uva, morango, banana, framboesa, acerola etc) e legumes, que são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica e de alimentos. As atividades biológicas e farmacológicas dos derivados de ácido gálico, incluem a eliminação de radicais livres (Dwibedy, Dey, Naik, Kishore, & Moorthy, 1999), induzem a apoptose de células cancerosas (Saeki et al., 2000) e da inibição de esqualeno epoxidase (Abe, Seki, & Noguchi, 2000).

A importância da prevenção primária do diabetes é cada vez mais reconhecida, e isso tem estimulado o interesse no papel de fatores dietéticos na etiologia da doença. Revisões bibliográficas têm mostrado que não há uma quantidade significativa de dados científicos disponíveis sobre os efeitos do ácido gálico em relação aos efeitos deletérios do Diabetes mellitus. Nossa hipótese é de que o efeito antioxidante do ácido gálico protege os vasos sanguíneos dos danos causados pelo estresse oxidativo excessivo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito protetor do ácido gálico sobre a disfunção endotelial de ratos Wistar diabéticos induzidos por estreptozotocina.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da administração por via oral do ácido gálico sobre a glicemia de ratos diabéticos;
- Avaliar os efeitos da administração por via oral do ácido gálico sobre o consumo de água e ração e o ganho de massa corporal de ratos diabéticos;
- Investigar os efeitos da administração por via oral do ácido gálico sobre a contração induzida por fenilefrina e no relaxamento produzido por acetilcolina e nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com idade de 2-3 meses e pesando 280 – 320g, oriundos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 26^{\circ}\text{C}$) e receberam água e ração (Labina[®], Purina, Brasil) *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPE (Processo nº. 23076.039996/2012-15).

4.2. Indução ao *Diabetes mellitus* (DM)

O DM foi induzido usando estreptozotocina (STZ) fornecida pela Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA. referência S0130-5g, lote SLBB7526V e PCode 1001498713. Os animais não foram submetidos a prévio jejum e o diabetes foi induzido por única injeção via intraperitoneal de uma solução recém-preparada de STZ (50 mg/kg) diluída em tampão citrato frio 0,1 M (pH = 4,5) no volume de 1 mL/kg de massa corporal (Nakhoda & Wong, 1979). Após a administração da STZ os animais receberam solução de glicose (5%) por um período de 48h. No terceiro dia após a indução, os animais que apresentaram glicemia de jejum ≥ 200 mg/dL e mostravam sinais de poliúria e polidipsia foram considerados diabéticos e incluídos no estudo (Vasconcelos et al., 2011). A glicemia foi verificada através de amostras de sangue obtidas da veia caudal utilizando aparelho monitor de glicemia (Accu-Chek[®] Active, Roche Diagnostics GmbH-Alemanha).

4.3. Animais diabéticos

4.3.1. Tratamento

Os animais foram alocados aleatoriamente em 5 grupos (n=10/grupo): O GI - Animais normoglicêmicos (Normog) tratados com veículo (água); GII - Animais diabéticos controles (DC) tratados com veículo (água); GIII - Animais diabéticos tratados com metformina (500

mg/kg, padrão) (DTM) solubilizada em água; GIV e V - Animais diabéticos tratados com ácido gálico (60 e 80 mg/kg) (AG) solubilizado em água.

O ácido gálico administrado foi fornecido pela Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA. referência G7384-100g, lote 071M0031V, data de fabricação 10/08/2011, data de validade 18/12/2016, peso molecular 170.12 g/mol e PCode 1001280596. O ácido gálico foi acondicionado em sua embalagem original, submetido à temperatura ambiente, protegido da luz, as soluções foram preparadas diariamente e administradas logo em seguida reduzindo o risco de perda de estabilidade química.

As doses 60 e 80 mg/kg/dia de Ácido Gálico selecionadas para o tratamento foram baseadas nos estudos de Latha & Daisy, 2011 e Punithavathi et al., 2011, que avaliaram os efeitos da administração oral do ácido gálico sobre os parâmetros bioquímicos e suas atividades antioxidantes e protetoras em tecidos do fígado e pâncreas. Todos os grupos foram tratados por via oral durante quatro semanas consecutivas a partir da constatação do diabetes.

4.3.2. Efeito da administração oral do ácido gálico sobre a massa corporal, o consumo de água e ração e a glicemia de jejum.

A massa corporal, o consumo de água e ração e a glicemia de jejum foram mensurados três dias antes da indução do diabetes e a cada sete dias durante o período do tratamento.

4.3.3. Estudos in vitro: Isolamento da artéria aorta

Ao término do tratamento os ratos foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia (pentobarbital sódico, 140mg/kg, i.p). A artéria aorta torácica (AT) foi isolada e foram removidos os tecidos conjuntivos e gordura. Anéis de 4 mm de comprimento foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixo à cuba. As respostas foram registradas em um sistema de aquisição (Banho de órgão isolado/ miógrafo/AVS). Os anéis foram incubados em câmaras para órgãos isolados contendo 5mL de solução de Krebs modificado com a seguinte composição (em mM): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), a 37°C. A tensão basal foi de 1,5g e as aortas permaneceram nesta tensão durante uma hora, sendo renovado o líquido nutritivo a cada 15 minutos, para estabilização. Após a estabilização, para alguns tecidos foi realizado o teste da integridade do endotélio pelo uso de

fenilefrina (Fen, $0,1\mu\text{mol/L}$) e quando esta contração se apresentou mantida e estável, foi adicionado à cuba acetilcolina (ACh, $1\mu\text{mol/L}$). Foi considerado que o endotélio estava funcionalmente íntegro quando a acetilcolina produziu relaxamento $\geq 80\%$. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração máxima induzida pela fenilefrina. Após o teste da integridade do endotélio, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas (CCEC) segundo Van Rossum (1963). A partir das curvas concentração-efeito obtidas, foram calculados os parâmetros farmacológicos: Efeito máximo (E_{max}) e pD_2 . O E_{max} representa o máximo efeito produzido por uma droga em determinado tecido, enquanto que a potência do agonista (pD_2) reflete o negativo do logaritmo da concentração que produz 50% do efeito máximo (CE_{50}), calculado pela equação: $\text{pD}_2 = -\log \text{CE}_{50}$.

Protocolos experimentais: Os experimentos descritos abaixo visam a esclarecer se a disfunção endotelial apresentada pelos animais diabéticos pode ser revertida ou minimizada pelo tratamento prolongado com ácido gálico.

4.3.3.1. Efeito do ácido gálico sobre a contração/relaxamento em anéis de aorta torácica.

Foram obtidas em anéis de aorta torácica de todos os grupos, curvas concentração-efeito cumulativas (CCEC) para fenilefrina (agonista α_1) e para os agentes acetilcolina (agonista colinérgico) e nitroprussiato de sódio (doador de NO) que induzem respectivamente relaxamento dependente e independente de endotélio. Para os agentes relaxantes, as curvas foram obtidas a partir de um tônus pré-existente induzido por fenilefrina ($\text{EC}_{50} = 0,1\mu\text{mol/L}$).

4.4. Drogas e Reagentes

Ácido Cítrico Monohidratado; Ácido Gálico (Sigma-Aldrich®) – referência G7384-100g, lote 071M0031V, PCode 10001209642 e validade: 18/12/2016; Bicarbonato de Sódio (Vetec) – lote 1207943 e validade 10/2017; Citrato de Sódio Tribásico Dihidratado (Vetec) – lote 1104121 e validade 5/2016; Cloreto de Acetilcolina (Sigma-Aldrich®) – referência A6625-25g, lote BCBG2401V, PCode 101129123 e validade: 23/01/2018; Cloreto de Cálcio (Alphatec) – lote 22613 e validade 08/2019; Cloreto de Potássio (Química Moderna) – lote 00887 e validade 06/2018; Cloreto de Sódio (Química Moderna) – lote 01960 e validade: 06/2019; Cloridrato de L-Fenilefrina (Sigma-Aldrich®) –

referência P6126-25g, lote 031M1736V, PCode 1001166142 e validade: 18/03/2017; Estreptozotocina (Sigma-Aldrich®) - referência S0130-5g, lote SLBB7526V, PCode 1001498713 e validade: 28/02/2014; Fosfato de Potássio Monobásico (Química Moderna) – lote 00287 e validade 10/2015; Glicose-D Anidra (Nuclear) – lote 13111321 e validade 11/2018; Metformina; Nitroprussiato de Sódio; Sulfato de Magnésio.

4.5. Análise estatística

Os resultados obtidos serão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A diferença entre as médias serão analisadas empregando-se análise de variância (ANOVA), seguida, quando necessário, pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade será estabelecido em $p \geq 0,05\%$. O programa GraphPad Prism 5 será utilizado para análise dos dados e construção dos gráficos.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. O efeito da administração oral do ácido gálico sobre a glicemia de jejum

O efeito do tratamento oral com ácido gálico em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina sobre a glicemia de jejum está representado na Figura 2. Os animais normoglicêmicos (Normog) apresentaram a glicemia de jejum em torno de 95 ± 3 mg/dL. Durante os 28 dias de tratamento, o grupo diabético controle (DC) apresentou um aumento estatisticamente significativo da glicemia de jejum quando comparado com o grupo composto por animais normoglicêmicos. Os grupos tratados com ácido gálico (AG) nas doses de 60 e 80 mg/kg não apresentaram diferenças nos valores da glicemia de jejum quando comparados com o grupo DC. Mas houve diferença quando comparados com o grupo Normog. O grupo tratado com metformina (DTM) apresentou níveis de glicose semelhantes ao do grupo Normog.

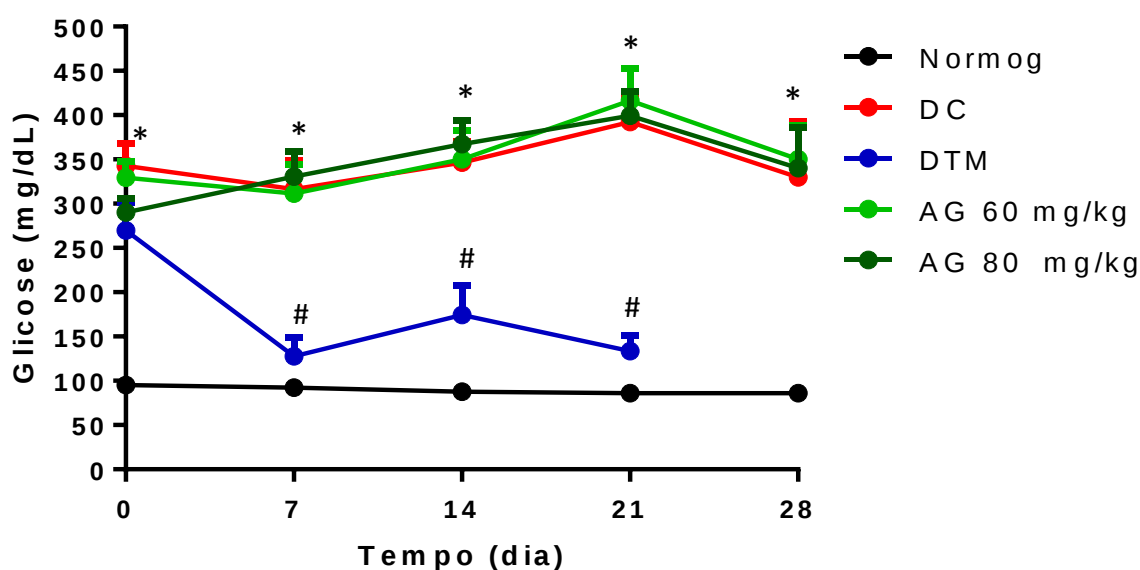


FIGURA 2. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre os níveis de glicose de ratos diabéticos. As curvas representam os níveis de glicose sérica de ratos normoglicêmicos ou diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com água, metformina (500 mg/kg) ou ácido gálico (60 ou 80 mg/kg) por 28 dias. Os pontos representam média $\pm$ e.p.m. de 4-10 animais diferentes. *Diferença estatística em relação ao normoglicêmico; # Diferença estatística em relação ao grupo diabético. (ANOVA, seguida de Newmann-Keuls).

