



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

FRANCINEIDE FERNANDES COSTA

EFEITOS METABÓLICOS E VASCULARES DO MONONITRATO DE
ISOSSORBIDA E DO NITRATO DE SÓDIO EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS
TIPO 1

JOÃO PESSOA

2024

FRANCINEIDE FERNANDES COSTA

**EFEITOS METABÓLICOS E VASCULARES DO MONONITRATO DE
ISOSSORBIDA E DO NITRATO DE SÓDIO EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS
TIPO 1**

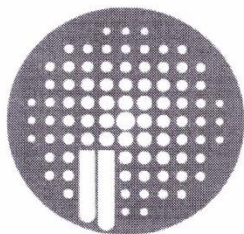
Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Doutora em Farmacologia apresentado ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Orientadora: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

Co-orientadora: Josiane de Campos Cruz

JOÃO PESSOA

2024



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 377ª (trecentésima septuagésima sétima) Tese de Doutorado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Francineide Fernandes Costa**, candidato(a) ao Título de "Doutor(a)" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia sete de junho do ano dois mil e vinte e quatro (07/06/2024), no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Francineide Fernandes Costa**, candidato(a) ao Título de "DOUTOR(A)" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Thyago Moreira de Queiroz, Ph.D em Farmacologia; Temilce Simões de Assis Cantalice, Ph.D em Farmacologia; José Luiz de Brito Alves, Ph.D em Neurociências; Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia; Josiane de Campos Cruz, Ph.D em Ciências, e Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, Ph.D em Bioquímica e Imunologia. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Pernambuco e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Banca, professor(a) Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Francineide Fernandes Costa**, a quem concedeu a palavra para que dissesse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Efeitos metabólicos e vasculares do mononitrato de isossorbida e do nitrato de sódio em camundongos diabéticos tipo 1". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO(A)**. Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente, achar-se o(a) examinado(a) **Francineide Fernandes Costa**, legalmente habilitado(a) a receber o Título de "DOUTOR(A)" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da C

Documento assinado digitalmente



TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE

Data: 11/06/2024 11:56:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Josiane de Campos Cruz (Coorientadora)

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz (Examinador)

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (Examinador)

Prof.^a Dr.^a Temilce Simões de Assis Cantalice (Examinador)

Prof.^a Dr.^a Marianna Vieira Sobral (Examinadora)

Francineide Fernandes Costa (Discente)

Documento assinado digitalmente



FRANCINEIDE FERNANDES COSTA

Data: 10/06/2024 15:11:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C838e Costa, Francineide Fernandes.

Efeitos metabólicos e vasculares do mononitrato de isossorbida e do nitrato de sódio em camundongos diabéticos tipo 1 / Francineide Fernandes Costa. - João Pessoa, 2024.

105 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.

Coorientação: Josiane de Campos Cruz.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Diabetes mellitus - Hiperglicemia. 2. Óxido nítrico. 3. Aorta. 4. Insulina. 5. Pressão arterial. I. Clemente, Tatjana Keesen de Souza Lima. II. Cruz, Josiane de Campos. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.379-008.64(043)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus que me sustentou e deu forças para vencer cada etapa. Obrigada Pai, por acalmar a minha alma em meio a tantas aflições e nutrir o meu espírito com a tua palavra e santa eucaristia. Eu não me canso de adorá-lo e bendizê-lo por todas as maravilhas que fizestes em meu favor. Obrigada por cada prece atendida, eu te amo muito Jesus. Agradeço ainda à mãe do nosso Senhor e também minha, por interceder sempre a Jesus pela minha vida. Obrigada, mãezinha do céu!

À minha família, aos meus pais Francisco e Damiana que sempre cuidaram de mim e me ensinaram a ser a mulher que eu sou hoje. Vocês foram a base para cada conquista alcançada na minha vida. Obrigada por me receberem com amor, sorriso e carinho a cada visita que vos faço, cheia de saudade. Agradeço à minha irmã, Deize, que torce pelo meu sucesso e se orgulha de quem eu me tornei. Agradeço também ao novo membro da família, Estevinho, pelo fato de existir; titia é uma pessoa mais feliz por conhecer você e te ter por perto. Ao meu marido, Everton, que está sempre disponível para me ajudar no que for preciso. Você me acompanhou dentro e fora do laboratório, algumas vezes você me viu chorar, desesperada porque as coisas não iam de acordo como eu planejei, e com seu abraço me acalmou. Obrigada por vibrar junto comigo em cada conquista e segurar minha mão nos momentos ruins e bons da nossa caminhada. Ao meu bebê, Eduardo, que está crescendo na barriga da mamãe; filhinho, você já é muito amado pelos seus papais. Amo muito todos vocês.

À minha orientadora Prof^a Tatjana Keesen e co-orientadora Prof^a Josiane Cruz, que me orientaram nessa jornada desafiadora. Em especial, agradeço à Prof^a Josiane pela atenção e total disponibilidade. Foram 6 anos juntas e agora algumas características acadêmicas minhas foram herdadas de você: a maneira de escrever, a forma de conduzir uma reunião, a responsabilidade com os experimentos. Eu acho que tive a melhor mestre e quando me perguntam “por que Josi?” eu respondo “porque ela se importa”. No mestrado eu não lhe escolhi, na verdade, nós não nos escolhemos, como a senhora já disse uma vez: “foi uma grata surpresa”, e isso é recíproco. Mas para o doutorado, eu escolhi permanecer e foi uma escolha feliz e acertada, apesar de eu não estar mais em dedicação exclusiva, não perdemos em qualidade e fizemos um ótimo trabalho. Desejo que venham muitos alunos dedicados e habilidosos para os próximos projetos e muitas publicações nível A1. Deus esteja com você!

Aos meus companheiros de laboratório, em especial, Rayanelle, Thalita, Giovanna, Samuel, Rodrigo, Juliana, Clara, Camilly, Arthur, Katarina e Maria Victória que me ajudaram sempre com bom ânimo e disposição. Eu desejo que vocês cresçam profissionalmente e

pessoalmente, que possamos comemorar muitas vitórias desse grupo e sair bastante por aí nos deliciando nas cafeterias/docerias de João Pessoa.

Às técnicas do Laboratório do Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), Clênia e Sara, que extrapolaram a função profissional e entenderam minhas angústias, acolheram-me nos meus problemas de vida, estando dispostas a me entender não só como aluna de pós-graduação, mas como pessoa. Sara, eu amo a sua sinceridade e Clênia, eu amo a sua calma, vocês foram o equilíbrio perfeito para minha trajetória nesse laboratório. Com certeza, nunca me esquecerei de vocês exceto se estiver bem velhinha e com Alzheimer.

Aos professores da área de Fisiologia/Farmacologia da Universidade Federal da Paraíba – Prof^a Camille Balarini, Prof^a Maria de Socorro, Prof^o José Luiz, Prof^o Valdir Braga, Prof^o Isac de Medeiros pelo suporte intelectual e laboral para o desenvolvimento desse doutorado. Agradeço especialmente à Prof^a Luciene Simões do Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB e ao Prof^o Gustavo dos Santos do Departamento de Ciências Fisiológicas/UFSC pela ajuda na execução e interpretação dos meus experimentos.

À Universidade Federal da Paraíba, agradeço pelo suporte acadêmico e infraestrutura disponibilizada. Aos órgãos de fomento, FAPESq/PB, CAPES e CNPq, por todo o apoio financeiro concedido ao desenvolvimento dessa pesquisa.

RESUMO

O diabetes está associado a diversas comorbidades cardiometabólicas que podem estar associadas à disfunção endotelial e redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Além disso, há evidências de que a suplementação dietética com nitratos, doadores de NO, promovem efeitos antidiabetogênicos. Em estudos anteriores, foi observado que o nitrato de sódio inorgânico (NaNO_3) promoveu redução da glicose sanguínea, aumento do fluxo sanguíneo pancreático e redução do estresse oxidativo em animais diabéticos. No entanto, os efeitos antidiabéticos dos nitratos orgânicos são pouco conhecidos. Dentre os nitratos orgânicos disponíveis comercialmente, destaca-se o mononitrato de isossorbida (ISMN, em inglês) por apresentar maior biodisponibilidade sistêmica em comparação a outros, tais como a nitroglicerina e o dinitrato de isossorbida. Nesse estudo, nosso objetivo foi avaliar os efeitos metabólico e vascular do ISMN e compará-los aos efeitos do NaNO_3 em camundongos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Para isso, foi realizada a indução do DM1 através da injeção de estreptozotocina (STZ i.p. 50 mg/Kg, 5 dias) em camundongos machos C57BL6 e confirmado por glicose sanguínea em jejum > 250 mg/dL. Os animais receberam ISMN (10 mg/Kg, v.o., gavagem), NaNO_3 (85 mg/L, v.o., diluído na água de beber) ou água sem suplementação durante 14 dias. Em seguida, foram avaliados a glicose sanguínea e urinária, o consumo de ração e água, o volume urinário, a concentração sérica de insulina, a concentração sérica e urinária de nitrito, a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, a pressão arterial não invasiva através de pletismografia de cauda, a reatividade vascular aórtica em resposta à fenilefrina (PHE), nitroprussiato de sódio (NPS) e acetilcolina (ACh). Por fim, foram avaliadas a biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) através do ensaio de fluorescência com dihidroetídio (DHE, 5 μM) e de NO com diacetato de 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína (DAF-FM, 10 μM) em aortas torácicas. Os dados foram analisados pelo teste Two-way através do software Graphpad Prism (v. 6.0), $p < 0,05$. Os protocolos foram devidamente aprovados pelo CEUA/UFPB sob os nº 7236120121 e nº 9387160419. Os resultados mostraram que o ISMN ($276,5 \pm 33,10$ vs $498,43 \pm 21,18$ mg/dL, $n=7$) e o NaNO_3 ($372,43 \pm 24,30$ vs $498,43 \pm 21,18$ mg/dL, $n=7$) diminuíram a glicose sanguínea em camundongos com DM1, porém essa redução foi mais pronunciada após o tratamento com o ISMN. Ambos os nitratos, ISMN ($29,18 \pm 13,72$ vs $91,64 \pm 5,52$ mmol/dL, $n=6$) e NaNO_3 ($42,37 \pm 12,45$ vs $91,64 \pm 5,52$ mmol/dL, $n=5$) reduziram similarmente a glicose urinária em camundongos com DM1. Além disso, o diabetes/STZ aumentou a ingestão de água ($11,35 \pm 0,87$ vs $4,39 \pm 0,49$ ml/10g/24h, $n=7$) que foi reduzida após ambos os tratamentos com ISMN

($7,48 \pm 1,22$ ml/10g/24h, n=7) ou NaNO_3 ($6,75 \pm 1,64$ ml/10g/24h, n=7). O diabetes/STZ também aumentou o consumo de ração ($3,66 \pm 0,16$ vs $1,55 \pm 0,12$ g/10g/24h, n=7) que foi reduzido após ambos os tratamentos com ISMN ($2,74 \pm 0,18$ g/10g/24h, n=7) ou NaNO_3 ($2,63 \pm 0,35$ g/10g/24h, n=7). O diabetes/STZ aumentou o volume urinário ($0,54 \pm 0,06$ vs $0,15 \pm 0,02$ mL/10g/4h, n=7) que foi reduzido após ambos os tratamentos com ISMN ($0,30 \pm 0,03$ mL/10g/4h, n=6) ou NaNO_3 ($0,36 \pm 0,06$ mL/10g/4h, n=7). O diabetes/STZ aumentou a intolerância à glicose ($p < 0,0001$) que foi reduzida similarmente após ambos os tratamentos com ISMN ($p < 0,0001$) ou NaNO_3 ($p = 0,02$). O diabetes/STZ não desenvolveu resistência à insulina ($p = 0,74$), mas ambos os tratamentos com ISMN ($p = 0,01$) ou NaNO_3 ($p = 0,03$) aumentaram a sensibilidade à insulina nos camundongos com DM1. O diabetes/STZ reduziu a concentração sérica de nitrito ($37,04 \pm 7,84$ vs $68,13 \pm 6,87$ mM, n=5) que foi aumentada após ambos os tratamentos com ISMN ($87,64 \pm 8,98$ mM, n=7) ou NaNO_3 ($81,79 \pm 7,84$ mM, n=7). O diabetes/STZ também reduziu a concentração urinária de nitrito ($25,39 \pm 7,79$ vs $68,70 \pm 9,29$ mM, n=5) que foi aumentada após ambos os tratamentos com ISMN ($68,21 \pm 6,18$ mM, n=7) ou NaNO_3 ($57,98 \pm 12,30$ mM, n=7). O diabetes/STZ reduziu a concentração sérica de insulina ($65,04 \pm 3,14$ vs $99,90 \pm 7,34$ $\mu\text{IU/mL}$, n=5) que foi aumentada após ambos os tratamentos com ISMN ($82,47 \pm 3,80$ $\mu\text{IU/mL}$, n=5) ou NaNO_3 ($89,63 \pm 8,46$ $\mu\text{IU/mL}$, n=6). Os tratamentos com ISMN ou NaNO_3 também reduziram a vasoconstrição em resposta à PHE ($p = 0,003$ e $0,002$ respectivamente) e aumentaram o vasorrelaxamento em resposta ao NPS ($p = 0,007$ e $0,0003$ respectivamente), mas não à ACh ($p = 0,69$ e $0,48$ respectivamente) em aortas de camundongos com DM1. Ademais, ambos os tratamentos com ISMN ou NaNO_3 reduziram a intensidade de fluorescência ao DHE (ROS) ($p < 0,0001$ e $p = 0,001$ respectivamente) e aumentaram a fluorescência ao DAF-FM (NO) ($p = 0,012$ e $0,016$ respectivamente) em aortas de camundongos com DM1. Por fim, o diabetes/STZ aumentou a pressão arterial média ($114,5 \pm 0,90$ vs $97,91 \pm 1,09$ mmHg, n=7) que foi reduzida após ambos os tratamentos com ISMN ($106,7 \pm 1,07$ mmHg, n=6) ou NaNO_3 ($108,8 \pm 1,10$ mmHg, n=7). Em conclusão, o ISMN exibiu um efeito anti-hiperglicêmico mais pronunciado em comparação ao NaNO_3 , mas ambos os nitratos promoveram benefícios metabólicos e vasculares semelhantes, promovendo efeitos hipotensores e antioxidantes em camundongos com DM1.

Palavras-chave: Hiperglicemia, óxido nítrico, aorta, insulina, pressão arterial.

ABSTRACT

Diabetes is associated with several cardiometabolic comorbidities that may be associated with endothelial dysfunction and reduced bioavailability of nitric oxide (NO). Furthermore, there is evidence that dietary supplementation with nitrates, NO donors, promotes antidiabetogenic effects. In previous studies, it was observed that inorganic sodium nitrate (NaNO_3) promoted a reduction in blood glucose, an increase in pancreatic blood flow and a reduction in oxidative stress in diabetic animals. However, the antidiabetic effects of organic nitrates are poorly known. Among the commercially available organic nitrates, isosorbide mononitrate (ISMN) stands out as it has greater systemic bioavailability compared to others, such as nitroglycerin and isosorbide dinitrate. In this study, our objective was to evaluate the metabolic and vascular effects of ISMN and compare them to the effects of NaNO_3 in mice with type 1 diabetes mellitus (T1DM). For this purpose, T1DM was induced through the injection of streptozotocin (STZ i.p. 50 mg/Kg, 5 days) in male C57BL6 mice and confirmed by fasting blood glucose > 250 mg/dL. The animals received ISMN (10 mg/Kg, p.o., gavage), NaNO_3 (85 mg/L, p.o., diluted in drinking water) or water without supplementation for 14 days. Then, blood and urinary glucose, food and water intake, urinary volume, serum insulin concentration, serum and urinary nitrite concentration, insulin sensitivity and glucose tolerance, non-invasive blood pressure were evaluated by tail cuff plethysmography, aortic vascular reactivity in response to phenylephrine (PHE), sodium nitroprusside (SNP) and acetylcholine (ACh). Finally, the bioavailability of reactive oxygen species (ROS) was evaluated by fluorescence assay with dihydroethidium (DHE, 5 μM) and NO with 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein diacetate (DAF-FM, 10 μM) in thoracic aortas. The data were analyzed using the Two-way test, Graphpad Prism software (v. 6.0), $p < 0.05$. The protocols were approved by CEUA/UFPB under n° 7236120121 and n° 9387160419. The results showed that ISMN (276.5 ± 33.10 vs 498.43 ± 21.18 mg/dL, $n=7$) and NaNO_3 treatments (372.43 ± 24.30 vs 498.43 ± 21.18 mg/dL, $n=7$) decreased blood glucose in T1DM mice, but this reduction was more pronounced after ISMN treatment. Both nitrates, ISMN (29.18 ± 13.72 vs 91.64 ± 5.52 mmol/dL, $n=6$) and NaNO_3 (42.37 ± 12.45 vs 91.64 ± 5.52 mmol/dL, $n=5$) similarly reduced urinary glucose in T1DM mice. Furthermore, diabetes/STZ increased water intake (11.35 ± 0.87 vs 4.39 ± 0.49 ml/10g/24h, $n=7$) which was reduced after both ISMN (7.48 ± 1.22 ml/10g/24h, $n=7$) or NaNO_3 treatments (6.75 ± 1.64 ml/10g/24h, $n=7$). Diabetes/STZ also increased food intake (3.66 ± 0.16 vs 1.55 ± 0.12 g/10g/24h, $n=7$) which was reduced after both ISMN (2.74 ± 0.18 g/10g/24h,

n=7) or NaNO₃ treatments (2.63 ± 0.35 g/10g/24h, n=7). Diabetes/STZ increased urinary volume (0.54 ± 0.06 vs 0.15 ± 0.02 mL/10g/4h, n=7) which was reduced after both ISMN (0.30 ± 0.03 mL/10g/4h, n=6) or NaNO₃ treatments (0.36 ± 0.06 mL/10g/4h, n=7). Diabetes/STZ increased glucose intolerance ($p < 0.0001$) which was similarly reduced after both ISMN ($p < 0.0001$) or NaNO₃ treatments ($p = 0.02$). Diabetes/STZ did not develop insulin resistance ($p = 0.74$), but both treatments with ISMN ($p = 0.01$) or NaNO₃ ($p = 0.03$) increased insulin sensitivity in T1DM mice. Diabetes/STZ reduced serum nitrite concentration (37.04 ± 7.84 vs 68.13 ± 6.87 mM, n=5) which was increased after both ISMN (87.64 ± 8.98 mM, n=7) or NaNO₃ treatments (81.79 ± 7.84 mM, n=7). Diabetes/STZ also reduced urinary nitrite concentration (25.39 ± 7.79 vs 68.70 ± 9.29 mM, n=5) which was increased after both ISMN (68.21 ± 6.18 mM, n=7) or NaNO₃ treatments (57.98 ± 12.30 mM, n=7). Diabetes/STZ reduced serum insulin concentration (65.04 ± 3.14 vs 99.90 ± 7.34 μ IU/mL, n=5) which was increased after both ISMN (82.47 ± 3.80 μ IU/mL, n=5) or NaNO₃ treatments (89.63 ± 8.46 μ IU/mL, n=6). ISMN or NaNO₃ treatments also reduced vasoconstriction in response to PHE ($p = 0.003$ and 0.002 respectively) and increased vasorelaxation in response to SNP ($p = 0.007$ and 0.0003 respectively), but not to ACh ($p = 0.69$ and 0.48 respectively) in aortas from T1DM mice. Furthermore, both treatments with ISMN or NaNO₃ reduced the fluorescence intensity at DHE (ROS) ($p < 0.0001$ and $p = 0.001$ respectively) and increased the fluorescence at DAF-FM (NO) ($p = 0.012$ and 0.016 respectively) in aortas from T1DM mice. Finally, diabetes/STZ increased mean arterial pressure (114.5 ± 0.90 vs 97.91 ± 1.09 mmHg, n=7) which was reduced after both ISMN (106.7 ± 1.07 mmHg, n=6) or NaNO₃ treatments (108.8 ± 1.10 mmHg, n=7). In conclusion, ISMN exhibited a more pronounced antihyperglycemic effect relative to NaNO₃, both conferred similar metabolic and vascular benefits, promoting hypotensive and antioxidant effects in T1DM mice.