5.2. O efeito da administração oral do ácido gálico sobre o ganho de massa corporal

O efeito do tratamento oral com ácido gálico em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina sobre a massa corporal está representado Figura 3. Após 28 dias de tratamento, o grupo diabético controle (DC) apresentou uma perda da massa corporal significativa quando comparado com o grupo normoglicêmico (Normog). Os grupos de animais diabéticos tratados com ácido gálico (AG) nas doses de 60 e 80 mg/kg apresentaram uma redução da massa corporal quando comparados com o grupo normoglicêmico (Normog), mas não houve diferença entre eles e o grupo diabético controle (DC).

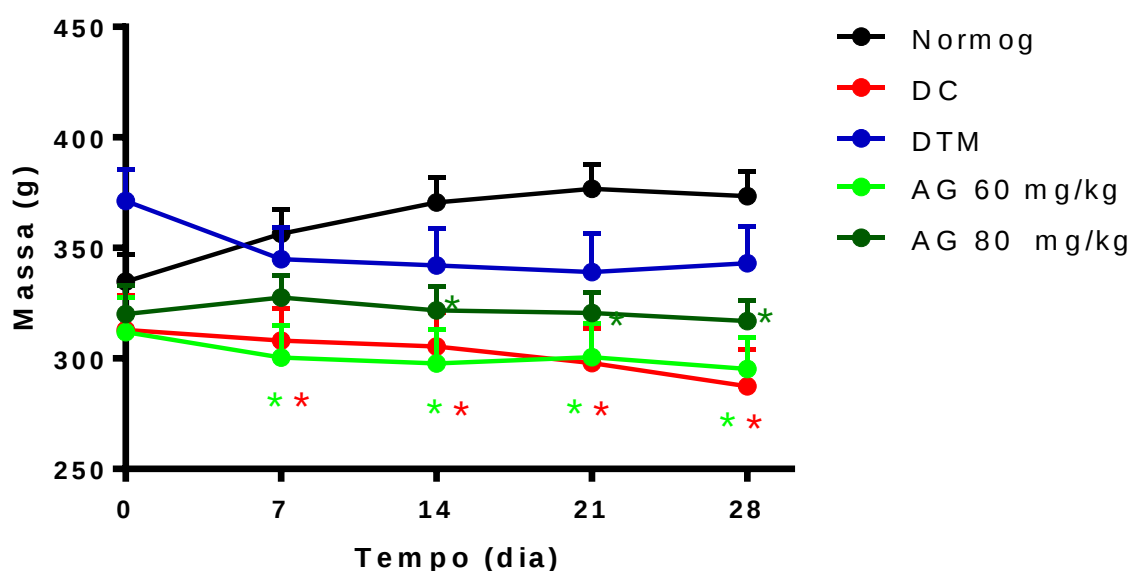


FIGURA 3. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre a massa corporal de ratos diabéticos. As curvas representam a massa de ratos normoglicêmicos ou diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com água, metformina (500 mg/kg) ou ácido gálico (60 ou 80 mg/kg) por 28 dias. Os pontos representam média $\pm$ e.p.m. de 4-10 animais diferentes. *Diferença estatística em relação ao normoglicêmico; # Diferença estatística em relação ao grupo diabético. (ANOVA, seguida de Newmann-Keuls).

5.3. Efeito da administração oral do ácido gálico sobre a ingestão de água

Os efeitos do tratamento oral com ácido gálico em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina sobre o consumo de água estão representados na Figura 4. O grupo diabético controle (DC) apresentou uma elevação na ingestão de água durante todo o tratamento quando comparado com o grupo Normog. O tratamento com AG nas doses de 60 e 80 mg/kg não foi

capaz de reverter este aumento da ingestão de água. O grupo DTM apresentou uma redução significativa no consumo de água ao ser comparado aos grupos DC e AG.

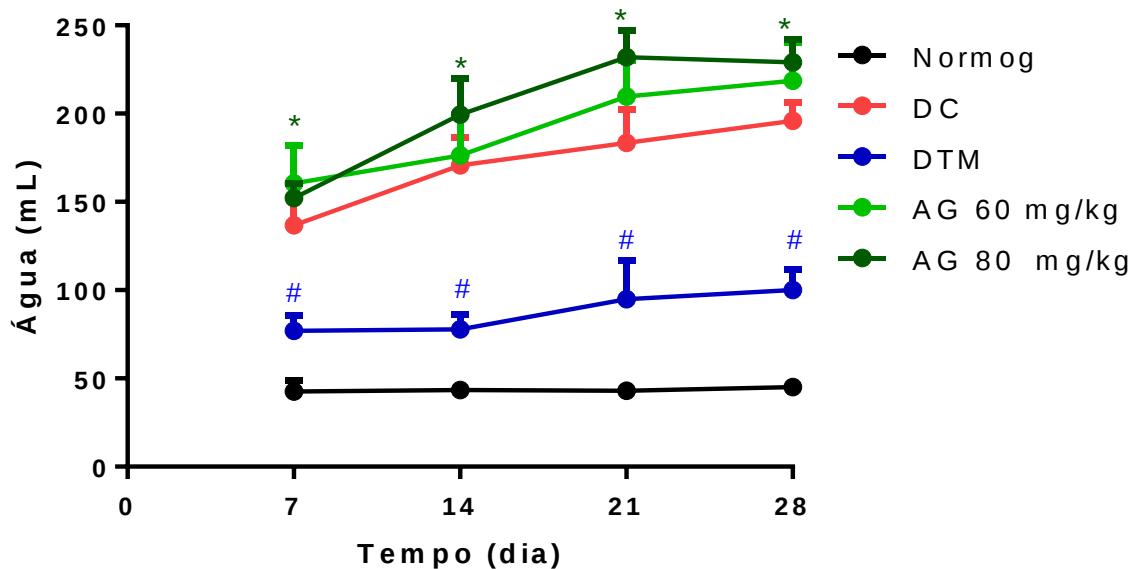


FIGURA 4. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre a ingestão de água de ratos diabéticos. As curvas representam a ingestão de água de ratos normoglicêmicos ou diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com água, metformina (500 mg/kg) ou ácido gálico (60 ou 80 mg/kg) por 28 dias. Os pontos representam média $\pm$ e.p.m. de 4-10 animais diferentes. *Diferença estatística em relação ao normoglicêmico; # Diferença estatística em relação ao grupo diabético. (ANOVA, seguida de Newmann-Keuls).

5.4. Efeito da administração oral do ácido gálico sobre o consumo de ração

Quanto ao consumo de ração, o grupo diabético controle (DC) apresentou um aumento estatisticamente significativo durante as quatro semanas de tratamento quando comparado ao grupo Normog (Figura 5). O tratamento com AG nas doses de 60 e 80 mg/kg não foi capaz de reverter o aumento do consumo de ração. Durante as quatro semanas de tratamento, apenas o grupo AG na dose de 80 mg/kg apresentou aumento no consumo de ração quando comparado com o grupo DTM. Enquanto que os grupos AG na dose de 60 mg/kg e DC apresentaram elevação e diferença significativa na ingestão de ração apenas na segunda e quarta semana de tratamento quando comparados com o grupo DTM. Não ocorreu diferença estatística entre os grupos AG nas doses de 60 e 80 mg/kg e o grupo DC.

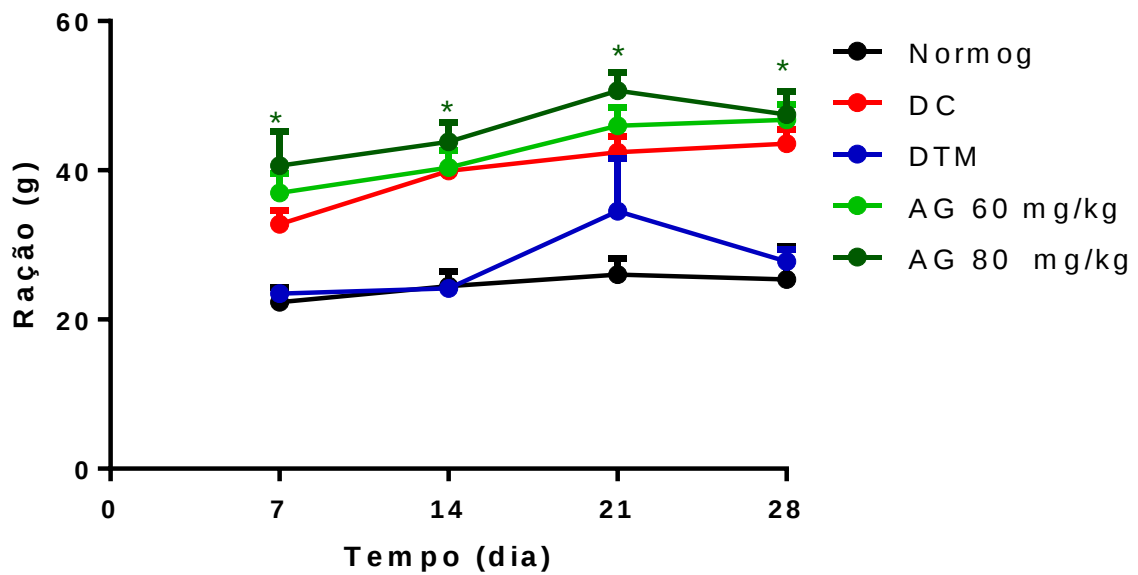


FIGURA 5. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre o consumo de ração de ratos diabéticos. As curvas representam o consumo de ração de ratos normoglicêmicos ou diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com água, metformina (500 mg/kg) ou ácido gálico (60 ou 80 mg/kg) por 28 dias. Os pontos representam média $\pm$ e.p.m. de 4-10 animais diferentes. *Diferença estatística em relação ao normoglicêmico; # Diferença estatística em relação ao grupo diabético. (ANOVA, seguida de Newmann-Keuls).

5.5. Efeito da administração oral do ácido gálico na contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta torácica

Podemos observar na Figura 6, que a resposta contrátil induzida pela fenilefrina foi dependente da concentração e esta resposta foi semelhante em artérias aortas torácicas de ratos dos grupos Normog (E_{max} : $1,74 \pm 0,06g$; pD_2 : $7,06 \pm 0,08$; $n=2$), DC (E_{max} : $2 \pm 0,09g$; pD_2 : $6,91 \pm 0,20$; $n=4$), AG 60 mg/kg (E_{max} : $1,60 \pm 0,02g$; pD_2 : $7,27 \pm 0,21$; $n=3$) e AG 80 mg/kg (E_{max} : $2,14 \pm 0,30g$; pD_2 : $7,42 \pm 0,09$; $n=3$).

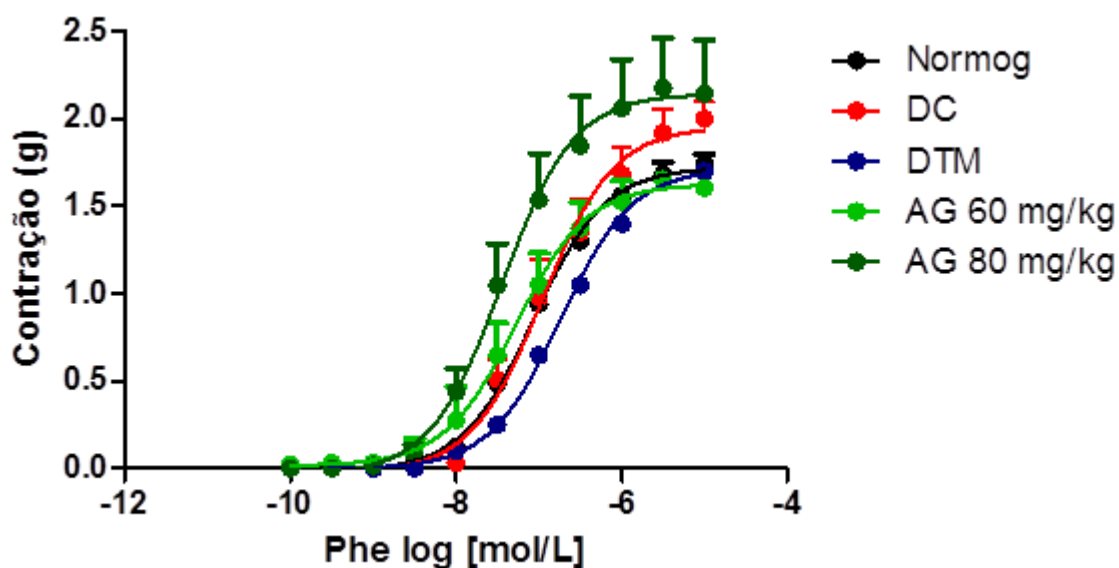


FIGURA 6. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre a contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos diabéticos. As curvas representam a contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta com endotélio de ratos normoglicêmicos ou diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com água, metformina (500 mg/kg) ou ácido gálico (60 ou 80 mg/kg) por 28 dias. Os pontos representam média $\pm$ e.p.m. de 2-4 animais diferentes.

5.6. Efeito da administração oral do ácido gálico no relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta torácica

O relaxamento induzido pela acetilcolina (Figura 7) apresentou diferença no Emax quando comparados os resultados em artérias aortas torácicas de ratos do grupo Normog (Emax: $116,31 \pm 12,43\%$; pD_2 : $7,39 \pm 0,32$; $n=3$) e DC (Emax: $73,89 \pm 8,66\%$; pD_2 : $6,47 \pm 0,37$; $n=4$). Não houve diferença nos resultados apresentados pelos grupos AG 60 mg/kg (Emax: $92,40 \pm 3,17\%$; pD_2 : $7,20 \pm 0,20$; $n=2$) e AG 80 mg/kg (Emax: $93,06 \pm 3,91\%$; pD_2 : $6,96 \pm 0,15$; $n=3$) quando comparados aos demais grupos.

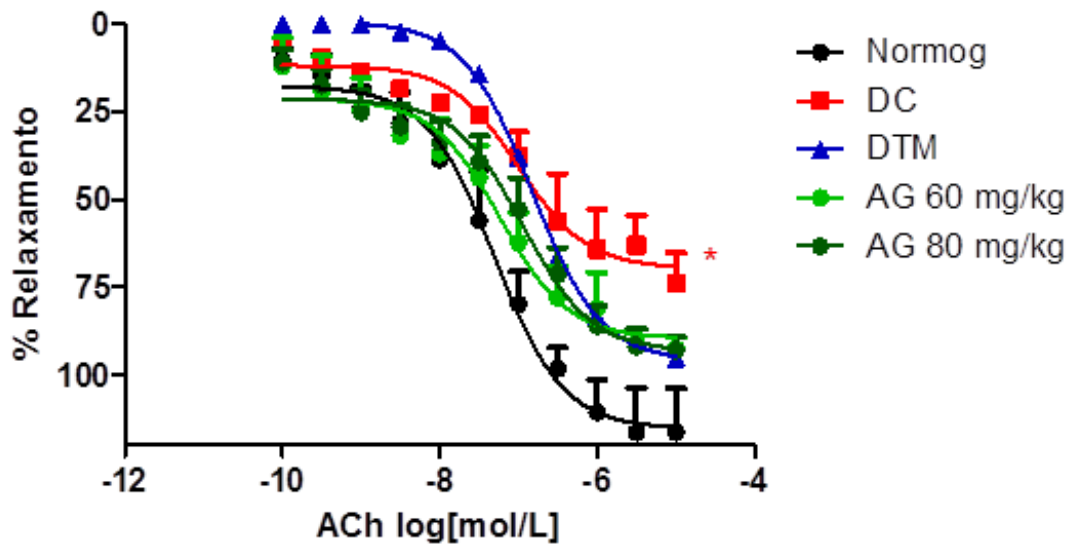


FIGURA 7. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta de ratos diabéticos. As curvas representam o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratos normoglicêmicos ou diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com água, metformina (500 mg/kg) ou ácido gálico (60 ou 80 mg/kg) por 28 dias. Os pontos representam média $\pm$ e.p.m. de 2-4 animais diferentes. *Diferença estatística em relação ao normoglicêmico (ANOVA, seguida de Newmann-Keuls).

5.7. Efeito da administração oral do ácido gálico no relaxamento produzido por nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica

Como visto na Figura 8, o relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) foi semelhante em artérias aortas torácicas de ratos Normog (E_{max} : $104,13 \pm 1,57\%$; pD_2 : $8,57 \pm 0,023$; $n=2$), DC (E_{max} : $101,15 \pm 1,15\%$; pD_2 : $8,28 \pm 0,00$; $n=2$), AG 60 mg/kg (E_{max} : $101,25 \pm 1,25\%$; pD_2 : $8,76 \pm 0,57$; $n=2$) e AG 80 mg/kg (E_{max} : $101,78 \pm 0,41\%$; pD_2 : $8,06 \pm 0,13$; $n=3$).

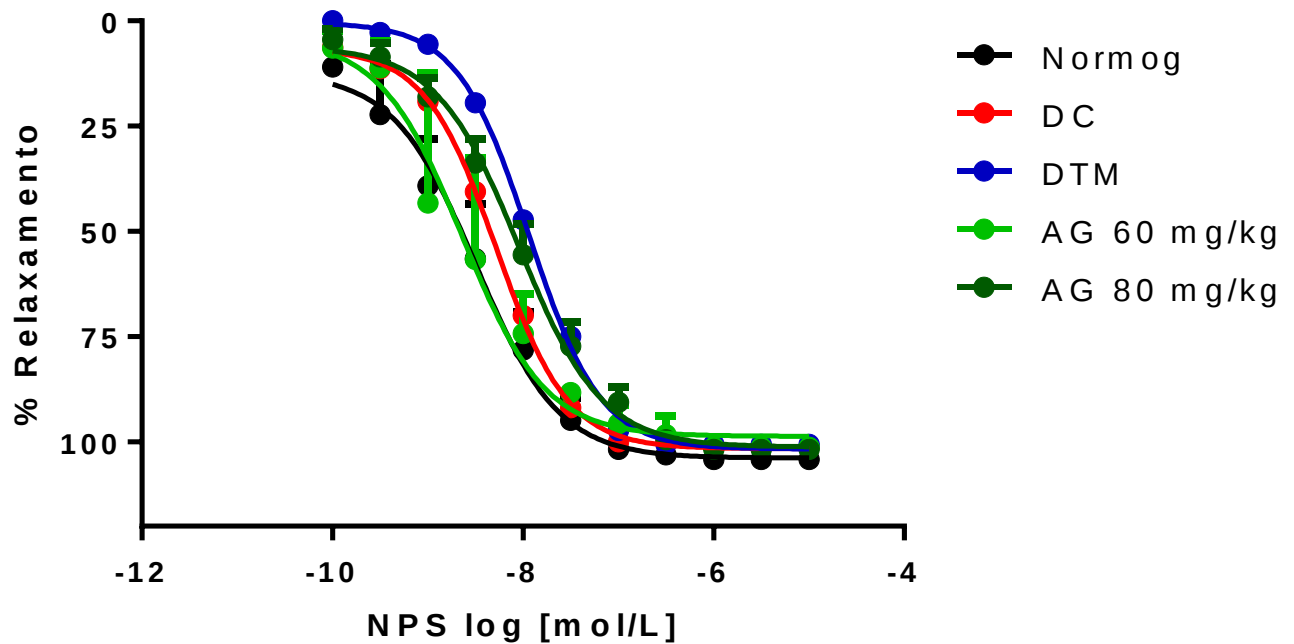


FIGURA 8. Efeito do tratamento com o ácido gálico sobre o relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de ratos diabéticos. As curvas representam o relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta com endotélio de ratos normoglicêmicos ou diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com água, metformina (500 mg/kg) ou ácido gálico (60 ou 80 mg/kg) por 28 dias. Os pontos representam média $\pm$ e.p.m. de 2-3 animais diferentes.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O DM1 é uma doença autoimune debilitante, causada pela destruição progressiva de células β -pancreáticas e a consequente ausência da produção de insulina (Carr & Brunzell, 2004; Grundy, 2004; Kahn et al., 2006). A insulina é um hormônio anabólico e sua liberação é regulada, inicialmente, pela entrada de glicose nas células β via transportador de glicose GLUT-2. No meio intracelular das células β , o metabolismo da glicose provoca elevação da relação ATP/ADP acarretando o bloqueio de canais K^+ sensíveis ao ATP, redução do efluxo deste cátion da célula, despolarizando a mesma, e promovendo abertura dos canais dos Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Há o aumento da concentração de Ca^{2+} nas células e, como consequência, há a exocitose das vesículas e a secreção da insulina (Boschero et al., 1998).

A sinalização intracelular da insulina tem início com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atuam como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase que leva à alteração conformacional e autofosforilação, elevando ainda mais a atividade quinase do receptor (Patti & Kahn, 1998).

A autofosforilação do receptor de insulina ativa a fosforilação de vários substratos protéicos, como os membros da família dos substratos do receptor de insulina (IRS-1-4) (Pessin & Saltiel, 2000). Os principais substratos do receptor de insulina são IRS-1 e o IRS-2, que, quando fosforilados em tirosina, se ligam e ativam proteínas com domínio SH2, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). A PI3K desempenha um papel importante na regulação da mitogênese, no processo de diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado pela insulina (Lin & Sun, 2010).

A PI3K forma, então, o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI-3,4,5-P3), que liga-se tanto à proteína quinase B (Akt) quanto à proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK-1) justapondo-as na membrana e habilitando a PDK-1 a fosforilar e ativar a Akt. Por sua vez, a Akt fosforila proteínas envolvidas na translocação do transportador de glicose-4 (GLUT4) dos compartimentos intracelulares para a membrana plasmática (Liczano & Alessi, 2002; He et al., 2007).

Dentre os protocolos experimentais que podem ser utilizados para indução do DM, escolhemos para este trabalho o modelo que usa a estreptozotocina (STZ), que tem uma ação tóxica sobre as células β -pancreáticas, alterando assim a produção e/ou secreção de insulina

(Delfino et al., 2002). A STZ é uma glicosamina-nitrosureia natural isolada originalmente da bactéria *Streptomyces achromogenes* e possui toxicidade dirigida às células β -pancreáticas devido à sua similaridade com a molécula de glicose, o que permite que a mesma seja internalizada via GLUT-2 (Schnedl et al., 1994).

Uma hipótese é que a STZ causa danos às células β -pancreáticas devido à formação de óxido nítrico decorrente de sua metabolização intracelular. O óxido nítrico causa alquilação e fragmentação do DNA, levando à apoptose (Kroncke et al., 1995). Como consequência, há aumento da poli-polimerase com depleção intracelular de NAD^+ e dos estoques de ATP, o que pode colaborar para a diminuição da síntese e secreção de insulina (Lenzen, 2008). A função do óxido nítrico foi confirmada em estudos realizados por Bedoya e colaboradores (1996), onde o bloqueio de sua síntese nas ilhotas foi capaz de diminuir a fragmentação do DNA produzida pela STZ.

Hiperglicemia induzida por estreptozotocina tem sido descrita como um bom modelo experimental para o estudo do DM. A sua administração em ratos induziu um aumento dos níveis de glicose no sangue e uma diminuição nos níveis plasmáticos de insulina (Punithavathi et al., 2011).