Keywords: Hyperglycemia. Nitric oxide. Aorta. Insulin. Blood pressure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese e secreção de insulina. A insulina é sintetizada na célula β pancreática a partir da pré-pró-insulina, sendo secretada principalmente em resposta ao aumento intracelular de glicose. GLUT2: transportador de glicose 2; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; K_{ATP} : canal de potássio sensível à ATP.	33
Figura 2: Vias alternativas do metabolismo glicolítico. Em condições de hiperglicemia, vias alternativas de processamento da glicose podem ser ativadas, tais como a via dos polióis, da hexosamina e do metilglioxal. Na via do poliol, a glicose em excesso é metabolizada à sorbitol e à frutose (1). Na via da hexosamina, a frutose-6-fosfato é desviada da glicólise aumentando os níveis de O-GlcNAc (2). Na via do metilglioxal, a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) aumenta a formação de metilglioxal e ativação da proteína quinase C (PKC) (3). A ativação dessas vias levam à produção de AGEs, estresse oxidativo e glicolítico.....	44
Figura 3: Estrutura química do nitrato de sódio ($NaNO_3$). A: Estrutura trigonal plana do $NaNO_3$. B: Orientação espacial em célula única contendo duas moléculas de $NaNO_3$	49
Figura 4: Estrutura química do mononitrato de isossorbida (IMSN).....	50
Figura 5: Delineamento experimental	54
Figura 6: Ilustração dos principais componentes utilizados para o desenvolvimento do protocolo de reatividade vascular da aorta de camundongos.	59
Figura 7: Esquema de construção das curvas concentração-resposta à PHE, ACh e NPS em anéis aórticos de camundongos.	59
Figura 8: Registro não invasivo da pressão arterial. Painel A: Foto do pletismógrafo de cauda (Insight, v. 2.11, Ribeirão Preto/SP) para avaliação não invasiva da pressão arterial sistêmica por pletismografia de cauda. Camundongo posicionado no interior do contensor de acrílico para a realização da pletismografia de cauda, a cauda encontra-se no interior do estrangulador e sensor do aparelho. Painel B: Print do computador, mostrando a tela com o registro da pressão arterial sistólica e diastólica de um animal diabético.	62
Figura 9: Efeito do $NaNO_3$ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na glicose sanguínea em jejum de camundongos após indução de DM1 com STZ e após tratamento $NaNO_3$ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, $NaNO_3$ e ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/ $NaNO_3$	65
Figura 10: Efeito do $NaNO_3$ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na glicose urinária (mmol/dL) de camundongos. @vs ISMN, *vs controle, $NaNO_3$ e ISMN, #vs diabetes.....	66

- Figura 11:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) no peso corporal (g) de camundongos não diabéticos e diabéticos. *vs Δ controle, ΔNaNO_3 e ΔISMN , ~vs mesmo grupo antes do tratamento. Δ = Peso após o tratamento – peso antes do tratamento.67
- Figura 12:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na ingestão de água (ml/10g/24h) (painel A) e consumo de ração (g/10g/24h) (painel B). *vs controle, NaNO_3 e ISMN, ^vs controle, #vs diabetes.....68
- Figura 13:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) no volume urinário (mL/10g/4h) cumulativo (painel A) e total (painel B) de camundongos após injeção ip. de salina (NaCl 0,9 %, 2 mL). *vs controle, NaNO_3 e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes.....69
- Figura 14:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) no decaimento da glicemia de camundongos durante teste de tolerância à glicose (GTT). A área sob a curva é mostrada inferiormente à direita. *vs controle, NaNO_3 e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/ NaNO_371
- Figura 15:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a glicemia de camundongos durante teste de tolerância à insulina (ITT) (painel A) e constante de decaimento de glicose durante ITT (kITT, $\%.\text{min}^{-1}$) (painel B). @vs NaNO_3 , ^vs controle, +vs ISMN, *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.73
- Figura 16:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a concentração de nitrito sérico (painel A) e urinário (painel B). *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.75
- Figura 17:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a concentração sérica de insulina. *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.76
- Figura 18:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a vasoconstrição de aorta sem endotélio funcional isolada de camundongos em resposta à fenilefrina (PHE, 100 pM – 20 μM). A: curva concentração-resposta à PHE. B: efeito contrátil máximo em resposta à PHE ($E_{\text{máx}}$). C: potência (pEC_{50}) para PHE. ^vs controle, @vs NaNO_3 , *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.....77
- Figura 19:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre vasorrelaxamento de aorta sem endotélio funcional isolada de camundongos em resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS, 10 pM – 20 μM). A: curva concentração-resposta à NPS. B: efeito relaxante máximo em resposta ao NPS ($E_{\text{máx}}$). C: potência (pEC_{50}) para NPS. ^vs controle, @vs NaNO_3 , +vs ISMN, *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/ NaNO_379
- Figura 20:** Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre vasorrelaxamento de aorta com endotélio funcional isolada de camundongos em resposta à acetilcolina (ACh, 100 pM – 20 μM). A: curva concentração-resposta à ACh. B: efeito relaxante máximo em resposta à ACh

($E_{\text{máx}}$). C: potência (pEC_{50}) para ACh. $\wedge$ vs controle, +vs ISMN, *vs controle, $NaNO_3$ e ISMN.

.....81

Figura 21: Efeito do $NaNO_3$ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a intensidade de fluorescência de DAF-FM (biodisponibilidade de NO) e DHE (biodisponibilidade de ânion superóxido/ROS) em aorta de camundongos. A: imagens representativas de artéria aorta de camundongos marcadas com diacetato de 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína (DAF-FM diacetato) (10 μ M, em verde), 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, em azul) e sobreposição das duas fluorescências (Merged). B: imagens representativas de artéria aorta de camundongos marcadas com dihidroetídio (DHE - 5 μ M, em vermelho), DAPI (em azul) e sobreposição das duas fluorescências (Merged). C: média de intensidade de fluorescência do DAF-FM diacetato. D: média de intensidade de fluorescência do DHE. $\wedge$ vs controle, *vs controle, $NaNO_3$ e ISMN, #vs diabetes.84

Figura 22: Efeito do $NaNO_3$ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), diastólica (PAD, mmHg) e média (PAM, mmHg) de camundongos. *vs controle, $NaNO_3$ e ISMN, #vs diabetes.86

Figura 23: Efeitos metabólicos e vasculares induzidos por ISMN e $NaNO_3$ em camundongos diabéticos tipo 1 (DM1).....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de insulina e suas principais propriedades farmacocinéticas.	36
Tabela 2: Sequência de concentrações de fenilefrina (PHE), acetilcolina (ACh) e nitroprusiato de sódio (NPS) utilizadas na reatividade vascular de aorta de camundongos.....	59
Tabela 3: Valores de glicose sanguínea em jejum (mg/dL) de camundongos após indução de DM1 com STZ e após tratamento com NaNO ₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO ₃ e ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/NaNO ₃ . Valores são apresentados como média ± EPM.	65
Tabela 4: Valores de peso corporal (g) de camundongos antes e após o tratamento com NaNO ₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). Δ = Peso após o tratamento – peso antes do tratamento. *vs Δcontrole, ΔNaNO ₃ e ΔISMN, ~vs mesmo grupo antes do tratamento. Valores são apresentados como média ± EPM.	67
Tabela 5: Valores do volume urinário (mL/10g/4h) antes e após tratamento dos camundongos não diabéticos e diabéticos com NaNO ₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO ₃ e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes. Valores são apresentados como média ± EPM.	70
Tabela 6: Valores de glicemia (mg/dL) durante teste de tolerância à glicose (GTT) após tratamento de camundongos diabéticos com NaNO ₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO ₃ e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/NaNO ₃ . Valores são apresentados como média ± EPM.	71
Tabela 7: Valores da constante de decaimento de glicose durante teste de tolerância à insulina (kITT) (%.min ⁻¹) após tratamento de camundongos diabéticos com NaNO ₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO ₃ e ISMN, #vs diabetes. Valores são apresentados como média ± EPM.....	74
Tabela 8: Valores de eficácia (E _{máx}) e potência (pEC50) para fenilefrina (PHE, 100 pM – 20 μM) em anéis de artéria aorta sem endotélio isolada de camundongos. ^vs controle, @vs NaNO ₃ , *vs controle, NaNO ₃ e ISMN, #vs diabetes. Valores são apresentados como média ± EPM.	78
Tabela 9: Valores de eficácia (E _{máx}) e potência (pEC50) ao nitroprusiato de sódio (NPS, 10 pM – 20 μM) em anéis de artéria aorta sem endotélio funcional isolada de camundongos. ^vs controle, +vs ISMN, @vs NaNO ₃ , *vs controle, NaNO ₃ e ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/NaNO ₃ . Valores são apresentados como média ± EPM.....	80

Tabela 10: Valores de eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pEC50) para acetilcolina (ACh, 100 pM – 20 μ M) em anéis de artéria aorta com endotélio isolada de camundongos. ^vs controle, *vs controle, NaNO₃ e ISMN. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM.82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: adenosina monofosfato
AGEs: produtos finais de glicação avançada
ANG: angiotensina
AT1R: receptor tipo 1 de ANG II
ATP: adenosina trifosfato
cGMP: monofosfato cíclico de guanosina
DAF-FM diacetato: 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína
DAG: diacilglicerol
DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DHAP: dihidroxiacetona fosfato
DHE: dihidroetídio
DM1: diabetes mellitus tipo 1
DM2: diabetes mellitus tipo 2
ECA: enzima conversora de angiotensina
ECR: ensaio clínico randomizado
GK: glicoquinase
GLP-1R: receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GPD2: glicerol-3-fosfato desidrogenase
GSH-Px: glutathione peroxidase
GTT: teste de tolerância à glicose
HbA1c: hemoglobina glicada
IMC: índice de massa corpórea
IR: receptor de insulina
IRS: substrato do receptor de insulina
ISDN: dinitrato de isossorbida
ISMN: mononitrato de isossorbida
ITT: teste de tolerância à insulina
kITT: taxa da constante de decaimento de glicose
L-NAME: L-NG-nitro-L-arginina metil éster
MDA: malondialdeído
NaNO₃: nitrato de sódio
NDBP: 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano

NO: óxido nítrico

NO_2^- : nitrito

NO_3^- : nitrato

NOS: óxido nítrico sintase

cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

NTG: nitroglicerina

ONOO^- : peroxinitrito

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PAS: pressão arterial sistólica

PETN: tetranitrato de pentaeritrina

PTP1B: proteína tirosina fosfatase 1 B

RAGE: receptores de produtos finais de glicação avançada

RI: resistência à insulina

ROS: espécies reativas de oxigênio

SGLT-2: cotransportador de sódio-glicose-2

sGC: guanilato ciclase solúvel

SRAA: sistema renina-angiotensina aldosterona

STZ: estreptozotocina

TC: tampão citrato

UTP: uridina trifosfato

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. REFERENCIAL TEÓRICO	30
3.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)	30
3.2 Tratamento farmacológico para diabetes mellitus tipo 1	32
3.2.1 Síntese e liberação da insulina: ação no receptor	32
3.2.2 Insulinoterapia - breve histórico	34
3.2.3 Antidiabéticos orais e injetáveis	38
3.3 Modelo animal de camundongo diabético induzido por estreptozotocina (STZ)	40
3.4 Complicações vasculares induzidas por hiperglicemia	41
3.5 Relação entre óxido nítrico e diabetes mellitus	46
3.6 Utilização de nitratos em modelos animais diabéticos	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Animais e local da pesquisa	52
4.2 Indução do DM1:	52
4.3 Delineamento experimental:	53
4.4 Avaliação de glicose sanguínea em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	54
4.5 Avaliação da concentração de glicose urinária em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	55
4.6 Avaliação do peso corporal, consumo de ração e ingestão de água em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	55
4.7 Avaliação do volume urinário em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	55
4.8 Avaliação de tolerância à glicose em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	56
4.9 Avaliação de tolerância à insulina em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	56
4.10 Avaliação da concentração sérica e urinária de NO em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	56

4.11 Avaliação da concentração sérica de insulina em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	57
4.12 Avaliação da reatividade vascular da artéria aorta de camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	57
4.13 Avaliação das espécies reativas de oxigênio nas artérias aortas torácicas de camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	60
4.14 Avaliação da biodisponibilidade de NO em artérias aortas torácicas de camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	61
4.15 Avaliação não invasiva da pressão arterial em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO ₃ :	61
4.16 Drogas:	63
4.17 Análise Estatística	63
5. RESULTADOS	64
5.1 Glicose sanguínea em jejum	64
5.2 Glicose urinária	66
5.3 Peso corporal	66
5.4 Consumo de água e ração	68
5.5 Volume urinário	68
5.6 Tolerância à glicose	70
5.7 Tolerância à insulina	72
5.8 Concentração de nitrito sérico e urinário	74
5.9 Concentração sérica de insulina	76
5.10 Reatividade vascular em aortas de camundongos diabéticos	76
5.11 Biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico em aorta	82
5.12 Pressão arterial sistêmica	85
6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÃO	94
8. REFERÊNCIAS	96
ANEXOS	5
ANEXO A – Certificado de aprovação pelo CEUA/UFPB dos experimentos envolvendo o tratamento com mononitrato de isossorbida (ISMN)	5
ANEXO B – Certificado de aprovação pelo CEUA/UFPB dos experimentos envolvendo o tratamento com nitrato de sódio (NaNO ₃)	6

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, na qual há destruição progressiva das células β pancreáticas, as quais sintetizam e liberam o hormônio insulina, resultando em hiperglicemia crônica e dependência de insulina exógena (GIWA et al., 2020; GREGORY et al., 2022). A incidência do DM1 tem aumentado mundialmente, de acordo com a *International Diabetes Federation* em 2022 eram 8,75 milhões de indivíduos em todo o mundo com a doença (GREGORY et al., 2022). A previsão é de que em 2040 haja um aumento para 13,5 – 17,4 milhões nos casos do DM1 no mundo, com maior crescimento em países de baixa e média renda (GREGORY et al., 2022). No Brasil em 2022 eram 588.800 indivíduos vivendo com essa doença e a estimativa é de que aumente para 1,8 milhão em 2040 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2022). DM1 representa 10 a 15 % dos casos de diabetes, e apesar de não ser predominante dentre as DM, o seu tratamento é de alto custo, o que acaba comprometendo o controle adequado da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022a).

O DM1 é diagnosticado mais frequentemente em crianças e adolescentes, embora possa também ser diagnosticado mais tardiamente em adultos jovens (RODAKCI et al., 2022). Em indivíduos geneticamente predispostos, algumas condições como crescimento acelerado, sobrepeso e deficiências nutricionais podem produzir exaustão das células β e destruição autoimune secundária culminando com o desenvolvimento e a progressão para DM1 (LAMB et al., 2008; REWERS; DAVIS; LUDVIGSSON, 2016). Historicamente, a terapia para o DM1 faz-se através da tríade: insulino terapia, alimentação adequada e atividade física (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022b). No entanto, terapias complementares também podem ser benéficas para indivíduos com DM1, melhorando o controle glicêmico e reduzindo a dose diária de insulina (OCHOA M; GARCIA B, 2019).

É conhecido que a hiperglicemia pode prejudicar a produção de óxido nítrico (NO) endotelial (DING et al., 2000; GUO et al., 2000), o que pode estar associado ao desenvolvimento de disfunção endotelial e complicações vasculares (BJORNSTAD, 2015; MASHA et al., 2011; SRINIVASAN et al., 2004). Além disso, há evidências da redução na atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) constitutiva em ilhotas pancreáticas (FONOVICH DE SCHROEDER et al., 1998) bem como uma redução na expressão gênica de eNOS em células endoteliais da aorta (SHAMSALDEEN et al., 2018; SHAMSALDEEN; LIONE; BENHAM, 2020) de ratos com DM1.

Alguns estudos têm mostrado o benefício metabólico e vascular da suplementação dietética com nitratos, doadores de NO, em modelos animais com DM1 (indução com estreptozotocina, STZ) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2, indução com STZ + dieta hiperlipídica), tais como, redução da glicose sanguínea, aumento na biodisponibilidade de insulina, aumento na expressão do transportador de glicose GLUT4 em tecido muscular esquelético e adiposo, ação antioxidante e vasorrelaxante (FERNANDES-COSTA et al., 2023; GHEIBI et al., 2018; KEYHANMANESH et al., 2018; OGHBAEI et al., 2020; TIAN et al., 2020; XIE et al., 2020). Possivelmente, esses efeitos são provenientes da conversão de NO_3^- para NO (GHEIBI et al., 2018; LUNDBERG; CARLSTRÖM; WEITZBERG, 2018).

A maioria das evidências científicas que estudam os efeitos de nitratos no tratamento de animais diabéticos apontam para os benefícios cardiometabólicos do nitrato de sódio inorgânico (NaNO_3) em ratos ou camundongos com DM2 (BAHADORAN et al., 2015; GHEIBI et al., 2018; KHALIFI et al., 2015; OHTAKE et al., 2015; TIAN et al., 2020). Existem poucos estudos avaliando os efeitos de nitratos orgânicos no diabetes mellitus e a escassez científica aumenta quando essa abordagem envolve o DM1. Alguns nitratos orgânicos apresentam a vantagem de serem medicamentos disponíveis comercialmente e são utilizados na clínica para o tratamento de isquemias cardíacas e infarto agudo do miocárdio (DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017; KWON; ROSENDORFF, 2017; LI; WANG, 2013; ZHAO et al., 2016). Os nitratos orgânicos mais utilizados na clínica são o mononitrato de isossorbida (ISMN, em inglês), dinitrato de isossorbida (ISDN, em inglês) e nitroglicerina (NTG) (KWON; ROSENDORFF, 2017).

O ISMN é um medicamento antianginal à base de nitrato de longa ação, atua liberando NO e estimulando a guanilato ciclase, aumentando o monofosfato de guanosina cíclico e promovendo vasodilatação (DAIBER; MÜNZEL, 2015). Esse nitrato possui maior tempo de meia vida, ou seja uma ação mais prolongada, quando comparado à NTG e não possui o metabolismo de primeira passagem pelo fígado como acontece com o ISDN o que garante a sua maior biodisponibilidade sistêmica (ABSHAGEN, 1992; NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2018). Estudo anterior não observou efeito antidiabetogênico em ratos com DM1/STZ tratados com ISMN na dose de 75 mg/Kg (SCHUHMACHER et al., 2011). No entanto, a administração de ISMN na dose de 10 mg/Kg apresentou efeito anti-inflamatório em camundongos DM1/STZ com esquistossomose e antialodínico em camundongos DM1/STZ com dor neuropática diabética (ALHUSSEINY et al., 2017; VARANI et al., 2016). Nesse contexto a nossa hipótese é de que o nitrato orgânico ISMN na dose de 10 mg/Kg promova efeitos metabólicos e vasculares benéficos em camundongos DM1 (modelo STZ) comparado ao nitrato inorgânico NaNO_3 .