As terapias convencionais para DM têm muitas deficiências, como efeitos colaterais e alta taxa de falência secundária. Por outro lado, espera-se que produtos derivados de plantas tenham eficácia semelhante sem efeitos secundários como os observados pelo uso de drogas convencionais (Punithavathi et al., 2011). Antes do advento da insulina no início da década de 1920 e o posterior desenvolvimento de agentes hipoglicemiantes orais, o uso de plantas medicinais era a principal forma de controle do DM, pois são importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas (Gray & Flatt, 1999).

Entre as substâncias com potencial terapêutico para o DM, os compostos polifenólicos possuem uma gama de propriedades farmacológicas e o estudo dos seus mecanismos de ação tem sido objeto de grande interesse. Neste contexto, o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico), um ácido fenólico endógeno de plantas e amplamente distribuído em alimentos de origem vegetal, tem recebido uma atenção especial devido à sua potente atividade sequestradora de radicais livres e ação antioxidante (Ma et al., 2003; Singh et al., 2004).

A análise cromatográfica do extrato etanólico da casca da *Schinus terebinthifolius* realizado por Lima et al. (2009) identificou o ácido gálico como um dos seus constituintes. No mesmo trabalho, estudo de toxicidade aguda indicou que a administração do extrato de

Schinus terebinthifolius por via oral em doses de até 5,0 g/kg não produziu qualquer sinal de toxicidade ou de morte em ratos, sugerindo uma DL_{50} superior a 5,0 g/kg por via oral.

Embora algumas das plantas com atividades antidiabéticas já relatadas possuíssem ácido gálico como um importante composto químico (Wang et al., 2008; Vuong et al., 2007), poucos estudos, como o desenvolvido por Vishnu Prasad et al. (2010), tentaram demonstrar as propriedades antidiabéticas ou hipoglicemiantes do ácido gálico. Em seus estudos as propriedades hipoglicemiantes do ácido gálico foram comprovadas com a ocorrência do aumento da captação de glicose em adipócitos 3T3-L1. Os resultados de Vishnu Prasad et al. (2010) sugerem que o AG pode aumentar a translocação da GLUT4 para a membrana plasmática e assim melhora a captação de glicose pela célula.

Extratos brutos de *Triphala* e *T. bellerica* reduziram os níveis de glicose plasmática e apresentaram propriedades antioxidantes em ratos diabéticos induzidos por aloxana (Sabu & Kuttan, 2002). O estudo desenvolvido por Latha & Daisy (2011) realizou o fracionamento biomonitorado, isolamento e identificação dos princípios ativos a partir da casca do fruto de *T. bellerica*. O ácido gálico foi identificado com um dos compostos ativos e os efeitos hipoglicemiantes, hipolipemiantes, entre outras atividades, foram avaliados em ratos diabéticos induzidos por STZ. Após 28 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados com ácido gálico apresentaram uma redução dos níveis de glicose de maneira dose-dependente, aumentou os níveis de insulina plasmática, reduziu a perda de peso em decorrência do catabolismo protéico e regeneração das células β pancreáticas as ilhotas de Langerhans dos ratos diabéticos tratados com o composto.

Punithavathi et al. (2011) também observaram reversão da hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos por STZ (40 mg/kg) que foram tratados por um período de 21 dias com ácido gálico. A elevação do nível de insulina plasmática e a consequente redução dos níveis de glicose no sangue se deram, segundo o estudo citado, devido ao efeito protetor e estimulador do ácido gálico sobre as células β pancreáticas nas ilhotas de Langerhans dos ratos diabéticos tratados com o composto.

Em outro estudo, ratos diabéticos foram tratados por via oral pelo período de 28 dias com dois tipos de ácido gálico, um tipo isolado a partir da *Terminalia bellerica* Roxb. e uma segunda forma sintética. Os animais tratados com as duas formas do ácido gálico apresentaram redução dos níveis de glicose no plasma e aumento dos níveis de insulina plasmática. Outro dado importante do estudo foi o aumento dos níveis de peptídeo C nos ratos diabéticos tratados com o composto. O mecanismo bioquímico de ação do ácido gálico pode estar relacionado à potencialização da liberação de insulina a partir das células betas

existentes das ilhotas de Langerhans, tal como evidenciado pelo aumento dos níveis de insulina e de peptídeo C (Latha & Daisy, 2011).

Kade et al. (2012) demonstrou que o ácido gálico tem a capacidade de regenerar ou reverter a disfunção pancreática em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (50 mg/kg). Os efeitos farmacológicos do ácido gálico foram comprovados pela restauração dos níveis de vitamina C e glutatona reduzida, redução acentuada nos altos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, eliminação de radicais livres, a não inibição da catalase, glutatona-S-transferase, ácido desidratase δ -aminolevulínico e lactato desidrogenase pancreática e não permitiu o aumento da atividade das enzimas purinérgicas acompanhadas por hiperglicemia.

No presente estudo, dados da glicemia de jejum dos grupos DC e AG (60 e 80 mg/kg) foram comparados com os dados do grupo Normog. Os animais dos grupos DC e AG (60 e 80 mg/kg) apresentaram os valores da glicemia de jejum alterados durante todo o tratamento e foram maiores do que os apresentados pelo grupo Normog, caracterizando um quadro de Diabetes *mellitus*. Diferente dos resultados obtidos em outros estudos encontrados na literatura, o tratamento com ácido gálico não conseguiu reverter o aumento da glicemia nas duas doses utilizadas no tratamento. Estas diferenças podem ter ocorrido devido a diferentes concentrações, solventes e tempo de tratamento utilizado.

Indivíduos com DM apresentam, em geral, polifagia. O centro da saciedade, localizado na região ventromedial do hipotálamo, é responsável pela quantidade de alimento ingerido. A quantidade de glicose que penetra nas células desta região do cérebro afeta diretamente a sensação de fome. Quanto mais glicose a célula absorve, menor é o apetite. Sem a ação da insulina, não ocorre a utilização da glicose pelas células, e o centro da saciedade não é inibido. O indivíduo torna-se polifágico a despeito da hiperglicemia. De fato, no nosso estudo, os animais diabéticos apresentaram um aumento do consumo de ração quando comparados ao grupo normoglicêmico.

Apesar da polifagia, a indução de diabetes com STZ está associada com a redução de massa corporal, que ocorre devido ao aumento da perda de massa muscular (Swanston-Flat et al., 1990), que por sua vez está relacionada com a perda de proteínas de tecido (Chatterjea & Shinde, 2002). Hakim et al. (1997) relataram que a redução do peso corporal em ratos diabéticos é devido à desidratação e o catabolismo de proteínas e gorduras. O aumento das reações catabólicas que conduzem à perda de massa muscular pode ser a razão para o reduzido ganho de peso dos ratos diabéticos. Os aminoácidos normalmente não são uma fonte de energia, mas são substratos para a síntese das proteínas do corpo. Em certas situações,

como no caso do DM, eles se tornam substratos energéticos, as proteínas do corpo são degradadas e os aminoácidos constituintes são convertidos em glicose pela gliconeogênese (Rajkumar et al., 1991). No nosso estudo, os animais diabéticos apresentaram uma redução da massa corporal quando comparados ao grupo normoglicêmico. O tratamento com o ácido gálico não conseguiu reverter a redução de massa corporal, possivelmente porque não reduziu a glicemia dos animais.

Outros sintomas clássicos do DM são poliúria e polidipsia. A hiperglicemia, frequentemente, causa glicosúria (Collett-Solberg, 2001). A glicosúria, isto é, a presença do excesso de glicose na urina, ocorre quando o máximo tubular da glicose ($TmG = 10\text{mM}$ ou 180 mg/dL) é excedido (Gannong, 2010). Como consequência da glicosúria ocorre a diurese osmótica, isto é, perda de água na urina induzida pela presença de solutos não reabsorvidos no lúmen tubular (Arieff & Carrol, 1972). A desidratação pela diurese osmótica em pacientes diabéticos causa polidipsia. Neste trabalho, os animais diabéticos apresentaram um aumento do consumo de água e este efeito não foi revertido pelo tratamento com o ácido gálico, possivelmente também devido à ausência de efeito sobre a glicemia.

Os dados do presente estudo diferem de outros estudos encontrados na literatura que foram tomados como referência. Nos estudos de Punithavathi et al. (2011), o tratamento com ácido gálico realizado em ratos diabéticos melhorou o peso corporal e reduziu o consumo de água e ração, isso pode ser devido a um melhor controle do estado hiperglicemiante nos ratos diabéticos tratados com o composto. Diminuição dos níveis de glicose no sangue pode reduzir a perda de massa corporal em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina devido à diminuição do catabolismo de proteínas.

Nos experimentos realizados por Latha & Daisy (2011) a administração oral de AG melhorou o peso corporal em ratos diabéticos de uma forma dose-dependente. Observou-se também uma redução nos valores dos parâmetros proteína total e albumina plasmática em ratos diabéticos. A diminuição nos valores dos referidos parâmetros pode estar relacionada à microproteinúria e albuminúria, que são marcadores clínicos importantes da nefropatia diabética (Mauer et al., 1981), como consequência do aumento do catabolismo de proteínas (Almdal & Vilstrup, 1988).

Uma das principais complicações do Diabetes *mellitus* é a doença cardiovascular, e melhores estratégias são necessárias para sua prevenção e tratamento (Tabit et al., 2010). O Diabetes *mellitus* está associado com a disfunção endotelial vascular, um evento inicial que pode levar a patogênese da aterosclerose e hipertensão arterial (Balakumar et al., 2008; Cai & Harrison, 2000). Alguns mecanismos como alteração de vias de sinalização que levam à

inativação da eNOS, ativação do endotélio por moléculas pró-inflamatórias, disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo na vasculatura são responsáveis pela disfunção endotelial nos portadores de DM (Tabit et al., 2010).

A exposição da vasculatura à hiperglicemia e o aumento de ácidos graxos livres característicos do DM e estados de resistência insulínica induzem a produção de espécies reativas, como o superóxido, e reduzem a biodisponibilidade de NO, o que pode ser restaurado por tratamentos antioxidantes Capellini et al., 2010. Os dados do estudo de Silva et al. (2008) demonstraram a correlação inversa entre a capacidade antioxidante total e a função endotelial avaliada no leito venoso em pacientes com insuficiência renal crônica, reforçando outros dados da literatura de relação causal entre disfunção endotelial e estresse oxidativo.

De modo geral, os polifenóis apresentam estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, tendo ação antioxidante mais efetiva que as vitaminas com essas propriedades. A atividade dos polifenóis depende de sua estrutura e pode ser determinada por fatores como: reatividade como agente doador de H e elétrons, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas (Barreiros et al., 2000).

No presente trabalho, os experimentos realizados avaliaram a possível ocorrência da disfunção endotelial como consequência das alterações nos níveis de glicose e insulina plasmática (hiperglicemia) e do estresse oxidativo típicos em portadores de DM. Os testes *in vitro* utilizando anéis de artérias aortas de ratos normoglicêmicos e diabéticos serviram para analisar os possíveis danos causados ao endotélio vascular e a musculatura lisa dos vasos. Essas análises foram feitas através da contração induzida pela fenilefrina (Fen) e pelo relaxamento vascular dependente do endotélio induzido pela acetilcolina (ACh), que induz a produção endógena de NO, e pelo relaxamento não dependente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) que é um dos doadores de NO utilizados nesses tipos de experimentos.

Para a realização das curvas relaxamento induzidos pela ACh e pelo NPS nos anéis de artérias aortas torácicas foi utilizado o agente contrátil fenilefrina, devido a sua capacidade de induzir pré-contracção estável e não interferir na resposta dos agentes relaxantes, como demonstrados nos estudos de Gabriels et al. (2003) e Lima et al. (2009). A fenilefrina é um agonista seletivo para os receptores adrenérgicos do tipo α_1 . Este receptor está acoplado à proteína Gq e a ativação envolve a ativação da enzima fosfolipase C, que promove a síntese de diacilglicerol (DAG) e inositol trisfosfato (IP3) (Huang et al., 2004), que irão induzir o aumento da concentração citoplasmática de cálcio, levando à contração muscular.