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do doador orgânico de óxido nítrico mononitrato de isossorbida na modulação das alterações vasculares e metabólicas observadas em camundongos com diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ) e compará-lo ao nitrato de sódio.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar em camundongos controle e diabéticos STZ os efeitos do tratamento com mononitrato de isossorbida e compará-los ao nitrato de sódio:

- 2.2.1 Na glicose basal sanguínea e urinária;
- 2.2.2 No peso corporal, ingestão de água e consumo de ração;
- 2.2.3 No volume urinário;
- 2.2.4 Na intolerância à glicose e à insulina;
- 2.2.5 Na concentração de nitrito sérico e urinário;
- 2.2.6 Na concentração de insulina sérica;
- 2.2.7 Na reatividade vascular em aorta;
- 2.2.8 Na biodisponibilidade de ânion superóxido (ROS) e óxido nítrico (NO) em aorta;
- 2.2.9 No valor da pressão sistêmica arterial.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

Em 1997, a *American Diabetes Association* classificou o DM1 em diabetes tipo 1A (DM1A) ou imunomediado e diabetes tipo 1B ou idiopático (DM1B) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2024; GUARNOTTA et al., 2018; RODACKI et al., 2023). O DM1A ocorre geralmente na infância e adolescência e é caracterizado pela destruição autoimune das células β pancreáticas, mediada por células T, levando à deficiência absoluta de insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2024). Já o DM1B é incomum, sendo mais frequentemente diagnosticado em indivíduos de ascendência africana ou asiática; além disso, é caracterizado pela ausência de marcadores autoimunes de células β e insulinopenia permanente com propensão à cetoacidose diabética (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2024; RODACKI et al., 2023). Esta última forma de diabetes é geralmente considerada uma forma de diabetes tipo 2 (diabetes tipo 2 propenso à cetose), é fortemente herdada e não está associada aos genes do antígeno leucocitário humano (HLA) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2024).

A fim de tornar a leitura mais objetiva, a partir desse momento, as menções no texto relacionadas ao DM1 referem-se ao DM imunomediado (DM1A). Embora a etiologia do DM1 não seja completamente conhecida, sabe-se que há uma predisposição genética principalmente se houver histórico familiar do DM1 em parentes de primeiro grau (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022a; MORAHAN, 2012; REDONDO; EISENBARTH, 2002; VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). O modelo clássico de desenvolvimento do DM1 sugere que indivíduos geneticamente suscetíveis são expostos a um gatilho ambiental e isso provoca a autoimunidade de células β (EISENBARTH, 1986; HOUEISS; LUCE; BOITARD, 2022; LLOYD; TAMHANKAR; LERNMARK, 2022; MIYAUCHI et al., 2023; MONCADA; HIGGS, 1993; STENE; et al., 2023). Os principais genes de suscetibilidade para o desenvolvimento do DM1 são encontrados na região do gene leucocitário humano (HLA) classe II no cromossomo 6 (IDDM1) e na região promotora do gene da insulina (INS) no cromossomo 11 (IDDM2) (ILONEN; LEMPAINEN; VEIJOLA, 2019; MORAHAN, 2012; REDONDO; STECK; PUGLIESE, 2018; SAARE; PEET; TILLMANN, 2022; STECK; REWERS, 2011; VAFIADIS et al., 1997). Além disso, fatores ambientais incluindo alimentação e infecções também podem contribuir para o desenvolvimento do DM1. Estudos mostraram que a suplementação precoce de crianças (< 3 ou 4 meses de idade, geneticamente

predispostas) com alimentos contendo glúten, proteína do leite de vaca e amamentação exclusiva inferior a 4 meses aumentaram o risco de desenvolver autoanticorpos de células β (ÇIÇEKLI; DURUSOY, 2022; HOLMBERG et al., 2007; JOHANSEN; JOSEFSEN; ANTVORSKOV, 2023; NORRIS et al., 2003; ZIEGLER et al., 2003). Infecções virais também podem ativar o sistema imunológico e induzir a autoimunidade das ilhotas em indivíduos geneticamente suscetíveis, principalmente em infecções por enterovírus (HYÖTY; LEON; KNIP, 2018; KROGVOLD et al., 2015).

São reconhecidos três estágios para DM1 de acordo com *American Diabetes Association* (ADA): o estágio 1 onde os indivíduos são normoglicêmicos mas positivos para 2 ou mais autoanticorpos de células β ; o estágio 2 onde ainda são assintomáticos mas apresentam disglícemia e o estágio 3 onde possuem apresentação clínica e níveis de glicose consistentes com a definição de diabetes da ADA (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022a; TATOVIC; NARENDRAN; DAYAN, 2023). Os testes de triagem para os autoanticorpos de células β , tais como anti-insulina, anti-ácido glutâmico decarboxilase (anti-GAD), anti-tirosina fosfatase (anti-IA2) e anti-transportador de zinco 8 (anti-ZnT8) são recomendados em cenários de pesquisa clínica ou quando membros de primeiro grau da família possuem DM1 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022a; LAMPASONA; LIBERATI, 2016; SO et al., 2021; WILLIAMS; LONG, 2019).

O mecanismo fisiopatológico exato do desenvolvimento do DM1 ainda não está claro, no entanto, sabe-se que é um distúrbio autoimune mediado por células T (ANDERSON, 2023; ATKINSON, 2012; CLARK; KROGER; TISCH, 2017; MENDES-DA-CRUZ et al., 2018). O surgimento de autoanticorpos antecede o desenvolvimento de células T autorreativas (predominantemente células T CD8⁺) que são capazes de destruir células β pancreáticas, resultando em redução progressiva na produção de insulina (ANDERSON, 2023; ATKINSON, 2012). Sabe-se que as células T CD8⁺ autorreativas passam por uma seleção negativa no timo mas o funcionamento desse órgão parece estar prejudicado no DM1 (ANDERSON, 2023; DWYER et al., 2022). Estudo anterior identificou uma variante alélica do gene *Nfkbid*, um modulador de sinal NF- κ B, como contribuinte para a maior deleção tímica de células T CD8⁺ autorreativas em modelo de camundongos diabéticos não obesos (NOD) (DWYER et al., 2022).

Com relação ao diagnóstico dessa doença, a ADA preconiza que seja realizado com base em um dos seguintes critérios: nível de HbA1c igual ou superior a 6,5%, nível de glicose plasmática em jejum (mínimo de 8 horas) igual ou superior a 126 mg / dL, nível de glicose plasmática de duas horas igual ou superior a 200 mg / dL durante um teste oral de tolerância à glicose, glicemia plasmática aleatória igual ou superior a 200 mg / dL em um paciente com

sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022a). As características mais úteis na discriminação do DM1 incluem: idade inferior a 35 anos com índice de massa corpórea (IMC) abaixo de $< 25 \text{ Kg} / \text{m}^2$, perda de peso não intencional, cetoacidose e glicose $> 360 \text{ mg} / \text{dL}$, uma vez que os sintomas clássicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia) são mais marcantes quando a doença surge na infância (HOLT et al., 2021; MELO et al., 2023).

O tratamento para DM1 engloba insulinoterapia, orientação nutricional, automonitorização glicêmica e prática monitorada de exercício físico (MELO et al., 2023). A insulinoterapia deve incluir a utilização de uma insulina basal de ação intermediária, como a insulina NPH humana (*Neutral Protamine Hagedorn*) ou insulina análoga de ação prolongada, em conjunto com uma insulina de ação rápida como a insulina regular humana ou análoga de ação rápida; as doses variam de acordo com a idade, peso corporal, gasto metabólico diário, entre outros, e devem ser fracionadas em no mínimo três aplicações diárias (BRASIL, 2020; MELO et al., 2023). Indivíduos em estágios iniciais da doença, com nenhuma ou pouca deficiência na secreção de insulina, podem se beneficiar de terapia farmacológica oral como por exemplo a administração de teplizumabe e verapamil, a fim de retardar a insulinoterapia (MELO et al., 2023; TATOVIC; NARENDRAN; DAYAN, 2023). É fundamental que os pacientes e seus familiares tenham conhecimento sobre a importância da alimentação saudável, da prática de exercícios físicos (aeróbicos e resistidos), da contagem de carboidratos, da administração de insulina e da identificação das complicações da doença, sendo assim, um programa educacional também faz parte da prevenção e do tratamento do DM1 (BRASIL, 2020; MELO et al., 2023).

3.2 Tratamento farmacológico para diabetes mellitus tipo 1

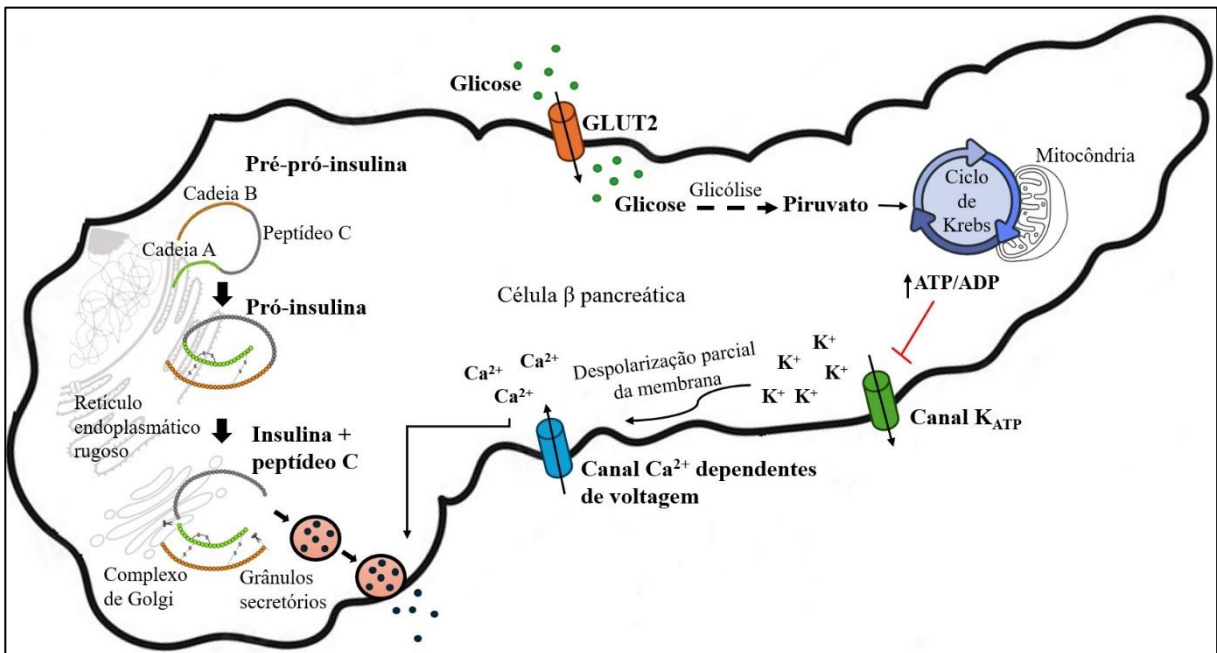
3.2.1 Síntese e liberação da insulina: ação no receptor

A insulina é produzida pelas células β pancreáticas e sua síntese e secreção são estimuladas após aumento na concentração de glicose no interior da célula (TESAURO; MAZZOTTA, 2020). Esse hormônio é sintetizado a partir da pré-pró-insulina, que é clivada no retículo endoplasmático rugoso em pró-insulina que consiste nos domínios peptídicos B, C e A; em seguida, no complexo de Golgi, proteases clivam a pró-insulina em dois locais e liberam o peptídeo C formando a molécula de insulina que consiste nas cadeias A e B ligadas por ponte

dissulfeto (TESAURO; MAZZOTTA, 2020). Por fim, a insulina e o peptídeo C são empacotados em grânulos secretórios que são liberados para o espaço extracelular após estímulos metabólicos (TESAURO; MAZZOTTA, 2020).

O principal regulador da secreção de insulina é a concentração de glicose no plasma, ela é transportada para o interior da célula β pancreática através de transportadores GLUT2 onde é metabolizada; na presença de elevadas concentrações de glicose a principal enzima que metaboliza a glicose é a glicoquinase (baixa afinidade, alta capacidade enzimática) e essa metabolização leva à formação de ATP que se liga aos canais de K^+ dependentes de ATP, fechando-os (DEEPA MAHESHVARE et al., 2023; LEE; LEE, 2022). O acúmulo intracelular de K^+ leva à despolarização parcial da membrana celular ocasionando a despolarização e abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem; a entrada de Ca^{2+} ativa vias de sinalização no interior da célula β que promove a ativação de proteínas quinases (PKC, PKA, PK dependente de calmodulina) favorecendo a fosforilação de proteínas do citoesqueleto e consequente exocitose dos grânulos contendo insulina (DEEPA MAHESHVARE et al., 2023; LEE; LEE, 2022) (Figura 1).

Figura 1: Síntese e secreção de insulina. A insulina é sintetizada na célula β pancreática a partir da pré-pró-insulina, sendo secretada principalmente em resposta ao aumento intracelular de glicose. GLUT2: transportador de glicose 2; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; K_{ATP} : canal de potássio sensível à ATP.



Fonte: Fernandes-Costa (2024).

O receptor de insulina pertence à família dos receptores tirosinoquinase e possui duas subunidades α (extracelulares) e duas subunidades β (transmembranares) unidas por ligação dissulfeto (TESAURO; MAZZOTTA, 2020). Quando a insulina se liga na cadeia α do receptor ocorre uma mudança conformacional na subunidade β causando uma autofosforilação em alguns dos seus resíduos de tirosina, fazendo com que o receptor passe a apresentar atividade tirosinoquinase fosforilando a tirosina de substratos proteicos inclusive da família de proteínas citosólicas chamadas de substrato do receptor de insulina (*IRS*, em inglês) (RAHMAN et al., 2021; TESAURO; MAZZOTTA, 2020). A fosforilação do *IRS* (principalmente *IRS-1* e *IRS-2*) leva à ativação de outros intermediários da via de sinalização da insulina, como por exemplo a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3K*, em inglês) que ativa a via dependente de proteína quinase B (*PKB/Akt*, em inglês) a qual participa da translocação do transportador de glicose GLUT4 para as membranas celulares do tecido muscular e adiposo a fim de captar glicose do meio extracelular (RAHMAN et al., 2021; TESAURO; MAZZOTTA, 2020). Além da captação de glicose, a insulina participa de diversas vias de sinalização em tecidos específicos, mediando efeitos como a síntese de proteínas e glicogênio, inibição da gliconeogênese hepática, armazenamento de gorduras, além de expressão gênica, proliferação e diferenciação celulares (RAHMAN et al., 2021).

3.2.2 Insulinoterapia - breve histórico

Em indivíduos com diabetes mellitus de origem autoimune onde há déficit na produção de insulina, é necessário iniciar a administração exógena desse hormônio. A mensuração dos níveis de peptídeo C pode ajudar a determinar o melhor momento para iniciar essa reposição, uma vez que quando esses níveis estiverem abaixo de 200 pmol/l na ausência de hipoglicemia há indicação de deficiência insulínica significativa; enquanto níveis acima de 600 pmol/l sugerem produção insulínica endógena aceitável, permitindo o emprego de tratamentos não insulínicos para retardar o início da insulinoterapia (MARREN et al., 2019; TATOVIC et al., 2022; TATOVIC; NARENDRAN; DAYAN, 2023; TAYLOR et al., 2022).

Em 1921, médicos canadenses Frederick Banting (1891-1941) e Charles Best (1899-1978) conseguiram isolar a insulina realizando estudos em cães pancreatectomizados e com ligação do ducto pancreático para isolamento de extratos pancreáticos; isso foi considerado um avanço histórico para o tratamento de pacientes com DM1, até então considerada uma sentença de morte (BARNETT, 2018; LEE; YOON, 2021). Em 1922, Leonard Thompson (1908-1935), um paciente com DM1 grave possuindo 14 anos e 30 Kg recebeu pela primeira vez uma injeção

de insulina bovina que promoveu ligeiro efeito hipoglicêmico porém houve infecção no local da injeção agravando o quadro clínico (LEE; YOON, 2021). Em uma segunda tentativa após purificação do extrato de insulina pelo bioquímico James B. Collip (1892-1965), o jovem Leonard Thompson normalizou os níveis de glicose sanguínea (LEE; YOON, 2021). A partir disso, após o período experimental, empresas farmacêuticas começaram a comercializar a insulina; inicialmente as formulações eram extraídas de animais (suínos e bovinos) e haviam vários relatos de reações alérgicas mas na década de 1980 com a evolução da biologia molecular, via DNA recombinante, foram desenvolvidas insulinas biossintéticas humanas (AHMAD, 2014; BROSTOFF; KEEN; BROSTOFF, 2007).

A insulinoterapia de pacientes DM1, quando indicada, prevê o uso de uma dose de insulina basal de ação intermediária ou prolongada (NPH - *Neutral Protamine Hagedorn* ou insulina análoga de ação prolongada) associada à insulina *bolus* (regular ou análoga de ação rápida) (BRASIL, 2020). A insulina regular possui como princípio ativo a insulina humana monocomponente, hormônio análogo ao produzido pelo pâncreas humano, e possui efeito de curta duração com início de ação em torno de 30-60 min, pico em 2-3 h e duração de 5-8 h, recomenda-se utilizá-la 30 min antes das refeições (BRASIL, 2020). A fim de prolongar o efeito da insulina, foi produzida a insulina NPH através da adição de uma molécula de protamina à preparação de insulina, o que conferiu um efeito de duração intermediária com início de ação em torno de 2-4 h, pico em 4-10 h e duração de 10-18 h, sendo recomendado utilizá-la de 1 a 3 vezes/dia em combinação com a insulina regular ou análoga de ação rápida (BRASIL, 2020).

A tecnologia de DNA recombinante também permitiu modificações na estrutura de aminoácidos na molécula de insulina original, alterando sua farmacocinética e farmacodinâmica, surgindo assim as insulinas análogas de ação rápida ou prolongada (LEE; YOON, 2021; SIMS et al., 2021).

Em 1996 foi comercializada a primeira insulina análoga de ação rápida, conhecida como lispro, onde foram invertidas as posições dos aminoácidos lisina e prolina na cadeia B da molécula de insulina (posições 28 e 29, respectivamente) conferindo um início (5-15 min) e duração (3-4 h) de ação mais rápido do que da insulina regular, sendo recomendada a administração 15 min antes das refeições (KOIVISTO, 1998; SIMS et al., 2021). Em seguida, outras insulinas análogas de ação rápida chegaram ao mercado tais como a asparte em 2000 e a glusilina em 2004, apresentando propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas similares à lispro (SIMS et al., 2021). A fim de aproximar-se mais do tempo de liberação da insulina endógena, já existem insulinas análogas de ação ultrarrápida como a *Lispro ultrarapid* (URLi, Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana) que possui a adição de treprostnil e citrato na

formulação da insulina lispro, estes promovem vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular, respectivamente, conferindo absorção mais rápida do que as insulinas produzidas anteriormente (HEISE et al., 2020).

Em 2000 foi utilizada pela primeira vez uma insulina análoga de ação prolongada, conhecida como glargina, onde foram adicionadas duas moléculas de arginina na cadeia B (posição 30) e substituição da asparagina pela glicina na cadeia A (posição 21), conferindo início (2-4 h) e duração (20-24 h) de ação mais prolongado comparado a insulina NPH, sendo recomendada a administração uma vez ao dia (PIEBER; EUGÈNE-JOLCHINE; DEROBERT, 2000). Em seguida, surgiram outras insulinas análogas de ação prolongada tais como a detemir em 2005 e uma década depois a degludeca, esta última possui efeito ultralongo podendo durar além de 42 h (BRASIL, 2020; KURZHALS et al., 2011; US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION., 2005). Os tipos de insulina e suas principais propriedades farmacocinéticas estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1: Tipos de insulina e suas principais propriedades farmacocinéticas.