Uma redução no relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina é considerada como um indicativo de disfunção endotelial vascular (Mitra & Singh, 1998; Shah & Singh, 2006; Sena et al., 2011). Nos estudos de Bhardwaj et al. (2013), foi observada uma redução no relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina em aortas isoladas de ratos diabéticos, indicando o desenvolvimento de disfunção endotelial vascular. No mesmo trabalho, duas análises para avaliar a integridade do endotélio foram realizadas. As observações feitas com o uso da microscopia eletrônica de varredura e também por análises histológicas revelaram a perda da integridade do endotélio vascular em aortas de ratos diabéticos.

Diante das evidências que comprovam a disfunção endotelial, Bhardwaj et al. (2013) demonstrou em seus estudos que a catequina, um polifenol amplamente encontrado em plantas, possui a capacidade terapêutica de prevenir alterações estruturais e funcionais no endotélio vascular de ratos diabéticos. Resultados que foram semelhantes aos encontrados nos experimentos realizados nesse trabalho.

Como resultado dos experimentos realizados nesse trabalho, uma diminuição no relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina foi observada nos anéis de aorta torácica isolada de ratos diabéticos, o que sugere o desenvolvimento de alterações estruturais e funcionais do endotélio vascular na aorta de ratos diabéticos, caracterizando a disfunção endotelial. Por outro lado, o tratamento com o ácido gálico reverteu esta disfunção. Nossa hipótese é a de que o efeito antioxidante do ácido gálico tenha diminuído a concentração de radicais livres, aumentando, assim, a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) garantindo que o endotélio vascular funcione normalmente no processo de relaxamento da vasculatura.

Já o relaxamento independente do endotélio, induzido pelo doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (NPS), não foi alterado pelo diabetes nem pelo tratamento, por não envolver os fatores endoteliais.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O ácido gálico ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico não foi capaz de reverter, em ratos diabéticos, sintomas clássicos do Diabetes *mellitus* como: a hiperglicemia, perda de massa corporal, polifagia, polidipsia e poliúria. Porém, reverteu a disfunção endotelial em anéis de aorta de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

REFERÊNCIAS

- ABDUL, H.M.; BUTTERFIELD, D.A. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-Lcarnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v.42, p.371-384, 2007.
- ABE, I.; SEKI, T.; UMEHARA, K.; MIYASE, T.; NOGUCHI, H.; SAKAKIBARA, J.; ONO, T. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. **Biochem Biophys Res Commun**. v 268(3), p.767-71, 2000.
- ABEBE, W.; MACLEOD, K.M. Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. **Br J Pharmacol**; v.101, p. 465-471,1990.
- ABREU, I.A.; CABELLI, D.E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochim Biophys Acta**, v.1804, p. 263–274, 2010.
- ADA. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 34, supplement 1, 2011.
- ADEGOKE, G.O.; VIJAY KUMAR, M. GOPALA KRISHNA, A.G.; VARADARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. *J Food Sci Technol*; 35 (4): 283-398, 1998.
- ADLER, V.; YIN Z.; FUCHS, S.Y.; BENEZRA, M.; ROSARIO, L.; TEW, K.D. et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. **EMBO J.**, v.18, p. 1321–1334. 1999.
- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. **Ann Med.**, v.29, p.95–120, 1997.
- AKAMINE, E.H.; KAWAMOTO, E.M.; SCAVONE, C.; NIGRO D.; CARVALHO, M.H.; DE CASSIA, A.T., et al. Correction of endothelial dysfunction in diabetic female rats by tetrahydrobiopterin and chronic insulin. **J Vasc Res**; v.43,p. 309-320,2006.
- ALIN, P.; DANIELSON, U.H.; MANNERVIK, B. 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. **FEBS Lett.**, v.179, p.267–270, 1985.
- ALMDAL, J.P. VILSTRUP, H. Strict insulin therapy normalizes organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. **Diabetologia**, v.31, p.114–118, 1988.
- ALVAREZ, B.; RADI, R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. **Amino Acids**;v.25, p.295-311. 2003.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research, Amsterdam**, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66(1): 1-9, 2007.

ANURADHA, D.; REDDY, K.V.; KUMAR, T.C.; NEERAJA, S.; REDDY, P.R.; REDDANNA, P. Purification and characterization of rat testicular glutathione S-transferases: role in the synthesis of eicosanoids. **Asian J Androl.**, v.2, p.277–282, 2000.

ARAKI, E.; LIPES, M. A.; PATTI, M. E.; BRUNING, J. C.; HAAG, B.; JOHNSON, R. S. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, p. 186-190, 1994.

ARIEFF, A.L. CARROL HJ. Nonketotic hyperosmolar coma with hyperglycemia: Clinical features, pathophysiology, renal function, acid-base balance, plasma-cerebrospinal fluid equilibrium and the effects of therapy in 37 cases. **Medicine**. p.51-73, 1972.

ARNOLD, W. P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric Oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3-5-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA** v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr.**, v.81, p.317-25, 2005.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v.89,p. 27-36, 2005.

AWASTHI, Y.C.; YANG, Y; TIWARI, N.K.; PATRICK, B.; SHARMA, A.; LI, J. et al. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. **Free Radic Biol Med.**, v.37, p. 607–619, 2004.

BABIOR, B.M. The NADPH oxidase of endothelial cells. **IUBMB Life**, v.50, p.267–269, 2000.

BABIOR, B.M.; LAMBETH, J.D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Arch Biochem Biophys**, v.397, p.342–344, 2002.

BALAKUMAR, P., & DHANARAJ, S. A. Cardiovascular pleiotropic actions of DPP-4 inhibitors: A step at the cutting edge in understanding their additional therapeutic potentials. **Cellular Signalling**, v. 25, p.1799–1803, 2013.

BALAKUMAR, P., KAUR, T., SINGH, M.. Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: Current perspectives and future directions. **Toxicology**. v.245, p.49–64, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARNETT, Y.A.; KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v.338, n.1/6, p.115-128, 1995.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29;1 p.113-123, 2006.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n.4, p. 405–412, 1991.

BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v.271, p. 424-37, 1996.

BEDOYA, F. J.; SOLANO, F.; LUCAS, M. N-monomethyl-L-arginine and apoptosis prevent streptozotocin –induced double strand DNA break formation in pancreatic rats islets. **Experimentia**, v. 52, n. 4, p. 344-347, 1996.

BEUCKMANN, C.T.; FUJIMORI K.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin H synthases in the human brain. **Neurochem Res.**, v.25, p.733–738. 2000.

BHARAT, S.; COCHRAN, B.C.; HSU, M.; LIU, J.; AMES, B.N.; ANDERSEN, J.K. Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. **Neurotoxicology**, v.23, p.479-486, 2002.

BHARDWAJ, P., KHANNA, D., BALAKUMAR, P. Catechin Averts Experimental Diabetes Mellitus-Induced Vascular Endothelial Structural and Functional Abnormalities. **Cardiovasc Toxicol.** 2012. DOI 10.1007/s12012-013-9226-y

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v.12(2), p.123-130, 1999.

BIEWENGA, G.P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **Gen Pharmacol**, v.29, p.315-331, 1997.

BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoic acid-the drug of the future? **Pharmacol Rep**, v.57, p.570-577, 2005.

BLOKHINA O.; VIROLAINEN E.; FAGERSTEDT K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann Bot**, v.91, p.179-194. 2003.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature** v. 368, p. 850–853, 1994.

BOSCHERO, A.C.; CREPALDI-ALVES, S. C.; CARNEIRO, E. M; BOSQUEIRO J. R. Canais de potássio sensíveis ao ATP e a secreção de insulina: aspectos fisiopatológicos da

hiperinsulinemia familiar. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, p. 29-35, 1998.

BRADE, T.; MANNER J.; KUHL M.; The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. **Cardiovasc res**; v. 7(2), p.198-209, 2006.

BRAHMACHARI, G. Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry, Kerala: **Research Signpost**, p. 187-212, 2011.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* v.87, p.682-685, 1990.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of the Natural Academy of Science USA** v. 87, p. 682-685, 1990.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**; v.11, p. 569-73, 1984.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 268(12), p. 8410-8413, 1993.

BUTLER, J.; JAYSON, G.G.; SWALLOW, A.J. The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. **Biochim Biophys Acta**, v.408, p. 215–222. 1975.

CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J. P.; RAVANAT J. L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.*, v. 424, p. 9-21, 1999.

CAI ,H.; HARRISON ,D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**; v.87, p. 840-4, 2000.

CALVER, A.; COLLIER, J.; VALLANCE, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. **J Clin Invest.**;v.90,p.2548-54,1992.

CAMPAGNOLO, N. MURUSSI, N. SILVEIRO, S.P. Diabete melito. In: von Exe Colerta, Capp E. (orgs.). **Ginecologia no consultório**. São Paulo: Artmed; p. 519-41, 2008.

CAO, X.; PHILLIS, J.W. The free radical scavenger, alpha-lipoic acid, protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils. *Free Radic Res*, v.23, p.365-370, 1995.

CAPELLINI, V.K; CELOTTO, A.C.; BALDO, C.F.; OLIVON, V.C.; VIARO, F.; RODRIGUES, A.J.; EVORA, P.R. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities. **Current Vascular Pharmacology**; v.8, p. 526-544, 2010.

CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Quim. Nova**, v.20, p. 535-540. 1997.

CARMELET P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med.**, v. 6(4), p.389-95, 2000.

CARR, M.C.; BRUNZELL, J. D. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p.2601-2607, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 12p., 2011.

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation, Oxford**, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet, London**, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

CHANCE B.; SIES H.; BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Ver**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Exp. Gerontol.** Sep; v. 36(9),p. 1459- 71, 2001.

CHATTERJEA, M.N. SHINDE, R. Text Book of Medical Biochemistry, **Jaypee Brothers Medical Publishers**, p 317, 2002.

CHO, S.G.; LEE, Y.H.; PARK, H.S.; RYOO, K.; KANG, K.W.; PARK, J. et al. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. **J Biol Chem**; v. 276, p. 12749–12755. 2001.

CIRCU M.L.; AW, T.Y. Glutathione and apoptosis. **Free Radic Res**; v. 42, p.689-706. 2008.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. **Biochemistry**, v.2, p.1420. 1963.

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

COLLETT-SOLBERG, P.F. Cetoacidose diabética em crianças: revisão da fisiopatologia e tratamento com o uso do “método de duas soluções salinas”. **Jornal de Pediatria**.v. 77(1), p. 9-16, 2001.

CONTRERAS, J. L.; SMYTH, C. A.; CURIEL, D. T.; ECKHOFF, D. E. Nonhuman primate models in type 1 diabetes research. **Ilar Journal**, v. 45, n.3, p. 334-342, 2004.

COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J.; VAZ, A.D.N. Cytochrome P450: Progress and predictions. **FASEB J** 6, 669–673, 1992.

COOPER, M. E., BONNET, F., OLDFIELD, M., & JANDELEIT-DAHM, K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: An overview. **American Journal of Hypertension**, v. 14, p. 475–486, 2001.

CREAGER, M.A.; LUSCHER ,T.F.; COSENTINO, F.; BECKMAN, J.A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. **Circulation**; v.108, p. 1527-32, 2003.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In Biochemistry & Molecular Biology of Plants; Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds., **American Society of Plant Physiologists**, p. 1250-1318, 2000.

DAS, I.; KHAN N.S.; SOORANNA, S.R. Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. **Biochem Soc Trans.**;v.23(1), p.136S, 1995.

DAS, I.; KHAN, N.S.; SOORANNA, S.R. Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. **Biochem Soc Trans.**, v. 23(1), p. 136, 1995.

DAS, K.C.; LEWIS-MOLOCK, Y.; WHITE, C.W. Thiol modulation of TNF α and Il_1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappaB. **Mol Cell Biochem**, v. 148, p. 45–57, 1995.