Insulina	Tipo	Início da ação	Pico da ação	Duração da ação	Posologia
Regular	Humana - Rápida	30 – 60 min	2 – 3 h	5 – 8 h	30 min antes das refeições
NPH - <i>Neutral Protamine Hagedorn</i>	Humana - Intermediária	2 – 4 h	4 – 10 h	10 – 18 h	1 – 3 x/ dia
Lispro					
Asparte	Análogas de ação rápida	5 – 15 min	0,5 – 2 h	3 – 5 h	Imediatamente antes ou após as refeições
Glusilina					
Glargina 100 ui/mL		2 – 4 h	Não possui	20 – 24 h	1 x/dia
Detemir		1 – 3 h	6 – 8 h	18 – 22 h	1 – 2 x/dia
Degludeca	Análogas de ação prolongada	< 4 h	Não possui	Até 42 h	1 x/dia
Glargina 300 ui/mL		6 h	Não possui	Até 36 h	1 x/dia

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Diabetes (2023)

Há estudos mostrando que indivíduos DM1 que utilizaram insulina glargina-100 ui/mL em comparação à insulina NPH apresentaram um melhor controle glicêmico e um menor número de eventos hipoglicêmicos noturnos (BOLLI et al., 2009; FULCHER; GILBERT;

YUE, 2005; JANEŽ et al., 2020; PORCELLATI et al., 2004). Outro ensaio clínico randomizado com pacientes DM1 demonstrou que o tratamento por 18 semanas utilizando a combinação de insulina detemir/asparte promoveu menores níveis de hemoglobina glicada (HbA_{1c}), menor risco de hipoglicemias e menor ganho de peso corporal quando comparado a combinação de insulina NPH/regular (HERMANSEN et al., 2004). Por sua vez, uma revisão sistemática e metanálise observou que análogos de ação rápida (lispro, asparte, glulisina) apresentaram níveis mais baixos de glicose pós-prandial e eventos hipoglicêmicos totais em comparação a insulina humana regular em indivíduos com DM1 (MELO et al., 2019).

Usualmente, a administração da insulina envolve múltiplas injeções subcutâneas diárias utilizando seringas e canetas ou utilização de bombas de infusão contínua (JANEŽ et al., 2020). Em 2006 foi comercializada pela primeira vez uma insulina inalável de ação rápida, conhecida como Exubera (Pfizer Inc., New York, NY, USA), administrada através de aerossol em pó seco, mas foi descontinuada devido a fatores econômicos (HEINEMANN, 2008; LEE; YOON, 2021; US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2006). A via de administração oral vem sendo alvo de pesquisas há algum tempo. Estudo anterior substituiu a insulina humana regular subcutânea antes da refeição noturna por um spray oral de insulina (Oral-Lyn) durante 8 semanas em 15 pacientes com DM1, cada *puff* do spray foi considerado como uma unidade de insulina e ajustado individualmente de acordo com a necessidade do paciente; não foram observadas diferenças na glicose sanguínea e HbA_{1c} entre o spray oral e a injeção de insulina regular (ANNABESTANI et al., 2010).

Um estudo piloto utilizando uma formulação de insulina humana recombinante em fórmula de cápsulas (ORMD-0801, 8 mg de insulina, 3x/dia/10 dias) foi administrada a 8 pacientes adultos com DM1 não controlado (ELDOR et al., 2013). Os pacientes foram orientados a não modificarem a rotina de tratamentos com insulina, mas acrescentarem a medicação oral 45 min antes das refeições; foi constatada uma redução significativa na frequência de leituras de glicose superiores a 200 mg/dL em comparação ao pré-tratamento com as cápsulas, sem nenhum efeito adverso (ELDOR et al., 2013). Posteriormente, o mesmo grupo desenvolveu um ensaio clínico randomizado de fase II envolvendo 179 pacientes com DM2 em tratamento com metformina, os quais foram orientados a autoadministrarem a medicação à noite (ORMD-0801, 16 ou 24 mg, 1x/dia/28 dias); foi observada uma redução no aumento da glicemia noturna comparado ao placebo, sem diferenças entre as doses (ELDOR et al., 2021).

Apesar do interesse de empresas farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DM há a dificuldade na comercialização dessas formulações, possivelmente devido ao seu alto custo (IYER et al., 2022).

3.2.3 Antidiabéticos orais e injetáveis

Os anti-hiperglicêmicos orais e injetáveis que são utilizados atualmente para o tratamento de DM2 demonstraram efeitos antidiabéticos em indivíduos com DM1. Um ECR multicêntrico avaliou o efeito do tratamento crônico com metformina na sensibilidade à insulina em jovens (média de 16 anos de idade) com DM1 e sobrepeso ou obesidade em terapia com insulina exógena há no mínimo 1 ano (CREE-GREEN et al., 2019). Os autores observaram que os jovens que receberam metformina (v.o., 500 mg, 2x/dia por 3 meses) apresentaram melhora na sensibilidade à insulina corporal total e periférica, especificamente muscular (CREE-GREEN et al., 2019).

Sabe-se que a metformina, comumente utilizada para o tratamento da DM2, possui efeito antidiabético principalmente através da inibição da gliconeogênese hepática (ELSAYED et al., 2023; LAMOIA; SHULMAN, 2021). O mecanismo preciso da ação da metformina na supressão da gliconeogênese hepática continua sendo debatido, no entanto, foi proposto que a metformina tenha ação sobre a proteína-treonina quinase LKB1 (*Liver kinase B1*), responsável por fosforilar e ativar a AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina), esta última por sua vez encontra-se envolvida em dois processos: a regulação negativa transcricional de genes gliconeogênicos reduzindo a produção hepática de glicose e a fosforilação e inibição da acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1) e ACC2 que reduz a lipogênese e promove a oxidação mitocondrial hepática, respectivamente (LAMOIA; SHULMAN, 2021; SAVAGE, 2006; SHAW et al., 2005). Outro mecanismo de ação proposto para o efeito hipoglicemiante da metformina é o aumento do estado redox citosólico através da inibição da glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (GPD2) no fígado, o que prejudica a gliconeogênese hepática a partir do glicerol e, simultaneamente, aumenta a relação $[NADH]:[NAD^+]$ (LAMOIA; SHULMAN, 2021; MADIRAJU et al., 2014, 2018).

Inibidores do cotransportador de sódio-glicose-2 (SGLT-2) tais como sotaglifozina, empaglifozina e dapaglifozina apresentaram efeitos positivos no tratamento adjuvante de indivíduos com DM1 (GARG et al., 2017; RAO et al., 2021; ROSENSTOCK et al., 2018; SEUFERT et al., 2022). Os transportadores SGLT-2, expressos nos segmentos S1 e S2 do túbulo proximal do néfron, promovem a reabsorção acoplada de glicose e sódio no rim, sendo assim, a inibição desse co-transportador causa glicosúria e natriurese melhorando o controle glicêmico, pressórico e promovendo nefroproteção (FONSECA-CORREA; CORREA-ROTTER, 2021; RAO et al., 2021). Um ECR de fase 3 avaliou a eficácia da sotagliflozina como terapia adjuvante à insulina em indivíduos adultos (média de 43 anos de idade) com DM1

diagnosticada há pelo menos 1 ano (GARG et al., 2017). Os pacientes tratados com sotagliflozina (400 mg/dia, v.o., 1x/dia por 24 semanas) apresentaram reduções no nível de HbA1c, peso corporal, dose diária de insulina e pressão arterial sistólica (PAS) (GARG et al., 2017).

Outro ECR de fase 3 testou a eficácia de diferentes doses da empagliflozina (2,5 mg, 10 mg e 25 mg, v.o., 1x/dia por 26 semanas) em indivíduos adultos (média de 40 anos de idade) diagnosticados com DM1 há no mínimo 1 ano e em tratamento com insulina exógena (ROSENSTOCK et al., 2018). Foi observado que as doses mais elevadas (10 mg e 25 mg) de empagliflozina reduziram similarmente os níveis de HbA1c, peso corporal, dose diária total de insulina e PAS (ROSENSTOCK et al., 2018).

Outro medicamento antidiabético que mostrou efeitos benéficos no manejo do DM1 foi o liraglutida, agonista do receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1R) (DEJGAARD et al., 2020; TANDON et al., 2021; VON HERRATH et al., 2021). Com relação ao seu efeito secretório de insulina, a liraglutida liga-se ao GLP-1R na célula β pancreática, receptor acoplado a proteína Gs, ativando a adenilato ciclase (AC), aumentando os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e ativando a proteína quinase A (PKA), que aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ promovendo exocitose de insulina bem como melhora a transcrição de pró-insulina em insulina (MAYO et al., 2003; VERSPOHL, 2009; WANG et al., 2014). Análogos de GLP-1, como a liraglutida, também possuem efeitos sobre células não endócrinas, tais como, modulação central inibindo o apetite e cardíaca melhorando a contratilidade miocárdica e função vascular (SHEIKH, 2013; VERSPOHL, 2009).

Estudo anterior avaliou o efeito do tratamento com liraglutida no controle glicêmico de indivíduos adultos (média de 50 anos de idade) com DM1 não controlada e sobrepeso/obesidade em terapia com insulina exógena, diagnosticados há no mínimo 12 meses e com reserva de células β (DEJGAARD et al., 2020). Os autores observaram que o tratamento adjuvante com liraglutida (s.c., 1x/dia por 26 semanas) promoveu reduções no nível de HbA1c, dose diária de insulina e peso corporal comparado ao placebo (DEJGAARD et al., 2020). Outro ECR de fase 2 utilizou a combinação de liraglutida (s.c., 1x/dia por 54 semanas) e anticorpo anti-IL-21 (i.v., uma injeção a cada 6 semanas por 54 semanas) como tratamento adjuvante à insulina em indivíduos adultos (média de 28 anos de idade) com DM1 recentemente diagnosticada (há no máximo 20 semanas) (VON HERRATH et al., 2021). Os autores observaram uma menor dose diária de insulina e menor redução na concentração de peptídeo C durante desafio dietético com refeição mista após o tratamento combinado de liraglutido e anticorpo anti-IL-21, mas não com

os tratamentos isolados, no entanto, esses efeitos não foram mantidos após 26 semanas do fim do tratamento (VON HERRATH et al., 2021).

3.3 Modelo animal de camundongo diabético induzido por estreptozotocina (STZ)

A STZ é um antibiótico de amplo espectro isolado da bactéria *Streptomyces achromogenes* e teve suas propriedades diabetogênicas descobertas em 1963 após sua administração intravenosa em cães e gatos (RAKIETEN; RAKIETEN; NADKARNI, 1963). Posteriormente, em 1967, ficou demonstrado que a STZ possuía seletividade tóxica para as células β nas ilhotas pancreáticas ocasionando necrose rápida dessas células em ratos (JUNOD et al., 1967), além disso, há estudos que demonstraram o efeito antineoplásico dessa droga em humanos (SCHEIN et al., 1974; YEO et al., 2018).

Há uma influência do gênero sexual no desenvolvimento de diabetes por STZ, uma vez que fêmeas possuem maior resistência à citotoxicidade induzida por essa droga e portanto, necessitam de doses mais elevadas (AL-AWAR et al., 2016; KOLB, 1987). A razão para isso não é totalmente compreendida, porém foi visto anteriormente que camundongos machos tiveram uma redução na sensibilidade à STZ após a administração de estrógeno, enquanto camundongos fêmeas apresentaram aumento na sensibilidade à STZ após administração de andrógenos (AL-AWAR et al., 2016; PAIK et al., 1982). A linhagem animal também interfere na sensibilidade à STZ, em camundongos, por exemplo, as cepas DBA/2 e C57BL6 são consideradas as mais sensíveis (GURLEY et al., 2006).

A STZ possui fórmula química $C_8H_{15}N_3O_7$, sendo um análogo citotóxico da glicose, possui uma molécula de glicose ligada à uma porção metilnitrosourea altamente reativa, onde a primeira porção direciona a droga para as células β pancreáticas de espécies animais que possuem abundantes transportadores de glicose GLUT2 e a segunda porção parece exercer os efeitos citotóxicos da STZ (AKINLADE; OWOYELE; SOLADOYE, 2021; JOHANSSON; TJÄLVE, 1978; LENZEN, 2008). Existem transportadores do tipo GLUT2 no fígado e nos rins em menor extensão, nesse sentido, altas doses de STZ também podem prejudicar a função desses órgãos; mas como essa droga possui o tempo de meia-vida curta (~15 min) qualquer comprometimento adicional ao fígado e rins, após a eliminação de STZ do organismo, é atribuída à hiperglicemia crônica (BOUWENS; ROOMAN, 2005; ELEAZU et al., 2013; TESCH; ALLEN, 2007).

Um modelo animal muito usado para indução do DM1 em camundongos é a administração de doses baixas de STZ, o que promove injúria parcial das células β das ilhotas pancreáticas, induzindo inflamação crônica e consequente deficiência de insulina. Além disso, em relação aos outros modelos experimentais do DM1, o modelo STZ além de eficaz para indução do DM1 é de baixo custo (FURMAN, 2021).

A STZ promove a fragmentação do DNA das células β pancreáticas levando à morte celular e a principal explicação para isso é a alquilação do DNA pela porção metilnitrosourea da STZ especialmente na posição O⁶ da guanina (ELEAZU et al., 2013; FURMAN, 2021). Assim, na tentativa de reparar o DNA a enzima nuclear poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) é hiperestimulada reduzindo os estoques de NAD⁺ e consequentemente de ATP, o que leva à necrose dessas células (UCHIGATA et al., 1982; YAMAMOTO; UCHIGATA; OKAMOTO, 1981). Outro possível mecanismo que pode contribuir para a morte celular induzida por STZ é através da liberação de óxido nítrico, o qual inibe a atividade da enzima aconitase levando à alquilação e danos no DNA (FRIEDERICH; HANSELL; PALM, 2009; SINGH et al., 2001). Por fim, a STZ pode acelerar o processo de destruição das células β através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido e radicais hidroxila originados da dismutação do peróxido de hidrogênio, o qual é formado durante o metabolismo da hipoxantina (LENZEN, 2008; NUKATSUKA et al., 1990; SZKUDELSKI, 2001).

3.4 Complicações vasculares induzidas por hiperglicemia

Indivíduos com diabetes mal controlado ou não tratado apresentam maiores complicações cardiovasculares do que aqueles com o nível glicêmico controlado, no entanto, não está totalmente elucidado se as complicações crônicas do diabetes são resultantes da própria hiperglicemia ou de condições associadas, como deficiência de insulina, excesso de glucagon, glicação de proteínas e alterações lipídicas ou da pressão arterial (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022b; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). Há poucos estudos recentes que analisem as tendências de complicações no diabetes mellitus, porém estimava-se nas décadas passadas que o risco relativo das complicações macrovasculares era 2 a 4 vezes maior do que nos indivíduos sem a doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022b; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

Com o advento da insulinoaterapia a DM1 passou de doença aguda para crônica, consequentemente surgiram complicações a longo prazo tais como retinopatia, neuropatia e doenças cardiovasculares (BARNETT, 2018). A doença cardiovascular é uma doença

multifatorial, no entanto, umas das principais razões para o seu desenvolvimento é a disfunção endotelial que é caracterizada por uma redução na bioatividade do NO e aumento simultâneo de ROS (REN et al., 2017). O comprometimento do relaxamento vascular no diabetes mellitus é promovido primordialmente pela disfunção endotelial, mas também pela disfunção das células musculares lisas vasculares (GERO, 2018; NIEVES-CINTRÓN et al., 2021; PRADA et al., 2019).

Um dos principais mecanismos que levam à disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia é o estresse oxidativo (AN et al., 2023; GERO, 2018). A hiperglicemia intracelular promove excesso de respiração celular por metabólitos da glicose causando superprodução de ânion superóxido, levando a danos no DNA mitocondrial, disfunção enzimática na cadeia de transporte de elétrons, ineficiência na fosforilação oxidativa, resultando em perda do potencial de membrana mitocondrial, redução na produção de ATP e aumento na produção de ROS (FORBES; COOPER, 2013; RUSSELL; COOPER, 2015; SRINIVASAN et al., 2004). Além disso, a sobrecarga de glicose contribui para ativação de vias alternativas do metabolismo glicolítico, tais como, via do metilglioxal, hexosamina e polioliol (Figura 2). Na via do polioliol, o excesso de glicose é convertido em sorbitol pela ação da aldose redutase, uma enzima de baixa afinidade para a glicose, em seguida, o sorbitol é oxidado à frutose, cuja decomposição leva à formação de agentes glicantes que podem glicar proteínas e resultar na produção dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (GERO, 2018; PAPACHRISTOFOROU et al., 2020; SZWERGOLD; KAPPLER; BROWN, 1990).

Os AGEs são formados através da reação de *Maillard*, uma reação não enzimática entre grupos amino livres de proteínas e grupos carbonila de açúcares redutores, que desenvolve um composto instável, a base de *Schiff* (HELOU et al., 2014). Em seguida, há um rearranjo para um produto mais estável, o produto Amadori, a partir do qual são formados compostos irreversíveis (os AGEs) em um estágio posterior de glicação (SINGH et al., 2014). Por sua vez, os AGEs atuam em receptores de AGE (RAGE) modificando a sinalização intracelular, a expressão gênica, a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a liberação de moléculas pró-inflamatórias (GERO, 2018; MANIGRASSO et al., 2014; PAPACHRISTOFOROU et al., 2020). Estudo *in vitro* observou uma redução no nível de mRNA e proteína da NOS endotelial (eNOS) acompanhada de redução na concentração celular de NO, bem como redução na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e aumento na atividade da NADPH oxidase em células endoteliais da artéria coronária humana (HCAECs) tratadas com AGEs por 48 h. A produção de ROS e a regulação negativa da eNOS induzidas por AGEs foram bloqueadas após pré-tratamento com inibidores específicos da p38 e ERK1/2,

mostrando que os AGEs atuam por meio da ativação de vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (REN et al., 2017).