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

DE LUCA, V.; ST PIERRE, B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. Trends Plant Science. 5., p. 168-173. 2000.

DECKER, E.A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. Trends Food Sci Technol; v.9 (6), p.241-8, 1998.

DELFINO, V. D. A.; FIGUEIREDO, J. F.; MATSUO, T.; FAVERO, M. E.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina; comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24 (1), p. 31-36, 2002.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol**; v.257, p. 163-73, 1989.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology** v.104, p.15-29, 1971.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; DORES, R. G. R.; FABRES, M. H. A.; NAGEM, T. J. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19 (2A), p. 488-500, 2009.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research, Baltimore**, v.43, n.2, p.460-472, 1983

DURÁN, R.M.; PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, Sevilla, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, p. 343-350,2003.

DWIBEDY, P.; DEY, GR.; NAIK, D.B.; KISHORE, K.; MOORTHY, P.N. Pulse radiolysis studies on redox reactions of gallic acid: one electron oxidation of gallic acid by gallic acid OH adduct. *PCCP PHYS C*, v.1(8), p. 1915-1918, 1999.

ELLIOTT, T.G.; COCKCROFT, J.R.; GROOP, P.H.; VIBERTI, G.C.; RITTER, J.M. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulindependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. **Clin Sci (Lond)**; v. 85,p.687-93,1993.

EVANS, C.H.; WATKINS, S.C.; STEFANOVIC-RACIC, M. Nitric oxide and cartilage metabolism. **Methods in Enzymology** v. 269, p.75-88, 1996.

FANTIN, V. R.; WANG, Q.; LIENHARD, G. E.; KELLER, S. R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 278, n. 1, p.127-133, 2000.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DIABETES. **Diabetes Atlas**. 3ª. ed. 2009. Disponível em <<http://www.eatlas.idf.org/atlasff5d.html?id=0>>. Acessado em 15 de fevereiro de 2014.

FERRANNINI, E.; NATALI, A.; CAPALDO, B.; LEHTOVIRTA, M.; JACOB, S.; YKI-JÄRVINEN, H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. *Hypertension*, v. 30, p.1144-9, 1997.

FERRANNINI, E.; NATALI, A.; CAPALDO, B.; LEHTOVIRTA, M.; JACOB, S.; FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Méd. Bras*. v. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.** v. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FICHTLSCHERER, S.; ROSENBERGER, G.; WALTER, D.H.; BREUER, S.; DIMMELER, S.; ZEIHNER A.M. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. **Circulation**; v. 102,p.1000–6, 2000.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing; **Nature**, v.408, p. 239,2000.

FORD, E.S.; MOKDAD A.H.; GILES, W.H.; BROWN, D.W. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Diabetes**; v.52, p. 2346-52, 2003.

FORSTROM, J. W.; ZAKOWSKY, J. J.; TAPPEL, A. L. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. **Biochemistry**., v.17,p.2639-2644. 1978.

FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.37, p. 211-28. 1997.

FREISLEBEN, H.J. Lipoic acid reduces ischemia–reperfusion injury in animal models. **Toxicology**, v.148, p.159-171, 2000.

FRIDOVICH I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Ann N Y Acad Sci**; v. 893, p.13-18. 1999.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem**; v. 264, p.7761-7764, 1989.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 97–112. 1995.

FRISCHER, H.; AHMAD, T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. **J Lab Clin Med**; v.109, p. 583-8, 1987.

FUKAI T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and disease. **Antioxid Redox Signal**; v.15, p. 1583-1606, 2011.

FUKUTO, J.M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v.35, p.165-194, 1995.

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

GABRIELS, G.; AUGUST, C.; GRISK, O.; STEINMETZ, M.; KOSH, M.; RAHN, K.H.; SCHLATTER, E. Impact Of Renal Transplantation On Small Vessel Reactivity. *Transplantation* v. 75, n. 5, p. 689–697, 2003.

GALLEANO M., PUNTARULO S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. **Braz J Med Biol Res**; v.27,p. 2.349-58. 1994.

GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, v.93, p. 105–113, 2004.

GANONG, WF. **Fisiologia médica**. 22^a ed. Porto Alegre: AMGH. Cap. 17, 2010.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, Oxford, v.7, n.1/2, p.113-174, 1998.

GHIBU, S.; LAUZIER, B.; DELEMASURE, S.; AMOUREUX, S.; SICARD, P.; VERGELY, C.; MURESAN, A.; MOGOSAN, C.; ROCHETTE, L. Antioxidant properties of alpha-lipoic acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated rat heart to reversible ischemia. **Mol Cell Biochem**, v.320, p.141-148, 2009.

GILBERT, H.F.; MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**; v.63, p. 69-172. 1990.

GRAY, A.M.; FLATT, P.R. Insulin-releasing and insulinlike activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (Coriander). **Brit J Nutr**, 81, 203-209, 1999.

GROOP, L.; BOTAZZO, G.F.; DONIACH, D. Islet cell antibodies identify latent type 1 diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. **Diabetes**; v.35, p. 237-41, 1986.

GROSS, J. L. . Diagnostico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq. Bras. Endocrinol. metab.* v. 46, n. 1, 2002.

GROSS, J.L. AZEVEDO, M.J. SILVEIRO, S.P. CANANI, L.H. CARAMORI, M.L. ZELMANOVITZ, T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**. v.28, p. 164-176, 2005.

GROSS, J.L.; DE AZEVEDO, M.J.; SILVEIRO, S.P.; CANANI LH, CARAMORI, M.L.; ZELMANOVITZ, T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*.; v.28, p. 164-176, 2005.

GROSS, J.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J. L.; REICHELT, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diagnostico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq. Bras. Endocrinol. metab.* v. 46 n. 1, 2002.

GRUNDY, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n.6, p.2595–2600, 2004.

GUIDOT, D.M.; REPINE, J.E.; KITLOWSKI, A.D.; FLORES, S.C.; NELSON, S.K.; WRIGHT, R.M.; MCCORD, J.M. Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. **J Clin Invest**, v. 96, p. 1131–1136, 1995.

GURER, H.; OZGUNES, H.; OZTEZCAN, S.; ERCAL, N. Antioxidant role of α -lipoic acid in lead toxicity. **Free Radic Biol Med**, v.27, p.75-81, 1999.

HABIG, W.H.; PABST M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**; v. 249, p. 7130–7139, 1974.

HAKIM, Z.S.; PATEL, B.K.; GOYAL, R.K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Ind. J. Physiol. Pharmacol**, v.41, p. 353–360, 1997.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M. Free Radicals in Biology and Medicine. **United Kingdom: Oxford UK**, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Oxidative Stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v.97, p.1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutat. Res.** Jul v.15;p.37-52,1999.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v.355, p. 1179,2000.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology, Oxford**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in Biology and Medicine. United Kingdom: Oxford UK, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ed., **Oxford University Press: New York**,. 936p1999.

HALLIWELL, B.; The antioxidant paradox. **The Lancet**, 355, 1179, 2000.

HARBORNE, J.B. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne JB, editor. **Methods in plant biochemistry: volume 1 Plant phenolics**. London: Academic Press; p. 1-28, 1989.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. editores. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit Rev Biochem Mol Biol**; v.30, p. 445–600, 1995.

HE, A.; LIU, X.; LIU, L.; CHANG, Y.; FANG, F. How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin?. **Cellular Signalling**, v. 19, n.1, p. 1–7, 2007.

HEBBEL R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med**; v.107,p. 401-4. 1986.

HERCBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ROUSSEL, A.M.; ARNAUD, J.; RICHARD, M.J.; MALVY, D.; PAULDAUPHIN, A.; BRIANCON, S.; FAVIER, A. Background and rationale behind the SU.VI. MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. **International Journal for Vitamins and Nutrition Research, Bern**, v.68, n.1, p.3-20, 1998.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Crit Rev Food Sci Nutr**; v.43, p.89–143, 2003.

HOUBEN, A.J.; SCHAPER, N.C.; DE HAAN, C.H.; HUVERS, F.C.; SLAAF, D.W.; DE LEEUW, P.W., et al. Local 24-h hyperglycemia does not affect endothelium-dependent or -independent vasoreactivity in humans. **Am J Physiol.**; v.270, p.2014-20,1996.

HSUEH, W.A.; LYON, C.J.; QUIÑONES, M.J. Insulin resistance and the endothelium. **Am J Med.** v.117:109-17, 2004.

HU, J.P.; CALOMME, M.; LASURE, A.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.; VANDEN BERGHE, D.A. Structure–activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 47, p. 327-331, 1995.

HUANG, J-S.; RAMAMURTHY, S.K.; LIN, X.; LE BRETON, G.C. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. **Cell Signalling** v. 16, p. 521–533, 2004.

IGNARRO, L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circ Res**, v. 65, p.1-21, 1989.

IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochemical Pharmacology** v. 41, p. 485-490, 1991.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA** v. 84, p. 9265-9269, 1987.

IMAGAWA, A.; HANAFUSA, T.; MIYAGAWA, J-I.; MATSUZAWA, Y. for the Osaka IDDM Study Group. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. **N Engl J Med**, p.342:301-7, 2000.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, n.2, p. 145-169, 2003.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; SAKAGUCHI, N.; LI, Z.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y.; JIANG, B.Y.; CHEN, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, p. 1526–1530, 1995.

[INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION](#) - IDF Diabetes Atlas, sixth edition, p. 11-13, 2013.

IP, C.; HAYES, C.; BUDNICK, R. M.; GANTHER, H. E. Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. **Cancer Res.** V. 51,p. 595. 1991,

JACKSON, M.J. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? **Free Radic Biol Med**;v.44, p.132-141, 2008.

JACOB, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, New York, v.15, n.5, p.755-766, 1995.

JADHAV, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D.; MADHAVI, D.L. Lipid oxidation in biological and foods systems. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editores. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. **New York: Marcel Dekker**; p. 5-62, 1995.

JÄRVISALO, M.J.; RAITAKARI, M.; TOIKKA, J.O.; PUTTO-LAURILA, A.; RONTU, R.; LAINE, S. et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. **Circulation**.;v.109, p. 1750-5, 2004.

JÄRVISALO, M.J.; RAITAKARI, M.; TOIKKA, J.O.; PUTTO-LAURILA, A.; JOHANSSON, A.S.; MANNERVIK, B. Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. **J Biol Chem**; v.276, p. 33061–33065, 2001.

JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, S.J.; SCALES, K.M; CUSCO, J.A.; LEE, B.K.; CREAGER, M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation**.; v. 88, p. 2510-6, 1993.

JUONALA, M.; VIIKARI, J.S; LAITINEN, T.; MARNIEMI, J.; HELENIUS, H.; RONNEMAA T. et al. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young finns study. **Circulation**; v.110, p.2918-23,2004.

KADE, I.J.; OGUNBOLUDE, Y.; KAMDEM, J.P.; ROCHA, J.B. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**. V.26, p.1-11, 2013.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840–846, 2006.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840–846, 2006.

KANNEL, W.B.; MCGEE, D.L. Diabetes and cardiovascular disease. The framingham study. **Jama.**, v.241, p.2035-8,1979.

KELISHADI, R.; MIRGHAFARI, N.; POURSAFA, P.; GIDDING, S.S. Lifestyle and environmental factors associated with inflammation oxidative stress and insulin resistance in children. **Atherosclerosis**, v. 203 (1), p. 311-9, 2008.

KEMPF, K.; RATHMANN, W.; HERDER, C.: Impaired glucose regulation and type 2 diabetes in children and adolescents. **Diab Metab Res Rev**, v. 24, n. 6, p. 427-437, 2008.

KIM, S.H., HYUN, S.H., CHOUNG, S.Y. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. **J. Ethnopharmacol.** v. 104, p. 119–123, 2006.