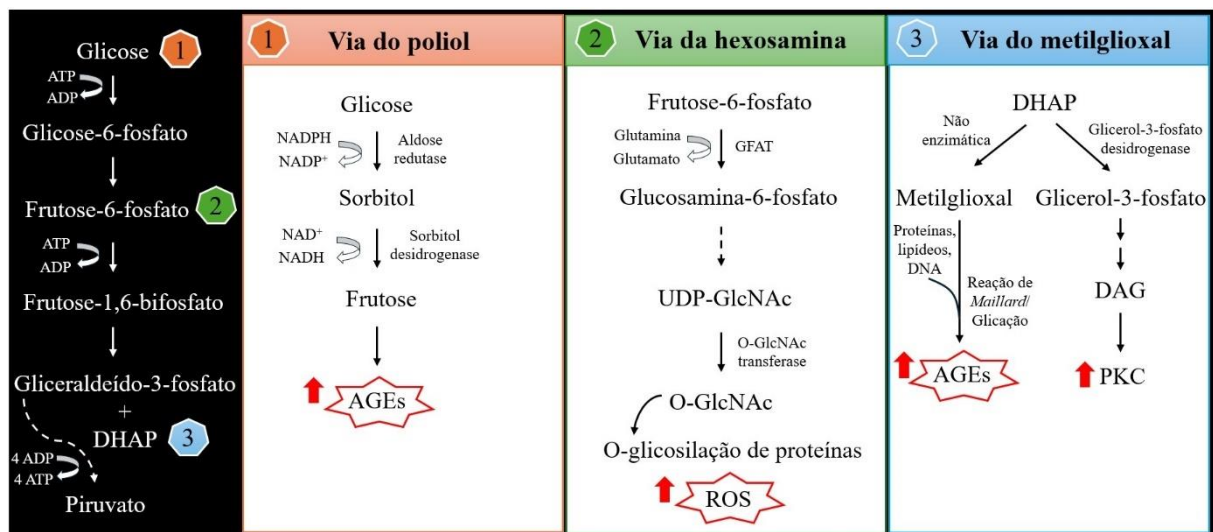
Outra via alternativa do metabolismo glicolítico que tem sua atividade aumentada pela hiperglicemia é a via do metilglioxal. O metilglioxal é formado a partir da dihidroxiacetona fosfato (DHAP), um dos produtos intermediários da glicólise, e também contribui para a produção de AGEs; a DHAP também é reduzida a glicerol-3-fosfato que dará origem posteriormente ao diacilglicerol (DAG) o qual leva à ativação da proteína quinase C (PKC), essa por sua vez está associada ao aumento da permeabilidade vascular, apoptose, angiogênese, adesão leucocitária, ativação e inibição de citocinas que levam a complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (aterosclerose, cardiomiopatia) no diabetes mellitus (GERALDES; KING, 2010; GERO, 2018; PAPACHRISTOFOROU et al., 2020). Diferentes isoformas da PKC estão envolvidas no comprometimento vascular endotelial diabético, tais como PKC β e PKC δ (CROTEAU et al., 2021; LIU et al., 2020).

Foi observado em estudo anterior que tecidos de úlcera de pacientes com pé diabético apresentavam aumento na expressão de PKC β -p, que estava associada com aumento na concentração de malondialdeído (MDA), redução na atividade da SOD, CAT e glutathione peroxidase (GSH-Px), aumento na expressão de NF- κ B e redução na expressão de eNOS (LIU et al., 2020). Resultados semelhantes foram encontrados em ensaio *in vitro* do mesmo estudo no qual foram utilizadas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) incubadas em meio contendo alta concentração de glicose (20 mM/24h), no entanto, o pré-tratamento com inibidor específico de PKC β 1 e PKC β 2 por 2h antes da exposição à glicose inibiu a produção de ROS, preveniu a redução nas atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px), preveniu o aumento na expressão de PKC β -p e NF- κ B e restaurou o nível de eNOS, mostrando que a hiperglicemia afeta as células endoteliais pela via de sinalização PKC β (LIU et al., 2020).

Além disso, a ativação da PKC δ induzida por hiperglicemia em células endoteliais pulmonares reduziu o efeito do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entretanto a deleção de PKC δ endotelial melhorou a reperfusão do fluxo sanguíneo e a angiogênese lateral dos membros inferiores de camundongos diabéticos-STZ submetidos à ligadura unilateral da artéria femoral (CROTEAU et al., 2021). Os mesmos autores observaram, em camundongos diabéticos nocautes para PKC δ endotelial, uma redução na expressão do receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) e a ativação da via de sinalização Akt/eNOS, a qual encontrava-se prejudicada nos músculos isquêmicos dos camundongos diabéticos que expressavam PKC δ (CROTEAU et al., 2021).

Outra via que tem seu fluxo aumentado na hiperglicemia é a via da hexosamina, onde a frutose-6-fosfato é convertida em glucosamina-6-fosfato; o principal produto final dessa via é UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) que na presença de O-GlcNAc transferase gera N-acetilglucosamina ligada ao O (O-GlcNAc) favorecendo a O-glicosilação de proteínas intracelulares (BROWNLEE, 2001; BUSE, 2006; GERO, 2018; PAPACHRISTOFOROU et al., 2020). Os níveis aumentados de proteínas modificadas por O-GlcNAc contribui para produção de ânion superóxido em células musculares lisas vasculares (VSMCs) e artéria aorta de ratos, e o aumento no estresse oxidativo promove disfunção endotelial caracterizada por redução no relaxamento dependente de endotélio em aorta via ativação de NADPH oxidase (SOUZA-SILVA et al., 2018).

Figura 2: Vias alternativas do metabolismo glicolítico. Em condições de hiperglicemia, vias alternativas de processamento da glicose podem ser ativadas, tais como a via dos polióis, da hexosamina e do metilglioxal. Na via do poliol, a glicose em excesso é metabolizada à sorbitol e à frutose (1). Na via da hexosamina, a frutose-6-fosfato é desviada da glicólise aumentando os níveis de O-GlcNAc (2). Na via do metilglioxal, a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) aumenta a formação de metilglioxal e ativação da proteína quinase C (PKC) (3). A ativação dessas vias levam à produção de AGEs, estresse oxidativo e glicolítico.



DHAP: dihidroxiacetona fosfato; AGEs: produtos finais de glicação avançada; GFAT: glutamina:frutose-6-fosfato-amidotransferase; UDP-GlcNAc: difosfato de uridina N-acetilglucosamina; O-GlcNAc: N-acetilglucosamina ligada ao O; ROS: espécies reativas de oxigênio; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinase C.

Fonte: Fernandes-Costa (2024).

Além da disfunção endotelial, a hiperglicemia também altera o funcionamento do músculo liso vascular (JACKSON et al., 2016; NIEVES-CINTRÓN et al., 2021; PRADA et al., 2019). Um estudo anterior avaliou o mecanismo intracelular pelo qual a hiperglicemia

promove aumento na contratilidade muscular lisa vascular (PRADA et al., 2019). Para tanto, foram isolados miócitos de artérias adiposas excisadas de pacientes submetidos à gastrectomia e de artérias cerebrais de camundongos, as quais foram incubadas em meio com elevada concentração de glicose (15 mM-20 mM). Os autores observaram que a hiperglicemia desencadeou a liberação autócrina de nucleotídeos extracelulares (por exemplo, ATP, ADP, UTP) que atuam em receptores purinérgicos P2Y₁₁ os quais são acoplados à proteína Gs, levando à ativação da via de sinalização AC/AMPC/PKA; a PKA por sua vez fosforila e aumenta a atividade de canais de cálcio tipo L (Ca_v1.2), aumentando o influxo de Ca²⁺ e promovendo maior contratilidade de miócitos arteriais humanos e murinos, resultando em vasoconstrição (PRADA et al., 2019).

Outro estudo *in vitro* avaliou, através de *patch-clamp*, a atividade de canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) em miócitos arteriais mesentéricos isolados de ratos mantidos em meio hiperglicêmico (glicose 20 mM) (JACKSON et al., 2016). Os autores observaram inicialmente que as artérias mesentéricas de ratos apresentaram aumento na resposta contrátil à adição de 60 mM K⁺ quando a concentração extracelular de glicose foi elevada de 5 para 20 mM (JACKSON et al., 2016). Foi demonstrado que a concentração elevada de glicose nas células musculares lisas vasculares promoveu ativação de vias de sinalização envolvendo PKCα e PKCβ, que levam à inibição na corrente K_v e consequentemente despolarização da membrana e vasoconstrição (JACKSON et al., 2016).

É conhecido que a hiperglicemia promove aumento na ativação do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) (BURNS et al., 2017; CHEN; JUAN; CHOU, 2018). O aumento do angiotensinogênio produzido nas células do túbulo proximal é convertido em angiotensina I (ANG I) pela renina, em seguida, a enzima conversora de angiotensina (ECA) abundante nas células tubulares proximais favorece a conversão de ANG I em ANG II (HSIEH et al., 2002). Outro componente do SRAA é a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) que também é altamente expressa no rim e degrada ANG II no fragmento ANG 1–7 (SOLER; WYSOCKI; BATLLE, 2013). Foi observado anteriormente que a hiperglicemia induziu aumento na expressão de componentes intrarrenais do SRAA, tais como, ECA, ANG II e receptor tipo 1 de ANG II (AT1R) em células endoteliais renais de esquilo da mongólia (gerbil) diabético-STZ (CHEN; JUAN; CHOU, 2018).

Similarmente, estudo realizado com adolescentes (média 14 anos de idade) diagnosticados com DM1 em terapia com insulina exógena, normotensos e normoalbuminúricos encontrou um aumento nos níveis urinários de componentes do SRAA (ECA2, ECA, angiotensinogênio) que foram associados com maior nível de HbA1c. Além disso,

uma relação albumina/creatinina urinária mais alta (dentro da faixa normal) foi correlacionada com angiotensinogênio e atividade de ECA mais elevados, porém não com atividade ou níveis urinários de ECA2 (BURNS et al., 2017). Outro estudo demonstrou os benefícios cardioprotetores e antifibróticos após 2 semanas de tratamento de ratos DM1 com baixa dose de inibidores do SRAA (losartana inibidor ECA - 20 mg/Kg, ramipril bloqueador do AT1R - 10 µg/Kg ou esplerenona antagonista do receptor mineralocorticoide - 20 mg/Kg), garantindo o bloqueio efetivo do SRAA sem afetar a pressão arterial sistêmica (BALOGH et al., 2023). Os estudos de Balogh et al. (2023) observaram que a pressão arterial média (PAM) permaneceu inalterada em todos os grupos e não foi afetada pelos inibidores do SRAA; o aumento na velocidade de onda de pulso induzido por diabetes, mensurada de forma não invasiva através de tonometria de aplanção, foi prevenido por todos os inibidores do SRAA indicando melhora no enrijecimento arterial. Além disso os inibidores do SRAA também foram capazes de atenuar a fibrose no ventrículo esquerdo dos ratos diabéticos e a espleronona foi capaz de reduzir o espessamento da camada íntima-média aórtica e a quantidade de tecido fibrótico na camada média da aorta de ratos diabéticos, amenizando o remodelamento cardíaco e vascular patológico induzido pelo diabetes (BALOGH et al., 2023). Os mecanismos pelo qual a hiperglicemia aumenta a ativação do SRAA são desconhecidos, no entanto, há a hipótese de que a hiperglicemia aumenta a reabsorção tubular proximal de sódio através da ativação dos mecanismos de cotransporte glicose-sódio, reduzindo a carga de sódio no túbulo distal e a atividade de *feedback* tubuloglomerular e aumentando a secreção de renina (BLANTZ; PELAYO, 1984; WOODS; MIZELLE; HALL, 1987).

3.5 Relação entre óxido nítrico e diabetes mellitus

O NO é produzido a partir de um precursor, a L-arginina, por uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (BILLIAR et al., 2023; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1989). A NOS possui três isoformas principais: as isoformas constitutivas (cNOS) que compreendem a NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS) e a isoforma induzível (iNOS) que tem sua produção estimulada por citocinas e/ou endotoxinas (BILLIAR et al., 2023; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). É conhecido que a cNOS produz pequenas quantidades de NO (nano ou picomol) e medeia ações fisiológicas principalmente através da ativação da via GCs-GMPc, responsável por vasodilação (BAHADORAN; MIRMIRAN; GHASEMI, 2020; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Em contrapartida, a ativação da iNOS gera produção excessiva de NO (na ordem de micromolar) e é a principal responsável

pelas ações prejudiciais do NO principalmente via S-nitrosilação e nitração de proteínas (BAHADORAN; MIRMIRAN; GHASEMI, 2020; DUSTING; MACDONALD, 1995).

Todas as isoformas de NOS ligam-se à calmodulina para sua ativação, porém elevados níveis de Ca^{2+} intracelular são necessários para a ligação da calmodulina à eNOS e nNOS (200-400 nM), enquanto devido a uma estrutura de aminoácidos diferente do sítio de ligação da calmodulina na iNOS, nesta isoforma a calmodulina é constitutivamente ativa em concentrações intracelulares de Ca^{2+} extremamente baixas (< 40 nM) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). As três isoformas de NOS são expressas nas células β pancreáticas, no entanto, a iNOS não é detectável em níveis basais de glicose mas somente após exposição prolongada a concentrações elevadas de glicose no citoplasma (JIMENEZ-FELTSTROM; LUNDQUIST; SALEHI, 2005).

O NO parece estar envolvido na via secretora de insulina das células β pancreáticas. Foi observado anteriormente que a adição de NO em concentração micromolar baixa (2 μM) em meio de cultura de uma linhagem de células β (INS-1) ou ilhotas isoladas de ratos promoveu aumento na secreção de insulina que foi acompanhado por redução no potencial de membrana mitocondrial e aumento transitório na concentração citosólica de Ca^{2+} mitocondrial e do retículo endoplasmático (RE) (LAFFRANCHI et al., 1995; PAPPAS; WILKINSON; GOW, 2023; WILLMOTT; GALIONE; SMITH, 1995). Além disso, também foi demonstrado em estudo *in vitro* utilizando uma linhagem de células β que o NO derivado de nNOS, via S-nitrosilação de cisteína, promove a dissociação da glicoquinase (GK, componente integral dos grânulos de insulina) dos grânulos secretores de insulina e sua consequente ativação, e essa dissociação potencializa a exocitose desse hormônio (PAPPAS; WILKINSON; GOW, 2023; RIZZO; PISTON, 2003). Em contrapartida, foi observado que o NO derivado de iNOS inibe a atividade da aconitase mitocondrial e a cadeia de transporte de elétrons, inibindo a secreção de insulina em ilhotas humanas expostas a citocinas (CORBETT et al., 1993; PAPPAS; WILKINSON; GOW, 2023); além disso, promove a regulação negativa de GK via nitração de tirosina em camundongos alimentados com etanol, resultando em disfunção e apoptose de células β pancreáticas (KIM et al., 2010).

O diabetes está associado a redução na expressão de eNOS em células endoteliais aórticas de ratos DM1 e aumento da expressão de iNOS em ilhotas pancreáticas humanas isoladas de indivíduos DM2, ilhotas pancreáticas e ventrículo esquerdo de ratos DM1 (JÖRNS et al., 2005; NAGAREDDY et al., 2005; SHAMSALDEEN et al., 2018; SHAMSALDEEN; LIONE; BENHAM, 2020). Estudos de Shinozaki et al. (2011) observaram que camundongos transgênicos com aumento na expressão hepática de iNOS apresentaram aumentos nos níveis

de glicose sanguínea às 8 semanas de idade, menor sensibilidade à insulina e maior intolerância à glicose. A expressão de iNOS no fígado dos camundongos também inibiu a fosforilação de tirosina do IRS-1 e IRS-2, reduziu a ativação de PI3K e a fosforilação de Akt estimuladas por insulina, juntamente com aumento na S-nitrosilação de Akt, IR, IRS-1 e IRS-2 (SHINOZAKI et al., 2011).

Ademais, um estudo anterior observou que a incubação de aorta de ratos à elevada concentração de glicose (30 mmol/L, por 30 minutos) reduziu significativamente o relaxamento dependente de endotélio (em resposta à acetilcolina - ACh), que foi acompanhado por redução na expressão de genes envolvidos na sinalização de insulina: IRS-1, PI3K, Akt, além de redução na razão peNOS/eNOS total (PEKTAS et al., 2018). O tratamento com L-NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, inibidor de NOS) inibiu a captação de insulina por células endoteliais aórticas bovinas (bACEs), além disso, a adição de nitroprussiato de sódio (NPS 0,01; 0,3 mmol/L, doador de NO) em concentrações pequenas aumentou a absorção de insulina por bAECs mas concentrações mais elevadas não estimulou essa captação sugerindo uma ação bifásica do NO de acordo com a concentração (WANG et al., 2013). Esse efeito do NPS (0,3 mmol/L) na absorção de insulina foi mantido mesmo na presença de bloqueadores de Src e PI3K, mostrando que o NO pode atuar aumentando o transporte transendotelial de insulina também por um mecanismo independente da ativação de algumas vias de sinalização intracelular do receptor de insulina (WANG et al., 2013). Por fim, foi observado que o NPS promoveu S-nitrosilação e redução da atividade da proteína tirosina fosfatase 1 B (PTP1B) em células endoteliais aórticas de ratos, essa enzima está envolvida com a inibição da sinalização intracelular da insulina através da desfosforilação de tirosina do receptor de insulina e seus substratos primários (por exemplo IRS e Src) (WANG et al., 2013).

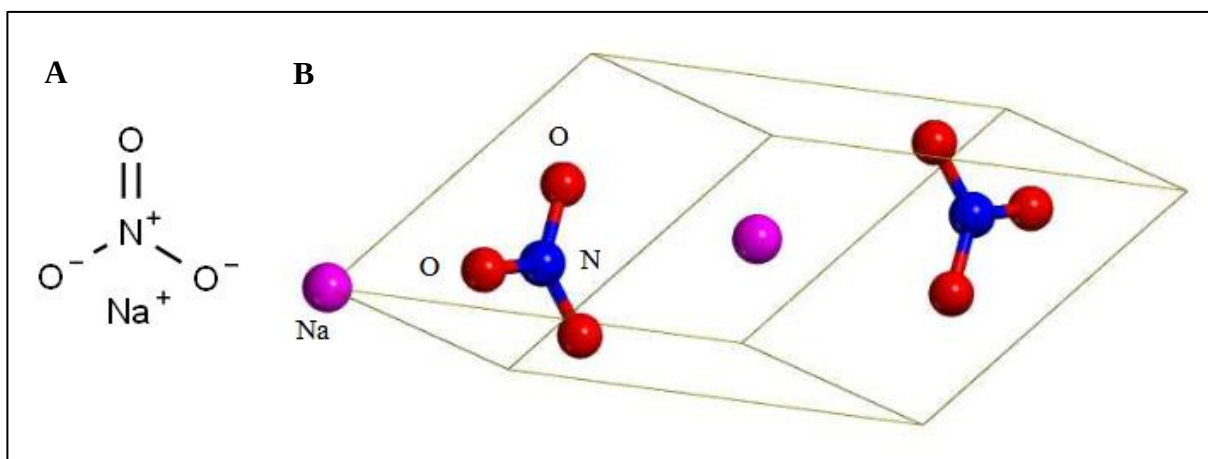
3.6 Utilização de nitratos em modelos animais diabéticos

Sabe-se que há uma desregulação no metabolismo do NO no diabetes mellitus, além disso, foi observado que o tratamento com nitrato promove aumento na biodisponibilidade do NO (CARLSTRÖM et al., 2010; KAPIL et al., 2013; LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015; OGHBAEI et al., 2020). A maioria dos estudos que investigam a ação antidiabética de nitratos utilizam o NaNO_3 , um nitrato inorgânico, além disso, os modelos animais com DM2 (STZ + dieta hiperlipídica) são os mais comumente estudados.

O nitrato de sódio é um sal inorgânico de um metal alcalino, sendo um sólido cristalino, inodoro e incolor; representado pela fórmula molecular NaNO_3 (BOURAHILA; MOUSTEFAI,

2015). É formado pela ligação iônica entre o cátion sódio (Na^+) e o ânion nitrato (NO_3^-), este último por sua vez possui três átomos de oxigênio ligados a um átomo de nitrogênio central. Em temperatura ambiente, o NaNO_3 pertence ao grupo espacial romboédrico e possui duas unidades de fórmula NaNO_3 na célula unitária; os dois íons NO_3^- são orientados em planos perpendiculares ao eixo óptico (BOURAHILA; MOUSTEFAI, 2015; PALIK, 1997) (Figura 3).

Figura 3: Estrutura química do nitrato de sódio (NaNO_3). A: Estrutura trigonal plana do NaNO_3 . B: Orientação espacial em célula única contendo duas moléculas de NaNO_3 .



Na: sódio; O: oxigênio, N: nitrogênio.

Fonte: Adaptada de BOURAHILA; MOUSTEFAI, 2015.

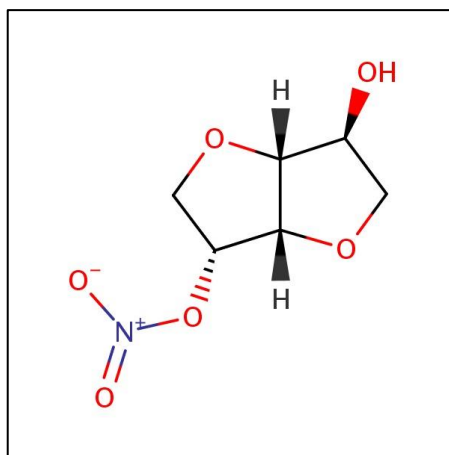
Estudos anteriores têm evidenciado efeitos benéficos do NaNO_3 nas alterações metabólicas e cardiovasculares encontradas em animais diabéticos (GHEIBI et al., 2018; LUNDBERG; CARLSTRÖM; WEITZBERG, 2018; OGHBAEI et al., 2020; TIAN et al., 2020). Foi demonstrado que o NaNO_3 reduziu a pressão arterial em animais diabéticos induzidos por STZ (LUNDBERG; CARLSTRÖM; WEITZBERG, 2018). Ademais, Oghbaei et al. e Gheibi et al. mostraram que a suplementação crônica com NaNO_3 (100 mg/L, via oral por 2 meses) na água potável reduziu a glicemia e aumentou a insulina sérica em ratos com DM1 e DM2, respectivamente (GHEIBI et al., 2018; OGHBAEI et al., 2020). Outro estudo comprovou que suplementação oral com NaNO_3 (3 mmol/L, 8 semanas) reduziu a hiperglicemia e o estresse oxidativo, bem como promoveu melhora no relaxamento vascular induzido por ACh em anéis isolados de artéria aorta e reduziu a pressão arterial sistólica (PAS) em camundongos com DM2 (TIAN et al., 2020).

Há também evidências do uso de nitratos orgânicos em animais diabéticos. Foi observado que o 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP), um nitrato derivado da glicerina, promoveu melhora no relaxamento vascular em resposta ao NPS em anéis isolados de aorta, atenuou o

estresse oxidativo em pâncreas e fígado e aumentou a tolerância à glicose em camundongos com DM1 (FERNANDES-COSTA et al., 2023). Entre os nitratos orgânicos sintéticos disponíveis comercialmente, destaca-se o mononitrato de isossorbida (ISMN) uma vez que ele apresenta farmacocinética que garante maior biodisponibilidade sistêmica em comparação ao dinitrato de isossorbida e à nitroglicerina (ABSHAGEN, 1992; NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2018).

O ISMN é um nitrato orgânico cuja fórmula molecular é $C_6H_9NO_6$ (Figura 4), possui aparência de pó cristalino branco a amarelo claro; é administrado por via oral, a concentração máxima ($C_{máx}$) é alcançada entre 30 a 60 min após a administração, não está sujeito ao metabolismo de primeira passagem garantindo uma biodisponibilidade próxima à 100% e possui um tempo de meia-vida de 5 horas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014; PAPICH, 2016; SHIMADA et al., 2006; ZHOU et al., 2020). O uso do ISMN é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para insuficiência coronária, insuficiência cardíaca e tratamento ou prevenção de *angina pectoris*; encontra-se disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) na forma de apresentação de comprimidos de 20 e 40 mg (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2013, 2021).

Figura 4: Estrutura química do mononitrato de isossorbida (ISMN).



Fonte: LIVERTOX: CLINICAL AND RESEARCH INFORMATION ON DRUG INDUCED LIVER INJURY, 2018.

O ISMN atua como pró-fármaco para o NO que ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) em células endoteliais vasculares, aumentando as concentrações intracelulares do monofosfato

cíclico de guanosina (cGMP) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014). O cGMP ativa proteínas quinases dependentes de cGMP (por exemplo PKG), resultando em processos intracelulares que reduzem a $[Ca^{2+}]_i$, levando à desfosforilação das cadeias leves de miosina e ao relaxamento das células musculares lisas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014).

Foi classificada pela *Food and Drug Administration* como uma droga que induz lesão hepática leve (FDA, 2023). Estudos sobre toxicidade aguda do ISMN em ratos e camundongos indicaram uma toxicidade baixa, com dose letal mediana (DL50) oral de 2010 e 1770 mg/Kg respectivamente (BOLLETTINO CHIMICO FARMACEUTICO, 1989; YAKURI, 1985a). Na DL50 de 2010 mg/Kg foram observados efeitos tóxicos comportamental (ataxia), renal (aumento do volume urinário) e metabólico (diminuição da temperatura corporal) em ratos (YAKURI, 1985a). Na menor dose tóxica (TDLo, em inglês) oral de 182 mg/Kg foram observadas alterações no peso do fígado e alterações na composição sérica (bilirrubina, colesterol) em ratos (YAKURI, 1985b).

Estudo anterior avaliou o efeito antidiabetogênico do ISMN (75 mg/Kg, 8 semanas, vo.) em ratos DM1, no entanto, não foram demonstradas melhoras na hiperglicemia, disfunção endotelial e estresse oxidativo induzidos por STZ (SCHUHMACHER et al., 2011). Posteriormente, foi demonstrado que o ISMN na dose de 75 mg/Kg promoveu disfunção endotelial e aumento do estresse oxidativo em ratos e camundongos não diabéticos (OELZE et al., 2013; STEVEN et al., 2018). Esses efeitos prejudiciais podem estar relacionados à dose utilizada nos estudos mencionados, uma vez que o nitrato é convertido à NO e essa molécula em alta concentração está associada a efeitos patológicos (BAHADORAN; MIRMIRAN; GHASEMI, 2020). Ademais, quando o ISMN foi utilizado em dose mais baixa (10 mg/Kg) foram observados efeitos hepatoprotetores e anti-hiperalgésicos (ALHUSSEINY et al., 2017; VARANI et al., 2016). Estudo anterior demonstrou redução de necrose e inflamação hepáticas em camundongos com esquistossomose tratados com ISMN (10 mg/Kg, vo., 7 semanas) (ALHUSSEINY et al., 2017). Outro estudo avaliou a atividade antialodínica em camundongos com DM1/STZ que apresentavam dor neuropática diabética, os animais foram tratados com ISMN nas doses de 3, 10 e 30 mg/Kg (21 dias, v.o), sendo constatado que na dose de 3 mg/Kg não houve modificação do limiar alodínico enquanto a dose de 30 mg/Kg resultou em atividade antialodínica significativa acompanhada de intensa hipotensão cardiovascular. Por outro lado, a administração de ISMN na dose de 10 mg/Kg resultou em efeitos antialodínicos significativos com apenas hipotensão moderada, que foi de natureza transitória (VARANI et al., 2016).

Diante desse contexto, sabendo que o uso de doadores de NO em concentrações adequadas pode ser uma abordagem farmacológica adjuvante para regular a homeostase da

glicose no diabetes mellitus, o presente trabalho utilizou o ISMN na dose de 10 mg/Kg no tratamento de camundongos com DM1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e local da pesquisa

Foram utilizados 42 camundongos machos C57BL/6, com 7 semanas de idade (18 – 25 g), oriundos do Biotério do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Este local é mantido com temperatura de 21 ± 1 °C e com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes são acesas das 6 às 18 horas), com acesso à água e ração “*ad libitum*” (Labina Presence, São Paulo, Brasil). Esse trabalho foi realizado na Universidade Federal da Paraíba e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia (CEUA-CBiotec) da UFPB sob os números 7236120121 (para os protocolos envolvendo o ISMN) e 9387160419 (para os protocolos envolvendo o NaNO₃) (Anexos A e B, respectivamente).

4.2 Indução do DM1:

A STZ é uma droga tóxica para as células β produtoras de insulina das ilhotas pancreáticas, sendo captada através de transportadores de glicose GLUT2 causando alquilação do DNA e morte dessas células (DEEDS et al., 2011; LENZEN, 2008; SZKUDELSKI, 2001). Para a indução do DM1 foi realizada a injeção intraperitoneal (ip.) de estreptozotocina (STZ, 50 mg/Kg dissolvido em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5) uma vez ao dia (entre 08 h e 12 h) durante cinco dias (BROSIUS, 2009). O grupo controle recebeu apenas o veículo (tampão citrato ip. 10 mmol/L, pH 4,5 ip.).

Resumidamente, os animais foram submetidos a um jejum de 2 h antes da injeção de STZ ip. ou tampão citrato ip. e 1 h após, a fim de evitar a redução no efeito da droga a qual compete com a glicose pelo mesmo transportador (GLUT2). A glicemia foi avaliada imediatamente antes da primeira dose de STZ ou tampão citrato (1º dia) e nos 12º e 13º dias (sétimo e oitavo dias após a última dose de STZ, respectivamente), utilizando uma amostra de sangue da cauda do animal. Para isso, a cauda do animal foi higienizada com algodão embebido em álcool 70%, em seguida foi realizado um corte na ponta da cauda (1-2 mm) com tesoura cirúrgica. A

primeira amostra de sangue foi desprezada e a segunda amostra foi utilizada para o registro da glicemia utilizando glicosímetro comercial (ACCU-CHEK® Active, Roche Diabetes, Brasil). Após a leitura, o local foi limpo com algodão e realizada compressão da ponta da cauda para cessar o fluxo de sangue. O tampão citrato (0,1 M, pH 4,5) foi preparado 30 min antes da diluição da STZ e armazenado na geladeira (4 °C), em seguida, a STZ foi pesada 10 min antes da sua administração nos camundongos e imediatamente diluída no tampão citrato gelado em ambiente escuro. Em seguida, a droga foi administrada via injeção intraperitoneal no quadrante abdominal inferior esquerdo dos animais. A presença do DM1 foi confirmada quando a glicemia em jejum (2 h) foi superior à 250 mg/dL (FERNANDES-COSTA et al., 2023; KEYHANMANESH et al., 2018; OGHBAEI et al., 2020).

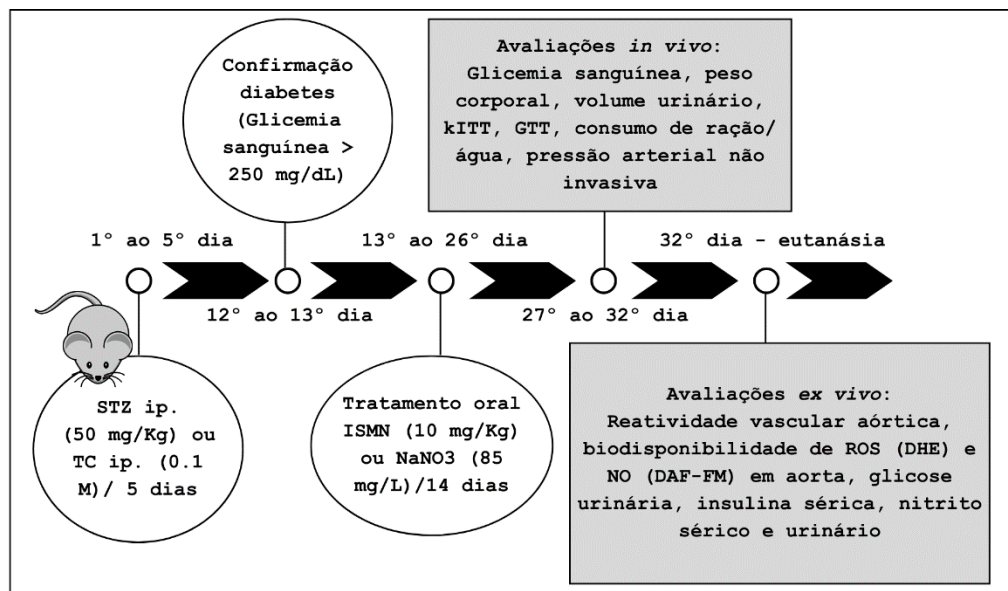
4.3 Delineamento experimental:

Após confirmação do desenvolvimento do diabetes, os animais foram tratados com ISMN (10 mg/Kg/dia) por gavagem usando uma agulha de alimentação para camundongos, uma vez ao dia (entre 08h a 10h) durante 14 dias (ALHUSSEINY et al., 2017) ou nitrato de sódio (NaNO_3) (85 mg/L) dissolvido em água de beber durante 14 dias (CARLSTRÖM et al., 2010) ou veículo (água da torneira *ad libitum* sem suplementação com nitrato).

Os animais foram distribuídos em seis grupos: controle (camundongos não diabéticos não tratados, n=7), diabetes (camundongos diabéticos não tratados, n=7), NaNO_3 (camundongos não diabéticos tratados com NaNO_3 , n=7), ISMN (camundongos não diabéticos tratados com mononitrato de isossorbida, n=7), diabetes/ISMN (camundongos diabéticos tratados com mononitrato de isossorbida, n=7), diabetes/ NaNO_3 (camundongos diabéticos tratados com nitrato de sódio, n=7). Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a avaliações metabólicas e cardiovasculares de acordo com o esquema ilustrado na figura 5. Resumidamente, nos primeiros cinco dias ocorreu a indução do DM1 com injeção ip. de STZ, em seguida, a glicose sanguínea foi avaliada em dois dias consecutivos (12º e 13º dias) para confirmação da hiperglicemia. Após, os animais receberam ISMN, NaNO_3 ou nenhuma suplementação dietética durante 14 dias (13º ao 26º dias). Imediatamente antes de iniciar o tratamento e no primeiro dia após finalizá-lo, foram mensuradas a glicose sanguínea em jejum (2 h) e o peso corporal. Após finalização do tratamento foram iniciadas as avaliações *in vivo*: no 27º dia os animais foram dispostos em gaiolas metabólicas após injeção ip. de solução salina (NaCl 0,9%) para avaliação do volume urinário durante 4 h. No 28º dia pós-tratamento foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT) e constante de decaimento de glicose após ITT (kITT), no 29º dia

pós-tratamento os animais foram alojados em caixas individuais por 24 h com acesso à água e ração em quantidade conhecida para quantificação do consumo de ração (g) e água (mL), no 30º dia pós-tratamento foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT), e por fim, nos 30º e 31º dias pós-tratamento foi realizada a adaptação à pletismografia de cauda para o registro da pressão arterial sistêmica que ocorreu no 32º dia. Ao finalizar a pletismografia de cauda, os animais foram eutanasiados e realizada a extração da artéria aorta e coleta de sangue. A aorta foi imediatamente utilizada para avaliação da reatividade vascular ou ensaio de fluorescência para detecção de ânion superóxido (ROS - DHE) e NO (DAF-FM), o sangue foi centrifugado e em seguida o soro foi coletado e armazenado para análises bioquímicas.

Figura 5: Delineamento experimental



STZ: estreptozotocina, TC: tampão citrato, ISMN: mononitrato de isossorbida, NaNO_3 : nitrato de sódio, kITT: taxa de constante de decaimento de glicose durante teste de tolerância à insulina, GTT: teste de tolerância à glicose, ROS: espécies reativas de oxigênio, NO: óxido nítrico, DAF-FM: diacetato de 4,5-diaminofluoresceína, DHE: dihidroetídio.

4.4 Avaliação de glicose sanguínea em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO_3 :

O teste de glicose sanguínea foi conduzido após 2 h de jejum, sendo avaliada a glicemia dos camundongos em três momentos: imediatamente antes da primeira dose e sete dias após a última dose de STZ (50 mg/Kg) ou veículo (tampão citrato) e por fim, após os 14 dias de tratamento com ISMN (10 mg/Kg/dia) (ALHUSSEINY et al., 2017) ou nitrato de sódio

(NaNO_3) (85 mg/L) dissolvido em água de beber durante 14 dias (CARLSTRÖM et al., 2010) ou veículo (água *ad libitum* sem suplementação). O procedimento para a coleta de amostra (gota) de sangue da cauda do animal foi o mesmo relatado no item 4.2 e o registro foi realizado através de glicosímetro comercial (ACCU-CHEK® Active, Roche Diabetes, Brasil). Todos os testes glicêmicos foram realizados com os animais conscientes sem o efeito de anestésicos, tendo em vista que a anestesia altera o fluxo sanguíneo e induz hiperglicemia em camundongos (POMPLUN et al., 2004).

4.5 Avaliação da concentração de glicose urinária em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO_3 :

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas com acesso apenas à água “*ad-libitum*” e foi realizada a coleta de urina após micção espontânea. A urina coletada durante período vespertino (entre 14 h e 17 h) foi congelada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise. A concentração de glicose foi mensurada através de um kit de detecção de glicose (*Glucose Colorimetric Detection Kit, InvitrogenTM, EIAGLUC*), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância foi detectada em leitor de microplacas a 560 nm.

4.6 Avaliação do peso corporal, consumo de ração e ingestão de água em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO_3 :

O peso corporal foi mensurado imediatamente antes e no dia subsequente ao término do tratamento com ISMN ou NaNO_3 , sendo avaliada a variação no peso corporal (Δ) entre esses dois momentos (Δ = peso pós-tratamento - peso pré-tratamento). Para avaliar o consumo de ração e água, os camundongos foram alojados em caixas individuais pela manhã (entre 08 h e 10 h) com acesso à água e ração em quantidade conhecida e após 24 h foi verificada a quantidade de água (mL) e ração (g) consumidas. Os resultados referentes ao consumo de água e ração foram normalizados por 10 g de peso corporal para análise estatística.

4.7 Avaliação do volume urinário em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO_3 :

Os camundongos receberam uma injeção ip. de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) à temperatura ambiente, gradualmente injetada no quadrante inferior do abdome (MEIJER et al., 2005). Após a injeção os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais sem acesso à ração e água e foi realizada a quantificação do volume urinário durante 4 h em intervalos de 1 h. Finalizada as 4 h de observação, os animais retornaram para as caixas habituais de alojamento. Os dados foram normalizados por 10 g de peso corporal para análise estatística.

4.8 Avaliação de tolerância à glicose em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

O teste de tolerância à glicose (GTT, em inglês) foi realizado após jejum de 14 h (*overnight*) e o mesmo procedimento relatado anteriormente (item 4.2) foi conduzido para coleta de amostras de sangue da ponta da cauda do animal utilizando glicosímetro comercial (*ACCU-CHEK® Active, Roche Diabetes, Brasil*). A glicose foi mensurada imediatamente antes (tempo 0) e aos 15, 30, 60 e 90 minutos após injeção intraperitoneal (ip.) de uma solução de glicose 25% em salina estéril (NaCl 0,9%) na dose de 2 g/Kg (AYALA et al., 2010; BOWE et al., 2014).

4.9 Avaliação de tolerância à insulina em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

O teste de tolerância à insulina (ITT, em inglês) foi realizado após 1 h de jejum e o mesmo procedimento relatado no item 4.2 foi conduzido para coleta de amostras de sangue da ponta da cauda do animal utilizando glicosímetro comercial (*ACCU-CHEK® Active, Roche Diabetes, Brasil*). A glicose foi mensurada imediatamente antes (tempo 0) e aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após injeção ip. de insulina (1 UI/Kg) (*Humulin®, insulina humana regular, Lilly, São Paulo - Brasil*) (GAZOLA et al., 2007). Em seguida, a taxa de constante de decaimento de glicose (kITT) foi calculada usando a fórmula $kITT (\% / \text{min}) = 0,693 / t_{1/2}$, onde $t_{1/2}$ foi calculado a partir da inclinação da concentração de glicose no plasma durante o período de 5 a 30 minutos após a injeção de insulina (DUSEJA et al., 2007).