KING, A.; YOUNG, G.; Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**; 50 (2): 213-8, 1999.

KIRKEBOEN, K.A.; STRAND, O.A. The role of nitric oxide in sepsis: an overview. **Acta Anaesthesiology Scandinavica** v.43, p.275-288, 1999.

KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends Biochem Sci**; v.32, p.44-50. 2007.

KORO, C. E.; BOWLIN, S. J.; BOURGEOIS, N.; FEDDER, D. O. Glycemic control from 1988 to 2000 among US adults diagnosed with typ 2 diabetes: a preliminary report. **Diabetes Care**, v. 27, p. 17-20, 2004.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71-88, 2002.

KROES, B.H.; VAN DEN BERG, A.J.; QUARLES VAN UFFORD, H.C.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R.P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med.**, v.58, p. 499–504, 1992.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; SOMMER, A.; RODRIGUEZ, M. L.; KOLB-BACHFEN, V. Nitric oxide generation during cellular metabolism of diabetogenic streptozotocin contributes to islets cell DNA damage. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, n. 3, p. 179-185, 1995.

LABORDE, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. **Cell Death Differ**; v.17, p.1373-1380, 2010.

LATHA, R.C.R.; DAISY, P. Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.189, p. 112–118, 2011.

LEE, H. Y., YOUN, S. W., OH, B. H., & KIM, H. S. KRU^{pp}el-like factor 2 suppression by high glucose as a possible mechanism of diabetic vasculopathy. **Korean Circulation Journal**, v. 42, p. 239–245.

LEHMANN, C.; WOLLENBERGER, U.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHELLER, F. W. Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme. **J. Electroanal. Chem.**, v.455, p. 259-63. 1998.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan – and streptozotocin – induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008..

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

LI, J.M.; SHAH, A.M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Regul Integr Comp Physiol**,; v.287p. 1014-1030,2004.

LI, H.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. **J Pathol.**; v. 190(3), p.244-254. 2000

LICZANO, J. M.; ALESSI, D. The insulin signalling pathway. **Current Biology**, v. 12, p. 236-238, 2002.

LIMA, C.R.; VASCONCELOS, C.F.; COSTA-SILVA, J.H.; MARANHÃO, C.A.; COSTA, J.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; SOARES, L.A.; FERREIRA, F.; WANDERLEY, A.G. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 141, p. 517-525, 2012.

LIMA, L.B.; VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; LEITE, V.R.; FERREIRA P.A.; ANDRADEB, B.A.; ARAÚJO, E.L.; XAVIER, H.S.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p. 468–473, 2009.

LIMA, V.V.; GIACHINI, F.R.C.; CHOI, H.; CARNEIRO, F.S.; CARNEIRO, Z.N.; FORTES, Z.B.; Carvalho, M.H.C.; Clinton Webb, R.; Tostes, R.C. Impaired Vasodilator Activity in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension Is Associated With Increased Protein O-GlcNAcylation. **Hypertension**, v. 53, p.166-174, 2009.

LIN, Y.; SUN, Z. Current views on type 2 diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 204, p. 1-11, 2010.

LISTOWSKY, I. Proposed intracellular regulatory functions of glutathione transferases by recognition and binding to S-glutathiolated proteins. **J Pept Res**; v. 65, p.42–46. 2005.

LITWACK, G.; KETTERER, B.; ARIAS, I.M.; LIGANDIN: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. **Nature**; v. 234,p. 466–467. 1971.

LO, H.W.; ALI-OSMAN F. Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. **Curr Opin Pharmacol**; v.7, p. 367–374. 2007.

MA, J.; LUO, X.D.; PROTIVA, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J.. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 983–986, 2003.

MA, J.; LUO, X.D.; PROTIVA, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 983–986, 2003.

MAIA, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. 2006. **Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, 2006.

MAKIMATTILA, S.; MANTYSAARI, M.; GROOP, P.H.; SUMMANEN, P.; VIRKAMAKI, A.; SCHLENZKA, A.; et al. Hyperreactivity to nitrovasodilators in forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulindependent diabetes mellitus. **Circulation**.,95:618-25, 1997.

MAKIMATTILA, S.; MANTYSAARI, M.; GROOP, P.H.; SUMMANEN, P.; VIRKAMAKI, A.; SCHLENZKA A.; et al. Hyperreactivity to nitrovasodilators in forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulindependent diabetes mellitus. **Circulation**.,v.95, p. 618-25,1997.

MANNER, J. PEREZ-POMARES, J.M. MACIAS, D., MUNOZ-CHAPULI, R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. **Cells tissues organs**.v 169(2), p. 89-103, 2001.

MARINOVA, E.M.; YANISHLIEVA, N.V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p.189-197, 2003.

MARSH, S. A.; COOMBES, J.S.; Exercise and the endothelial cell. **Int J Cardiol**. v.99 (2), p.165-9, 2005.

MARSH, S.A.; COOMBES, J.S. Exercise and the endothelial cell. **Int J Cardiol**; 99 (2):165-9, 2005.

MARTÍNEZ, S.A.; CANCELA, L.M.; VIRGOLINI, M.B. El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo. Implicancias terapêuticas Oxidative stress as a mechanism of action of lead. Therapeutic implications. *Acta Toxicol. Argent.*, v.19 (2): p. 61-79. 2011.

MATSUBARA, L.S.; FERREIRA, A.L.A.; TORNERO, M.T.T.; MACHADO, P.E.A. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. *Braz J Med Biol Res*; v.25, p. 331-5. 1992.

MAUER, S.M. STEFFES, M.W. BROWN, D.M. The kidney in diabetes. *Am. J. Med.*, v.70, p. 63–66, 1981.

MCCALL, T. B.; BOUGHTON-SMITH, N.K.; PALMER, R.J.M.; WHITTLE, B.J.R.; MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophil release and interaction with superoxide anion. *Biochemical Journal* v. 261, p.293-296, 1989.

MCINTYRE, M.; BOHR, D.F.; DOMINICZAK, A.F. Endothelial Function in Hypertension, The Role of Superoxide Anion. *Hypertension* v. 34, p.539-545, 1999.

MCVEIGH, G.E.; BRENNAN, G.M.; JOHNSTON, G.D.; MCDERMOTT, B.J.; MCGRATH, L.T.; HENRY, W.R.; et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*;v.35, p.771-6, 1992.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem*, v.52,p. 711. 1983.
MELLI, G.; TAIANA, M.; CAMOZZI, F.; TRIOLO, D.; PODINI, P.; QUATTRINI, A.; TARONI, F.; LAURIA, G. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol*, v.214, p.276-284, 2008.

MENDES, A. B. V.; FITTIPALDI, J. A. S.; NEVES, R. C. S; CHACRA, A. R.; MOREIRA-JR., E. D. Prevalence and correlates of inadequate glycaemic control: results from a nationwide survey in 6.671 adults with diabetes in Brazil. *Acta Diabetology*, v. 47, n.185, p. 137-145, 2010.

MILLS, G. C. J. Hemoglobin catabolism: i. glutathione peroxidase, na erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Biol. Chem.*, v.229,p. 189. 1957.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE - DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA, COORDENAÇÃO NACIONAL DE HIPERTENSÃO E DIABETES, p. 3-4, 2011.

MIRANDA, P.A.C.; REIS, R. Diabetes mellitus gestacional.Rev. *Assoc. Med. Bras.* v.54, n.6, 2008.

MITTRA, S., SINGH, M.. Possible mechanism of captopril induced endothelium-dependent in isolated rabbit aorta. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 183, 63–67, 1998.

MOHAMED, E. , DEBPRASAD, C., VINCENZO, F AND WILLIAM, C. C. **Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2012, p. 2

MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N.E. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.182, p.84-90, 2002.

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

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

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev Nutr**; v. 17 (4); p.411-24, 2004.

MURLEY, J.S.; KATAOKA, Y. HALLAHAN, D.E.; ROBERTS, J.C.; GRDINA, DJ. Activation of NFkappaB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. **Free Radic Biol Med**,v. 30, p. 1426–1439. 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*; 1054 (1/2): 95-111, 2004.

NASCIMENTO, J.C.; LAGE, L.F.O.; CAMARGOS, C.R.D.; AMARAL, J.C.; COSTA, L.M.; SOUSA A.N.; OLIVERIA F.Q. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. **Rev. Bras. Farm.** v. 92, p. 327-332, 2011.

NATHAN, D.M.; CLEARY, P.A; BACKLUND, J.Y; GENUTH, S.M.; LACHIN, J.M.; ORCHARD T.J. et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med.**, v.353, p. 2643-53, 2005

NEGRI, G. Plantas Hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NEGRI, G. Plantas Hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 20-25, 2005.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr.**, v. 74, p. 418 –25, 2001.

NIKI, E.; NOGUSHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and b-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1322-1326, 1995.

NISHIDA, K.; HARRISON, D.G.; NAVAS, J.P.; FISHER, M.; DOCKERY, S.P.; UEMATSU, M. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide syntase. **Journal of Clinical Investigation** v. 90, p. 2092-2096, 1992.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU X.L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y., et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature.**, v. 404, p. 787-90, 2000.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J.; Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

OBERLEY L.W.; CLAIR S.T.; OBERLEY, TD. Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. **Arch Biochem Biophys.**,v. 254, p. 69–80, 1987.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. **J Biol Chem**, v. 276, p. 38388–38393, 2001.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H; BUIJSMAN, M.N.C.P.; VAN AMELSVOORT, J.M.M.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **J Nutr.**, v. 133, p. 1806 –14, 2003.

OYAMA, Y.; KAWASAKI, H.; HATTORI, Y.; KANNO, M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. **Eur J Pharmacol.**, v.132, p. 75-8, 1986.

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic Biol Med**, v.19, p.227-250, 1995.

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. 524-6, 1987.

PATEL, R.P.; LEVONEN, A.; CRAWFORD J.H.; DARLEY-USMARA, V.M. Mechanisms of the pro and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. **Cardiovasc. Res.**; v.47, p.465–474, 2000.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor - a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, n. 2-4, p.89-109, 1998.

PEERAPATDIT, T.; PATCHANANS, N.; LIKIDLILID, A.; POLDEE, S.; SRIRATANASATHAVORN, C. Plasma lipid peroxidation and antioxidant nutrients in type 2 diabetic patients. **J Med Assoc Thai.**, v. 89, p. 147-55, 2006.

PELEG, H.; BODINE, K.K.; NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chem Senses.**, v. 23, p. 371-8, 1998.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p.165-169, 2000.

PICCOLI, J.C.; GOTTLIEB, M.G.; CASTRO, L.; BODANESE, L.C.; MANENTI, E.R.; BOGO, M.R. et al. Association between 894G>T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and metabolic syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** V.52(8), p. 1367-73, 2008.

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

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035, 2000.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela; 2005.

PLECKO, T.; NORDMANN, S.; RUKGAUER, M.; KRUSE-JARRES, J. D. Determination and distribution of human plasma selenoproteins. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 363, p. 517-519. 1999.

POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, V.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; SCHMIDT, H.H.H.W.; NAKANE, M.; MURAD, F. Purification and characterization of particulate EDRF synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proceedings of the Natural Academy of Science USA**, v.88, p.10480-10484, 1991.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research, Bern**, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

POWERS, S.K.; JACKSON M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev.**, v. 88, p. 1243-1276, 2008.

PRASAD, A.; ZHU, J.; HALCOX, J.P.; WACLAWIW, M.A.; EPSTEIN, S.E.; QUYYUMI A.A. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. **Circulation**;v.106, p.184-90,2002.

PRITSOS, C.A. Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. **Chem Biol Interact.**, v. 129, p. 195-208, 2000.

PUNITHAVATHI V. R.; PRINCE, P. S. M., KUMAR R., SELVAKUMARI, J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 650,p. 465-471, 2011.