4.10 Avaliação da concentração sérica e urinária de NO em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

Após eutanásia do animal (dose letal de anestésico, cetamina 300 mg/Kg e xilazina 30 mg/Kg, ip.), o sangue foi coletado através do plexo braquial. Em seguida foi centrifugado (2000 rpm, 4 °C, 15 min) e extraído o soro, o qual foi congelado a -20 °C até o momento da análise. A urina foi coletada durante o alojamento dos animais em gaiola metabólica, conforme o item 4.5, em seguida foi congelada a -20 °C até o momento da análise. A concentração de NO no soro sanguíneo e urina foi mensurada indiretamente através da quantificação de nitrito, seu produto de degradação mais estável (GREEN et al., 1982; ARCHER, 1993). Utilizamos o kit reagente de Griess (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, G-7921), o qual utiliza dois compostos: ácido sulfanílico e N-(1-naftil)-etilenodiamina. O ácido sulfanílico é convertido a um sal diazônio por reação com o nitrito presente na amostra, além disso, o sal diazônio é acoplado à N-(1-naftil)-etilenodiamina formando um corante azo que pode ser quantificado espectrofotometricamente (ARCHER, 1993; DUSSE et al., 2005). Em uma microplaca, utilizamos 50 µL de reagente de Griess + 50 µL de soro sanguíneo em cada poço. Uma amostra fotométrica de referência foi preparada com a mistura de 50 µL de reagente de Griess + 50 µL de água destilada. Essas misturas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida foi mensurada a absorbância das amostras contendo nitrito em um leitor de microplacas espectrofotométrico (548 nm). Os resultados em µM foram determinados por comparação com uma curva padrão realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 µM.

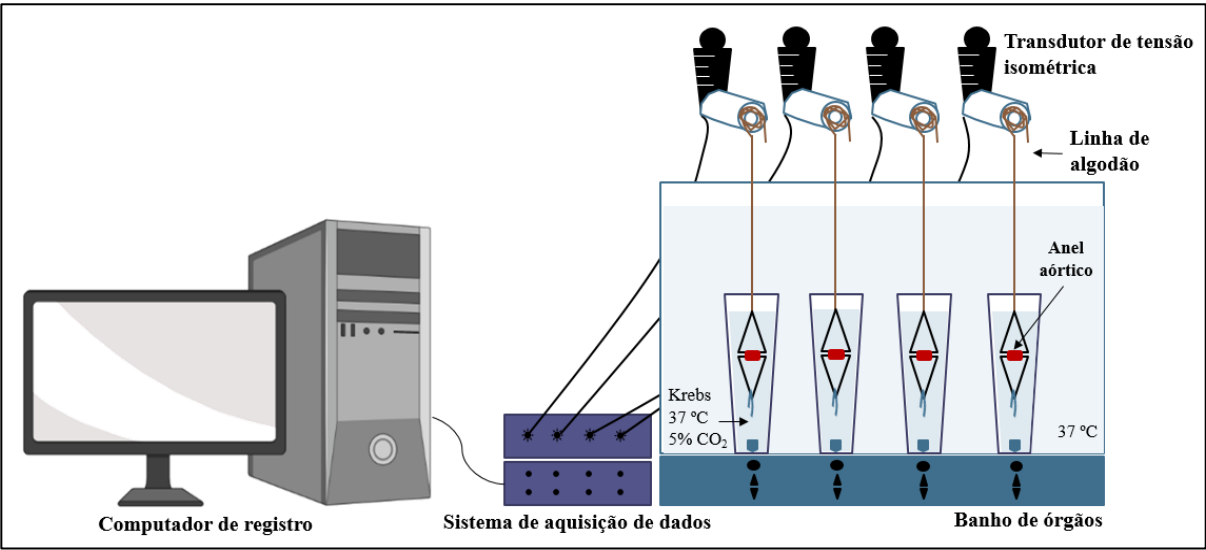
4.11 Avaliação da concentração sérica de insulina em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

Após eutanásia do animal (dose letal de anestésico, cetamina 300 mg/Kg e xilazina 30 mg/Kg, ip.), foi realizada a coleta do sangue do animal do plexo braquial. Em seguida o sangue foi centrifugado (2000 rpm, 4 °C, 15 min) e coletado o soro, o qual foi congelado a -20 °C até o momento da análise. A concentração de insulina no soro foi determinada através do ensaio ELISA utilizando o kit “Mouse INSULIN ELISA-Invitrogen” (Thermo Fisher Scientific, InvitrogenTM, EMINS) conforme instruções do fabricante.

4.12 Avaliação da reatividade vascular da artéria aorta de camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

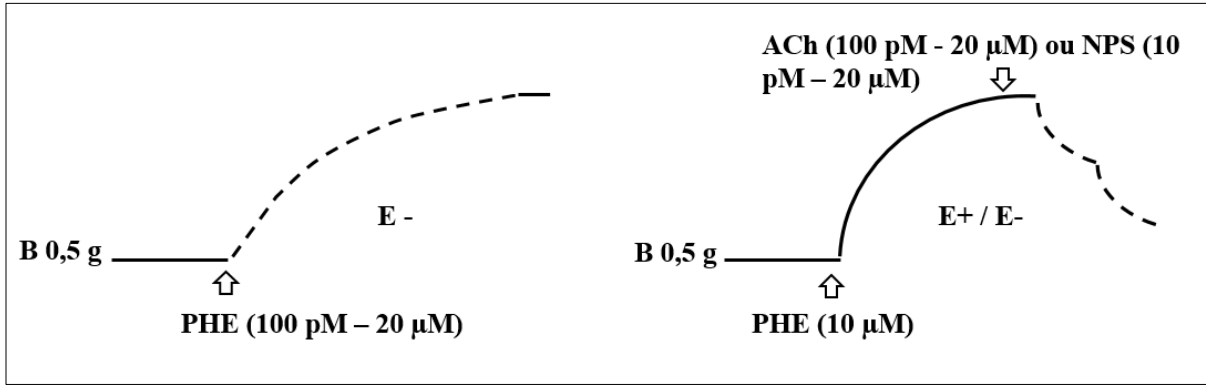
Após eutanásia do animal (dose letal de anestésico, cetamina 300 mg/Kg e xilazina 30 mg/Kg, ip.), foi realizada toracotomia e extração cuidadosa da artéria aorta torácica, que em seguida foi imersa em solução nutritiva de Krebs (pH 7,4) contida em placa de Petri composta por (em mM): NaCl 118, KCl 4,5, CaCl₂ 1,8, MgSO₄ 2,7, KH₂PO₄ 1,0, NaHCO₃ 25, glicose 11; aerada constantemente com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a 37°C. A remoção dos tecidos conectivo e adiposo foi realizada, o arco aórtico descartado e a aorta foi dividida em 3 ou 4 anéis (~3 mm de comprimento). Cada anel foi acoplado, por meio do lúmen vascular, à triângulos de aço de modo que ficassem paralelos; em seguida, os anéis foram suspensos verticalmente por linhas de algodão no interior de cubas do miógrafo (contendo 10 mL de solução de Krebs aerada com carbogênio e mantida à temperatura de 37°C) conectadas a um transdutor de tensão isométrica que se encontrava acoplado a um sistema de aquisição de dados (*ADInstruments/Panlab Organ Bath Systems*, Austrália) e ao computador para registro (Figura 6). A tensão dos anéis foi ajustada para o valor basal de 0,50 gramas, seguindo um período de estabilização de 60 minutos com lavagem das cubas com solução de Krebs a cada 15 minutos. Em seguida, foi realizado o teste de integridade do endotélio onde foi adicionado o agonista α -adrenérgico fenilefrina (PHE, 10 μ M) e, após a curva atingir o platô foi inserido o agonista de receptores muscarínicos acetilcolina (ACh, 10 μ M) para induzir relaxamento vascular através da estimulação da produção de NO pelo endotélio. O endotélio foi considerado íntegro quando houve um relaxamento superior à 50% da contração máxima atingida com PHE e considerado desprovido de endotélio quando o relaxamento foi inferior à 10%. Após lavagem e estabilização, foram realizadas curvas concentração-resposta com concentrações cumulativas de PHE (100 pM – 20 μ M, aorta sem endotélio), ACh (100 pM – 20 μ M, aorta com endotélio) e nitroprussiato de sódio (NPS, 10 pM – 20 μ M, aorta sem endotélio), com um minuto de intervalo entre as doses (Figura 7). Para as curvas concentração-resposta à ACh e a NPS foi realizada uma pré-contração com PHE (10 μ M) (BALARINI et al., 2013). Foi avaliada a contração máxima em resposta a cloreto de potássio (KCl) (125 mM) anteriormente à curva concentração-resposta à PHE nos anéis sem endotélio funcional (FERNANDES-COSTA et al., 2023; BALARINI et al., 2013). Todos os procedimentos vasculares foram realizados de acordo com BALARINI et al. (2013) e FERNANDES-COSTA et al. (2023). A sequência de doses utilizadas para realizar as curvas de PHE, ACh e NPS estão detalhadas na tabela 2.

Figura 6: Ilustração dos principais componentes utilizados para o desenvolvimento do protocolo de reatividade vascular da aorta de camundongos.



Fonte: Fernandes-Costa (2024)

Figura 7: Esquema de construção das curvas concentração-resposta à PHE, ACh e NPS em anéis aórticos de camundongos.



B: basal, PHE: fenilefrina, ACh: acetilcolina, NPS: nitroprussiato de sódio, E+: anéis com endotélio funcional, E-: anéis desprovidos de endotélio.

Tabela 2: Sequência de concentrações de fenilefrina (PHE), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) utilizadas na reatividade vascular de aorta de camundongos

Concentrações utilizadas nas curvas de reatividade vascular		
Fenilefrina (PHE)	Acetilcolina (ACh)	Nitroprussiato de sódio (NPS)
10 µl PHE 10 ⁻⁷ M	10 µl PHE 10 ⁻² M	10 µl PHE 10 ⁻² M
20 µl PHE 10 ⁻⁷ M	10 µl ACh 10 ⁻⁷ M	10 µl NPS 10 ⁻⁸ M
7 µl PHE 10 ⁻⁶ M	20 µl ACh 10 ⁻⁷ M	20 µl NPS 10 ⁻⁸ M
20 µl PHE 10 ⁻⁶ M	7 µl ACh 10 ⁻⁶ M	7 µl NPS 10 ⁻⁷ M
7 µl PHE 10 ⁻⁵ M	20 µl ACh 10 ⁻⁶ M	20 µl NPS 10 ⁻⁷ M

20 µl PHE 10 ⁻⁵ M	7 µl ACh 10 ⁻⁵ M	7 µl NPS 10 ⁻⁶ M
7 µl PHE 10 ⁻⁴ M	20 µl ACh 10 ⁻⁵ M	20 µl NPS 10 ⁻⁶ M
20 µl PHE 10 ⁻⁴ M	7 µl ACh 10 ⁻⁴ M	7 µl NPS 10 ⁻⁵ M
7 µl PHE 10 ⁻³ M	20 µl ACh 10 ⁻⁴ M	20 µl NPS 10 ⁻⁵ M
20 µl PHE 10 ⁻³ M	7 µl ACh 10 ⁻³ M	7 µl NPS 10 ⁻⁴ M
7 µl PHE 10 ⁻² M	20 µl ACh 10 ⁻³ M	20 µl NPS 10 ⁻⁴ M
20 µl PHE 10 ⁻² M	7 µl ACh 10 ⁻² M	7 µl NPS 10 ⁻³ M
	20 µl ACh 10 ⁻² M	20 µl NPS 10 ⁻³ M
		7 µl NPS 10 ⁻² M
		20 µl NPS 10 ⁻² M

4.13 Avaliação das espécies reativas de oxigênio nas artérias aortas torácicas de camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

Após anestesia dos animais (dose letal de anestésico, cetamina 300 mg/Kg e xilazina 30 mg/Kg, ip.), foi realizada toracotomia e extração cuidadosa da artéria aorta torácica. Em seguida, a aorta foi imersa em solução nutritiva de Krebs (pH 7,4) aerada constantemente com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a 37°C para remoção dos tecidos conectivo e adiposo. Após a limpeza, um segmento da artéria aorta torácica foi armazenado em recipiente contendo OCT (Tissue Tek) e realizadas secções coronais (10 µm) com o auxílio de um criostato (-20° C). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e banhadas com solução de PBS à 37 °C (em uma incubadora umidificada de CO₂ 5%). Em seguida o excesso de PBS foi removido e as lâminas foram incubadas com solução de dihidroetídio (DHE) (5 µM) durante 30 minutos em câmara umidificada de CO₂ 5%, à 37 °C e protegida da luz (TOQUE et al., 2017). Após os 30 minutos o excesso de DHE foi retirado através da lavagem das lâminas, contendo o segmento de artéria aorta torácica, em solução de PBS (3x de 5 min) à 37°C. Por fim, as lâminas foram seladas com meio de montagem contendo 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (VECTASHIELD®, CA - USA) e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência acoplado a câmera digital (Nikon Eclipse TI-E, Nikon, Japão) para análise. A intensidade de fluorescência foi quantificada em fotomicrografias utilizando o software NIS-Elements D 4.60.00 (Nikon Instruments Inc, USA).

O DHE é usado como sonda fluorescente para detectar espécies reativas de oxigênio (ROS), ele é oxidado por ânion superóxido (O₂⁻) formando o 2-hidroxi-etídio (2-OHET⁺) que emite fluorescência vermelha (WOJTALA et al., 2014).

4.14 Avaliação da biodisponibilidade de NO em artérias aortas torácicas de camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

Após anestesia dos animais, foi realizada toracotomia e extração e limpeza da artéria aorta torácica conforme descrito no item 4.12. Após a limpeza, um segmento da artéria aorta torácica foi armazenado em recipiente contendo OCT (Tissue Tek) e realizadas secções coronais (10 µm) com o auxílio de um criostato (-20° C). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e banhadas com solução de PBS à 37 °C (em uma incubadora umidificada de CO₂ 5%). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e banhadas com solução de PBS à 37 °C (em uma incubadora umidificada de CO₂ 5%). Em seguida o excesso de PBS foi removido e as lâminas foram incubadas com solução de diacetato de 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína (DAF-FM diacetato) (10 µM) durante 30 min à 37° C e protegidas da luz (MENDES-JÚNIOR et al., 2015). Em seguida, as lâminas contendo o segmento de artéria aorta foram lavadas 3x de 5 min em solução de PBS à 37°C. Por fim, as lâminas foram seladas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD®, CA - USA) e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência acoplado a câmera digital (Nikon Eclipse TI-E, Nikon, Japão) para análise. A intensidade de fluorescência foi quantificada em fotomicrografias utilizando o software NIS-Elements D 4.60.00 (Nikon Instruments Inc, USA).

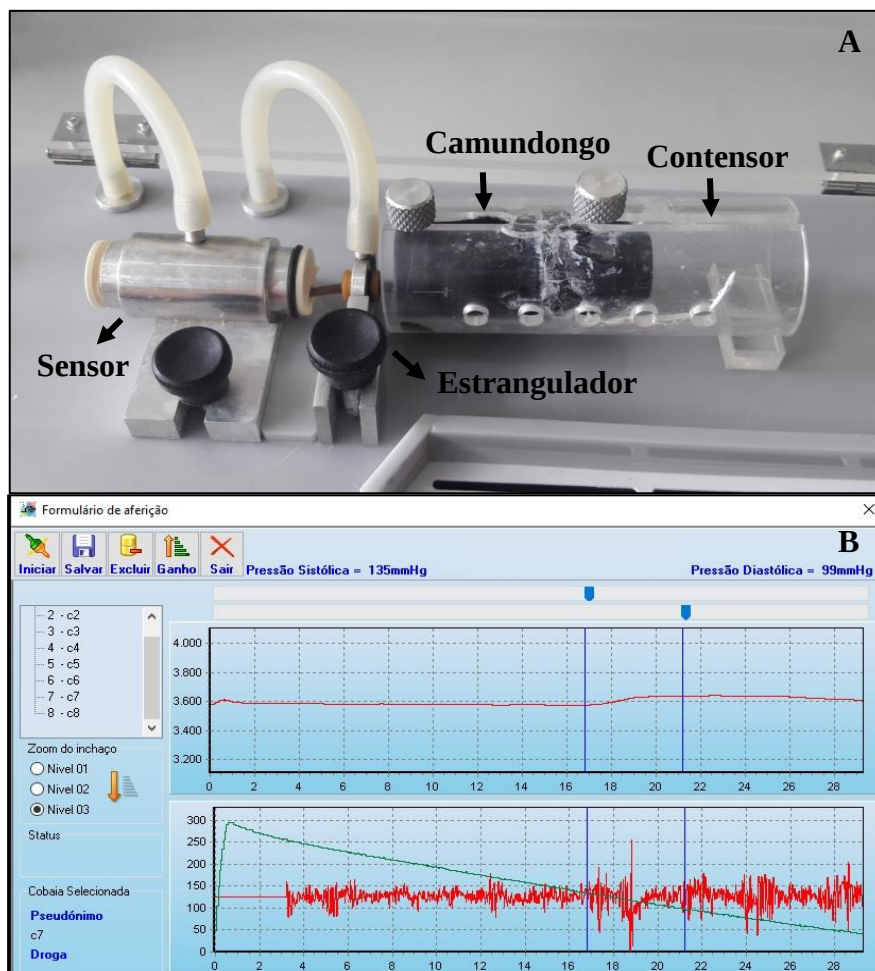
O DAF-FM diacetato é um corante fluorescente permeável à membrana celular que através da ação de esterases intracelulares é convertido para 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), este por sua vez, é impermeável à membrana celular. No interior das células, na presença de NO e O₂ o DAF-2 passa por processos químicos que levam à formação de triazolofluoresceína (DAFT), um composto que possui fluorescência verde; sendo assim, é possível monitorar a presença de NO intracelular através dessa metodologia (KOJIMA et al., 1998).

4.15 Avaliação não invasiva da pressão arterial em camundongos diabéticos tipo I tratados com ISMN ou NaNO₃:

Em experimentos com animais, a pletismografia de cauda é o método mais utilizado para acompanhamento da pressão arterial de maneira não invasiva (MALKOFF, 2005). Utilizamos o pletismógrafo de cauda (Insight, v. 2.11, Ribeirão Preto/SP) para monitorar a pressão arterial sistêmica. Utilizamos materiais com dimensões adequadas para camundongos (contensor de 34 mm, sensor de 60 x 17 mm, estrangulador 7 x 9,6 mm, látex do estrangulador 7 mm e látex do sensor de 12 mm, Bonther). Os animais foram adaptados ao procedimento durante 2 dias

consecutivos previamente ao dia do registro. Durante a execução do procedimento eles estavam contidos (contensor acrílico) e a cauda foi mantida aquecida com bolsa térmica (Medidor de Pressão, Insight, v. 2.1). O marcador da pressão diastólica foi ajustado para o ponto mais alto da primeira onda de pulso e a sistólica para o ponto imediatamente antes do início da curva do pulso (Figura 8), conforme orienta o fabricante. Uma média de 10 leituras das pressões arteriais sistólica, diastólica e média foram calculadas.