RADAK, Z.; CHUNG, H.Y.; GOTO S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med**; v. 44, p.153-159. 2008

RADDATZ, E.; THOMAS, A.C.; SARRE A.; BENATHAN, M. Differential contribution of mitochondria, NADPH oxidases, and glycolysis to region-specific oxidant stress in the anoxia-reoxygenated embryonic heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 300, p. 820-835, 2011.

RADOMSKI, M.W.. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 5193-7,1990.

RADOVANOVIC, D.; BRATIC, M.; NURKIC, M.; CVETKOVIC, T.; IGNAJATOVIC, A.; ALEKSANDROVIC, M. Oxidative stress biomarker response to concurrent strength and endurance training. **Gen Physiol Biophys.**, v. 28, p. 205-211, 2009.

RAJKUMAR, L.; SRINIVASAN, N.; BALASUBRAMANIAN, K.; GOVINDARAJULU, P. Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. **Ind. J. Exp. Biol.**, v. 29, p. 1081–1083, 1991.

RAPOPORT R, M.; DRAZNIN, M.B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**; v. 306, p. 174-176, 1983.

RASK-MADSEN, C.; KING, G.L. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab.**, v. 3, p. 46-56, 2007.

RATAJSKA, A.; CZARNOWSKA, E.; KOLODZINSKA, A.; KLUZEK, W.; LESNIAK, W. Vasculogenesis of the embryonic heart: origin of blood island-like structures. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Bio*, v. 1288 (3), p.223-32, 2006.

RAZA, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. **FEBS J**,v.278, p. 4243-4251. 2011.
Referências organizadas

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 11, p. 73-91, 1995.

RISAU, W.; Mechanisms of angiogenesis. **Nature.** v. 386, p. 671-4, 1997.

ROCKENBACH, I. I. Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). 112 p. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina**, 2008.

ROMERO, L.; ANDREWS, K.G.L.; O’ROURKE, K.; MASLEN, A.; KIRBY, G. Human GSTA1-1 reduces c-Jun N-terminal kinase signalling and apoptosis in Caco-2 cells. **Biochem J.**, v. 400, p. 135–141. 2006.

RONTU R, LAINE S. et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. **Circulation.** v.109, p.1750-5, 2004.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu Rev Nutr.**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press,p.151-70. 1991.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W. G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179,p. 588. 1973.

RUSCOE, J.E.; ROSARIO, L.A.; WANG T.; GATE, L.; ARIFOGLU, P.; WOLF, C.R. et al. Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTpi) influences cell proliferation pathways. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 298, p. 339–345, 2001.

RYOO, K.; HUH, S.H.; LEE, Y.H.; YOON, K.W.; CHO, S.G.; CHOI, E.J. Negative regulation of MEKK1-induced signaling by glutathione S-transferase mu. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 43589–43594, 2004.

SABU, M.; KUTTAN, C.R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 155–160, 2002.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J.Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 251-265, 2002.

SALSALI, A.; NATHAN, M. A review of types 1 and 2 diabetes mellitus and their treatment with insulin. **American Journal of Therapeutics**, v.13, p. 349–361, 2006.

SATOH, M.; FUJIMOTO, S.; HARUNA, Y.; ARAKAWA, S.; HORIKE, H.; KOMAI, N., et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol.**,v.288, p. 1144-52, 2005.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E.L. Inhibition of the renin angiotensin system: implications for endothelium. **Current Diabetes Report.**, v.6, p. 274-278, 2006.

SCHALKWIJK ,C.G.; STEHOUWER, .CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. **Clin Sci (Lond).**, v.109, p. 143-59, 2005.

SCHMIDT, H.H.H.W.; MURAD, F. Purification and characterization of human NOS. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.181, p.1372-1377, 1991.

SCHNEDL, W. J.; FERBER, S.; JOHNSON, J. H.; NEWGARD, C. B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. **Diabetes**, v.43, p. 1326-1333, 1994.

SCHRAM, M.T.; CHATURVEDI, N.; SCHALKWIJK, C.; GIORGINO F.; EBELING, P.; FULLER, J.H., et al. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes: The Eurodiab Prospective Complications Study. **Diabetes Care**; v.26, p.2165-73, 2003.

SENA, C.M.; MATAFOME, P.; LOURO, T.; NUNES, E.; FERNANDES, R.; SEIÇA, A.R.M. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. **Brit. J. Pharmacol.** v.163, p. 424-437, 2011.

SHAH, D. I., SINGH, M.. Activation of protein kinase A improves vascular endothelial dysfunction. **Endothelium**, v. 13, p. 267–277, 2006.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 32, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic**; 1995.

SHAN X.; AW T.Y.; JONES D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**; v. 47, p. 61-71. 1990.

SHOELSON, S. E. Insulin and other antidiabetic agents. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, **3th. Edn, John Wiley**, v. 14, p. 662-676, 1995.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry, Berlin**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVA, A.M, SIGNORI, L.U, PLENTZ, R.D, MORENO, J.R.H, BARROS, E, BELLO-KLEIN, A., et al., Hemodialysis improves endothelial venous function in end-stage renal disease. **Braz J Med Biol Res.**, v. 41, p. 482-8, 2008.

SINGH, J.; RAI, G.K.; UPADHYAY, A.K.; KUMAR, R.; SINGH, K.P.; Antioxidant phytochemicals in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Ind. J. Agric. Sci.**, v. 74, p. 3–5, 2004.

SINGH, T.P.; GROEHN, H.; KAZMERS, A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. **J Am Coll Cardiol.**, v.4, p.661-5, 2003.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr.**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.S., ARAÚJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SRINIVASAN, S., HATLEY, M. E., BOLICK, D. T., PALMER, L. A., EDELSTEIN, D., BROWNLEE, M. Hyperglycaemia induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. **Diabetologia**, v. 47, p. 1727–1734, 2004.

STEHOUWER, C.D.; GALL, M.A.; TWISK, J.W.; KNUDSEN, E.; EMEIS J.J.; PARVING H.H. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. **Diabetes**; v.51, p.1157-65, 2002.

STEINBERG, H.O.; BRECHTEL, G.; JOHNSON, A.; FINEBERG, N.; BARON, A.D. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. **J Clin Invest.**; v.94, p.1172-9, 1994.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.H.; EL-BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. **Eur. J. Pharmacol.** v.500, p. 299-313, 2004.

SWANSTON-FLAT, S.K.; DAY, C.; BAILEY, C.J.; FLATT, P.R. Traditional plant treatment for diabetes: studies in normal and Streptozotocin diabetic mice. **Diabetologia.**, v. 33, p. 462–464, 1990.

TABIT, C.E.; CHUNG, W.B.; HAMBURG, N.M.; VITA, J.A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. **Rev Endocr Metab Disord.**,v. 11, p. 61-74,2010.

TEICHERT, J.; TUEMMERS, T.; ACHENBACH, H.; PREISS, C.; HERMANN, R.; RUUS, P.; PREISS, R. Pharmacokinetics of α -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. **J Clin Pharmacol**, v.45, p.313-328, 2005.

TESFAMARIAM, B.; JAKUBOWSKI, J.; COHEN, R.A. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂. **Am J Physiol.**; v. 257, p.1327-33, 1989.

TEW, K.D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4313–4320, 1994.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulindependent diabetes mellitus. **N Engl J Med.**, v.329, p. 977-86, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulindependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **N Engl J Med.** v.329, p. 977-86,1993.

THIPPESWAMY, T.; MCKAY, J.S.; QUINN, J.P.; MORRIS, R. Nitric Oxide, a biological double-faced janus- Is this good or bad? **Histology and Histopathology** v. 21, p. 445-458, 2006.

TORQUATO, M. T. C. G.; JUNIOR, R. M. M.; VIANA, L. A. L.;SOUZA, R. A. H. G.;LANNA, C. M. M.; LUCAS, J. C. B.; BIDURIN, C.; FOSS, M. C. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), **Brazil. Sao Paulo Med J**, v. 121, p. 224-230, 2003.

TSAN, M.F.; CLARK, R.N.; GOYERT, S.M.; WHITE, J.E. Induction of TNF- α and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4. **Am J Physiol Cell Physiol**, , v.280, p.422–1430. 2001.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol.**, v. 552, p. 335-344, 2003.

U.K. Prospective Diabetes Study Group. UKPDS 28: a randomized trial of efficacy of early addition of metformin in sulfonylurea-treated type 2 diabetes.. **Diabetes Care.**, v. 21, p. 87-92, 1998.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. **Science.** v. 285, p. 1393–1396, 1999.

VAN ASBECK, B.S.; HOIDAL, J.; VERCELLOTTI, G.M. et al. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. **Science.**, v. 277, p. 756-9, 1985.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 143, p. 299-330, 1963.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova.**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VASTA, V. et al. Identification of a specific transport system for Larginine in human platelets. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v.206(3), p. 878-84, 1995.

VERSPOHL, E. J. Novel Pharmacological Approaches to the Treatment of Type 2 Diabetes. **Pharmacol. Rev.** v.64, p.188-237, 2012.

VIGNAIS, PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. **Cell Mol Life Sci.**, v.59, p. 1428–1459, 2002.

VINCENT, A.M.; STEVENS, M.J.; BACKUS, C.; MCLEAN, L.L.; FELDMAN, E.L. Cell culture modeling to test therapies against hyperglycemia-mediated oxidative stress and injury. **Antioxid Redox Signal.**, v.7, p.1494-1506, 2005.

VISHNU PRASAD, C.N.; ANJANA, T.; BANERJI, A.; GOPALAKRISHNAPILLAI, A. Gallic acid induces GLUT4 translocation and glucose uptake activity in 3T3-L1 cells. **FEBS Lett.**, v. 584, p. 531–536, 2010.

VUONG, T; MATINEAU, L.C.; RAMASSAMY, C.; MATAR, C.; HADDAD, P.S. Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 85, p. 956–965, 2007.

WAJCHENBERG, B.L. Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 46, p. 514-19, 2002.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F.; Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **J Agric Food Chem.**, p. 42, p. 1285-90, 1994.

WANG, P.H.; TSAI, M.J.; HSU, C.Y.; HSU, H.K.; WENG, C.F.; Toona sinensis Roem (Meliaceae) leaf extract alleviates hyperglycemia via altering adipose glucose transporter 4, **Food Chem. Toxicol.** v. 46, p. 2554–2560, 2008.

WANG, X.; MICHAELIS, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in aging neuroscience.**, v. 2, p. 12, 2010.

WARNER, B.B.; STUART, L.; GEBB, S.; WISPÉ, J.R. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. **Am J Physiol.** , v.271, p.150–158. 1996.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews, London**, v.23, n.4, p.209-240, 1997.
WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Diab. Care, v.27,p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS, S.B.; CUSCO, J.A.; RODDY, M.A.; JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, M.A. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Am Coll Cardiol.**, v.27, p.567-74, 1996.

WILLIAMS, S.B.; GOLDFINE, A.B.; TIMIMI, F.K.; TING, H.H.; RODDY, M.A.; SIMONSON, D.C. et al. Acute Hyperglycemia Attenuates Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans In Vivo. **Circulation.**;v.97,p.1695-701, 1998.

WILLIAMSON, G. Protective effects of fruits and vegetables in the diet. **Nutr Food.**, v. 96, p. 6-10. DOI: 10.1108/00346659610105806, 1996.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer Lett.**, v. 29;93, p. 113-20,1995.

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

XAVIER, F.E., DAVEL, A.P.; ROSSONI, L.V.; VASSALLO, D.V. Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. **Vascul Pharmacol**; v.40, p. 67-76. 2003.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu Rev Nutr**, v. 21, p.381–406, 2001.

YKI-JÄRVINEN, H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. **Hypertension**, v. 30, p.1144-9,1997.

YOKOYAMA, Y.; BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.K.; WHEAT, J.K.; CASH T.G.; FREEMAN, B.A.; PARKS, D.A. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. **Am J Physiol.**, v.258, p.564–570, 1990.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research, Amsterdam**, v.379, n.2, p.201-210, 1997.