Figura 8: Registro não invasivo da pressão arterial. Painel A: Foto do pletismógrafo de cauda (Insight, v. 2.11, Ribeirão Preto/SP) para avaliação não invasiva da pressão arterial sistêmica por pletismografia de cauda. Camundongo posicionado no interior do contensor de acrílico para a realização da pletismografia de cauda, a cauda encontra-se no interior do estrangulador e sensor do aparelho. Painel B: Print do computador, mostrando a tela com o registro da pressão arterial sistólica e diastólica de um animal diabético.



Fonte: Fernandes-Costa (2024)

4.16 Drogas:

- Solução fisiológica estéril (NaCl 0.9%).
- Nitrato de sódio reagente ACS (NaNO_3 , 221341 - Sigma-Aldrich®).
- Cloridrato de L-Fenilefrina (PHE, P6126-10G - Sigma-Aldrich®).
- Acetylcholine chloride (ACh, A6625-25G - Sigma-Aldrich®).
- Sodium Nitroprusside Dihydrate (NPS, MP Biomedicals, LL, 29525 Fountain Pkwy, Solon, Ohio).
- D-(+)-Glucose (ALPHA1731 – ALPHATEC)
- Potassium chloride (KCl, 01006 – NEON)
- Mononitrato de isossorbida (ISMN, Biosintética, Brasil).
- Estreptozotocina (STZ, indutor de diabetes tipo 1, S0130 - Sigma-Aldrich®).
- Cloridrato de cetamina (Anestésico, Quetamina® Laboratório – Vetnil, Brasil).
- Xilazina (Analgésico e Relaxante muscular, Dopaser - Laboratório Calier, Espanha).
- Diacetato de diacetato de 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína (DAF-FM diacetato) (Probe de NO, 18767 - Cayman Chemical Company).
- Humulin® (Lilly, São Paulo – Brasil).

4.17 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM (erro padrão da média) e analisados pelo teste de variância Two-way (ANOVA) seguido do teste t não pareado (Tukey, software GraphPad Prism, versão 6.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Glicose sanguínea em jejum

A figura 9 e tabela 3 mostram a glicose sanguínea de jejum (mg/dL) em três momentos: imediatamente antes de iniciar a indução do DM1 com STZ (1º dia), imediatamente antes de iniciar o tratamento (13º dia) e após os 14 dias de tratamento com NaNO₃ ou ISMN (27º dia). A STZ induziu hiperglicemia nos três grupos experimentais em que foi utilizada (Diabetes, Diabetes/NaNO₃ e Diabetes/ISMN), enquanto a administração do veículo tampão citrato (TC) não alterou a glicemia dos grupos controles (controle, NaNO₃ e ISMN). Após o tratamento, ambos os nitratos NaNO₃ ou ISMN não alteraram a glicemia dos animais não diabéticos controles. No entanto, o tratamento com NaNO₃ ou ISMN promoveu redução da glicemia nos animais diabéticos. Interessantemente, essa redução foi maior nos animais diabéticos tratados com ISMN quando comparado aos tratados com NaNO₃.

Figura 9: Efeito do NaNO₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na glicose sanguínea em jejum de camundongos após indução de DM1 com STZ e após tratamento NaNO₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO₃ e ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/NaNO₃.

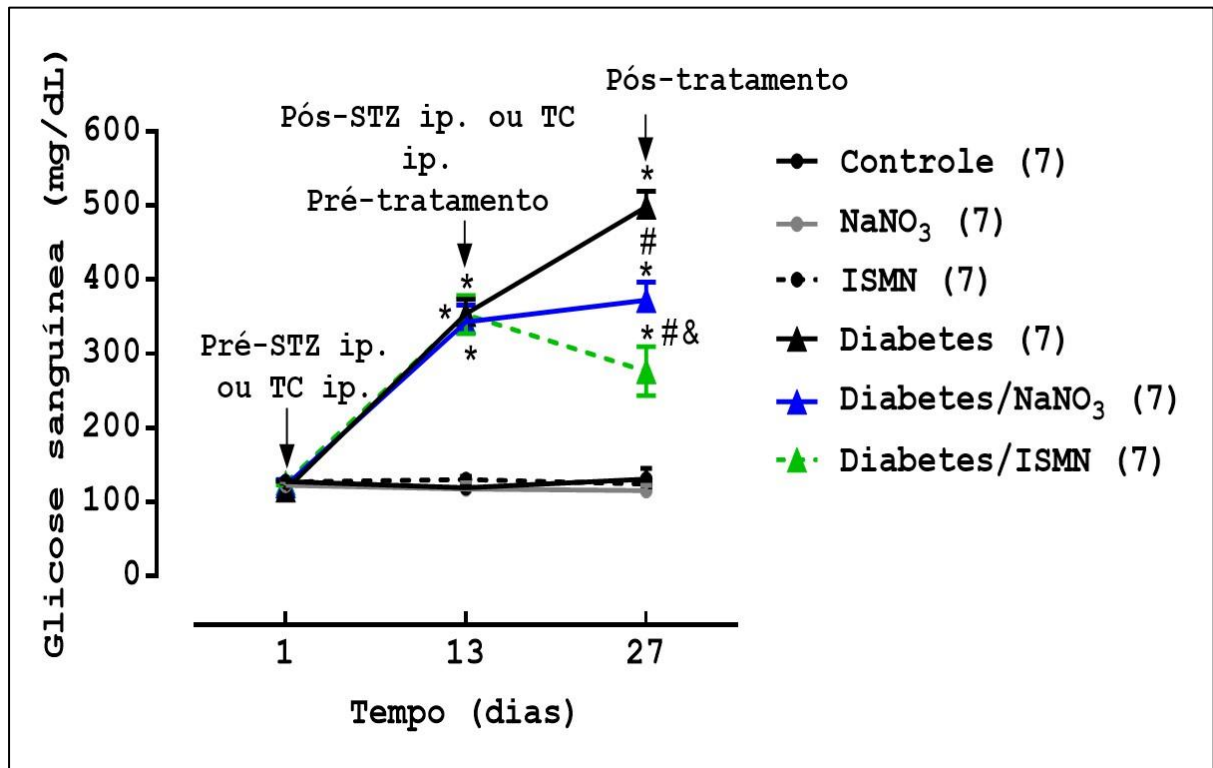


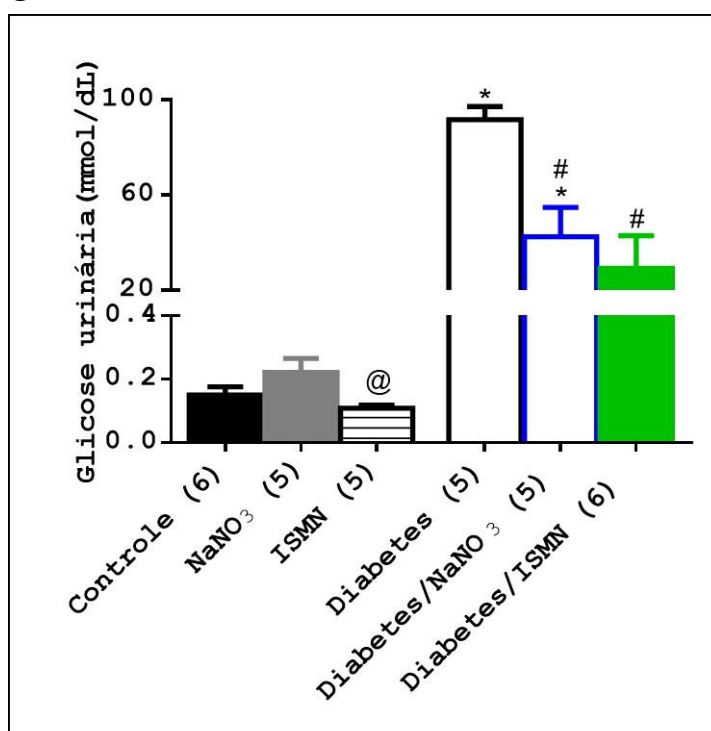
Tabela 3: Valores de glicose sanguínea em jejum (mg/dL) de camundongos após indução de DM1 com STZ e após tratamento com NaNO₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO₃ e ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/NaNO₃. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

Glicose sanguínea (mg/dL) (média $\pm$ EPM)				
Grupos	Dia 1	Dia 13	Dia 27	n
Controle	127,71 $\pm$ 2,28	119,71 $\pm$ 1,55	130,71 $\pm$ 14,42	7
NaNO ₃	122,71 $\pm$ 4,98	117,42 $\pm$ 8,62	115,43 $\pm$ 7,05	7
ISMN	127 $\pm$ 1,94	130 $\pm$ 4,54	124,43 $\pm$ 4,35	7
Diabetes	116,43 $\pm$ 11,68	354,43 $\pm$ 19,20*	498,43 $\pm$ 21,18*	7
Diabetes/NaNO ₃	122,14 $\pm$ 7,86	343 $\pm$ 22,73*	372,43 $\pm$ 24,30*#	7
Diabetes/ISMN	125,86 $\pm$ 2,75	353,14 $\pm$ 25,59*	276,5 $\pm$ 33,10*#&	7

5.2 Glicose urinária

A figura 10 mostra a glicose urinária (mmol/dL) dos animais após o tratamento com NaNO_3 ou ISMN. Foi observado que os camundongos não diabéticos tratados com ISMN ou NaNO_3 não apresentaram alteração na concentração de glicose urinária. No entanto, o tratamento com ISMN promoveu redução na glicose urinária em comparação ao tratamento com NaNO_3 ($0,11 \pm 0,01$ vs $0,22 \pm 0,04$ mmol/dL, $n=5$) nos animais não diabéticos. Por sua vez, os animais diabéticos apresentaram maior glicose urinária em relação aos animais controle não diabéticos ($91,64 \pm 5,52$ vs $0,15 \pm 0,03$ mmol/dL, $n=5$). O tratamento com NaNO_3 ($42,37 \pm 12,45$ vs $91,64 \pm 5,52$ mmol/dL, $n=5$) ou ISMN ($29,18 \pm 13,72$ vs $91,64 \pm 5,52$ mmol/dL, $n=6$) reduziram de forma similar a glicose urinária dos animais diabéticos.

Figura 10: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na glicose urinária (mmol/dL) de camundongos. @vs ISMN, *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.



5.3 Peso corporal

A figura 11 e a tabela 4 mostram o peso corporal (g) dos animais dos diferentes grupos antes e após o tratamento com NaNO_3 ou ISMN. A variação do ganho de peso (Δ = após vs. antes do tratamento) está representada nos gráficos à direita da figura. Foi observado que os

animais não diabéticos tratados ou não tratados, apresentaram aumento no peso corporal quando comparado com o peso antes do tratamento. Além disso, houve redução no ganho de peso corporal (Δ) nos animais diabéticos, mas os tratamentos com NaNO_3 ou ISMN não alteraram esse desfecho.

Figura 11: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) no peso corporal (g) de camundongos não diabéticos e diabéticos. *vs Δ controle, ΔNaNO_3 e ΔISMN , ~vs mesmo grupo antes do tratamento. Δ = Peso após o tratamento – peso antes do tratamento.

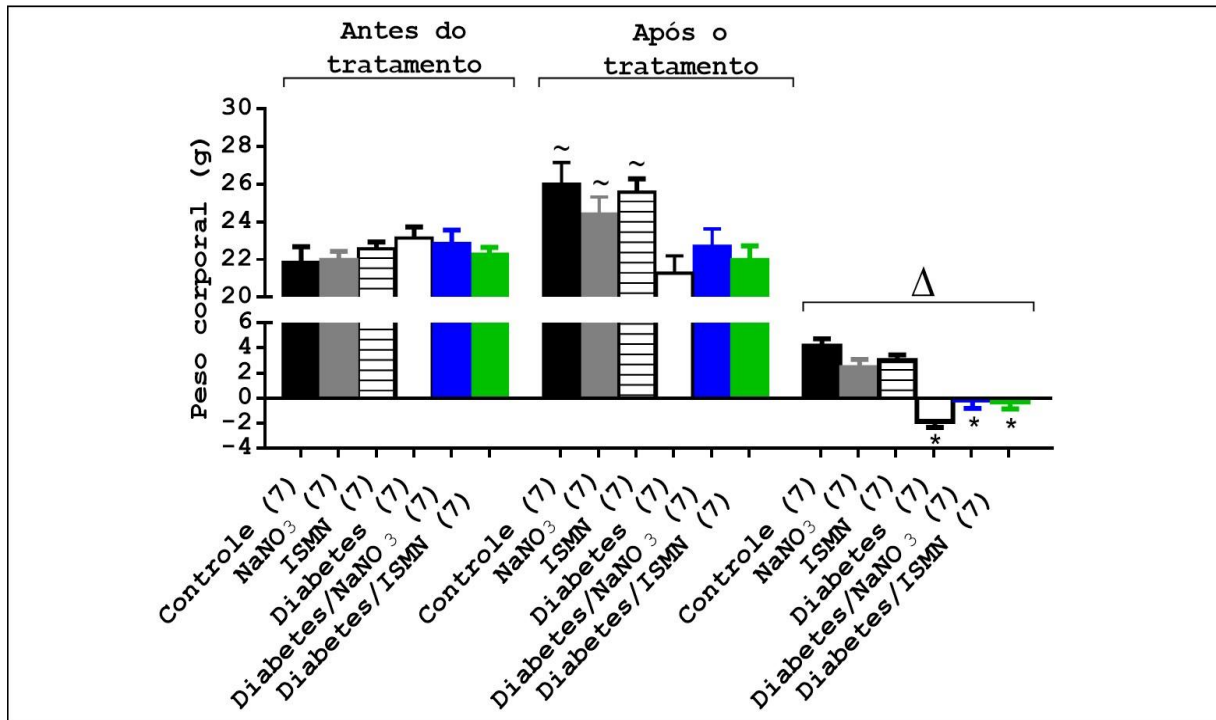


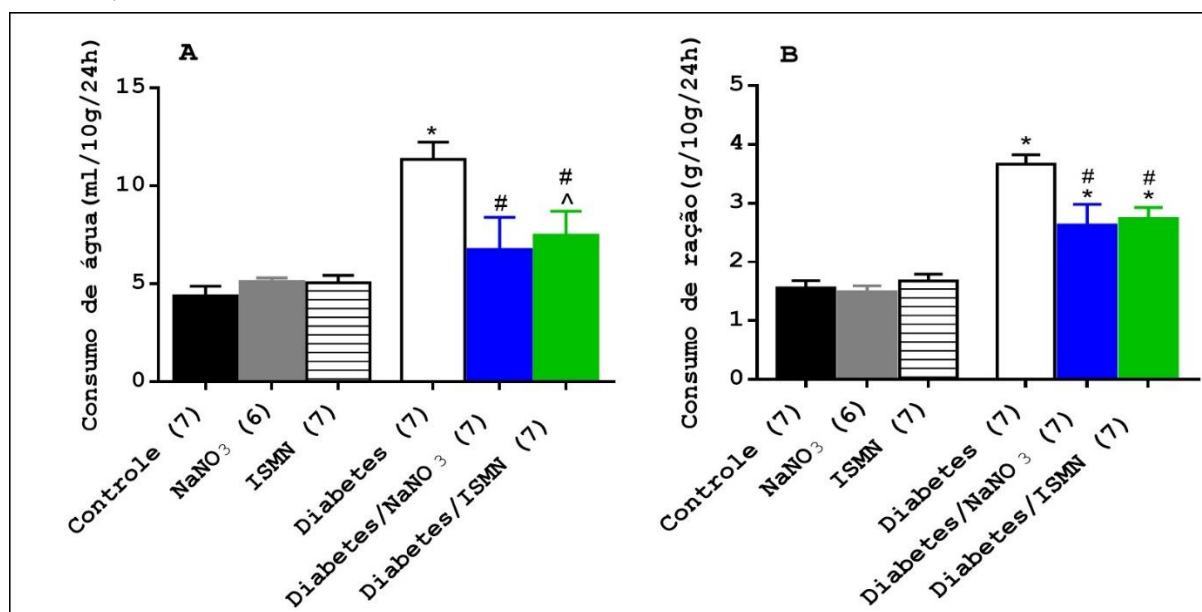
Tabela 4: Valores de peso corporal (g) de camundongos antes e após o tratamento com NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). Δ = Peso após o tratamento – peso antes do tratamento. *vs Δ controle, ΔNaNO_3 e ΔISMN , ~vs mesmo grupo antes do tratamento. Valores são apresentados como média ± EPM

Peso corporal (g) (média + EPM)				
Grupos	Antes do tratamento	Após o tratamento	Δ	n
Controle	21,86 ± 0,83	26 ± 1,15~	4,14 ± 0,59	7
NaNO_3	22 ± 0,44	24,43 ± 0,89~	2,43 ± 0,65	7
ISMN	22,57 ± 0,37	25,57 ± 0,72~	3 ± 0,44	7
Diabetes	23,14 ± 0,59	21,29 ± 0,92	-1,86 ± 0,46*	7
Diabetes/ NaNO_3	22,86 ± 0,70	22,71 ± 0,92	-0,14 ± 0,67*	7
Diabetes/ISMN	22,29 ± 0,36	22 ± 0,72	-0,28 ± 0,56*	7

5.4 Consumo de água e ração

A figura 12 mostra o consumo de água (ml/10g/24h) (Figura 12, painel A) e ração (g/10g/24h) (Figura 12, painel B) dos animais dos diferentes grupos. Foi observado que os animais não diabéticos tratados com ISMN ou NaNO_3 não apresentaram alteração no consumo de água e ração em comparação ao grupo controle. No entanto, o diabetes aumentou a ingestão de água em relação ao controle não-diabético ($11,35 \pm 0,87$ vs $4,39 \pm 0,49$ ml/10g/24h, $n=7$), a qual foi reduzida após o tratamento com ISMN ($7,48 \pm 1,22$ vs $11,35 \pm 0,87$ ml/10g/24h, $n=7$) ou NaNO_3 ($6,75 \pm 1,64$ vs $11,35 \pm 0,87$ ml/10g/24h, $n=7$) (Figura 12, A). Além disso, o diabetes aumentou o consumo de ração em relação ao controle não-diabético ($3,66 \pm 0,16$ vs $1,55 \pm 0,12$ g/10g/24h, $n=7$), o qual também foi reduzido após o tratamento com ISMN ($2,74 \pm 0,18$ vs $3,66 \pm 0,16$ g/10g/24h, $n=7$) ou NaNO_3 ($2,63 \pm 0,35$ vs $3,66 \pm 0,16$ g/10g/24h, $n=7$) (Figura 12, B).

Figura 12: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na ingestão de água (ml/10g/24h) (painel A) e consumo de ração (g/10g/24h) (painel B). *vs controle, NaNO_3 e ISMN, ^vs controle, #vs diabetes.



5.5 Volume urinário

A figura 13 e a tabela 5 mostram o volume urinário (mL/10g/4h) cumulativo (Figura 13, painel A e tabela 5) e total (Figura 13, painel B) nos diferentes grupos. Foi observado que os animais não diabéticos tratados com NaNO_3 ou ISMN não apresentaram alteração no volume urinário comparados ao grupo controle. No entanto, o diabetes promoveu aumento no volume urinário em comparação ao controle não-diabético. Entretanto, o tratamento dos animais

diabéticos com ISMN reduziu o volume urinário (mL) a partir da segunda hora de análise, enquanto com NaNO_3 foi observada redução a partir da terceira hora de análise, o que resultou em uma redução do volume urinário total nos dois grupos.

Figura 13: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) no volume urinário (mL/10g/4h) cumulativo (painel A) e total (painel B) de camundongos após injeção ip. de salina (NaCl 0,9 %, 2 mL). *vs controle, NaNO_3 e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes.

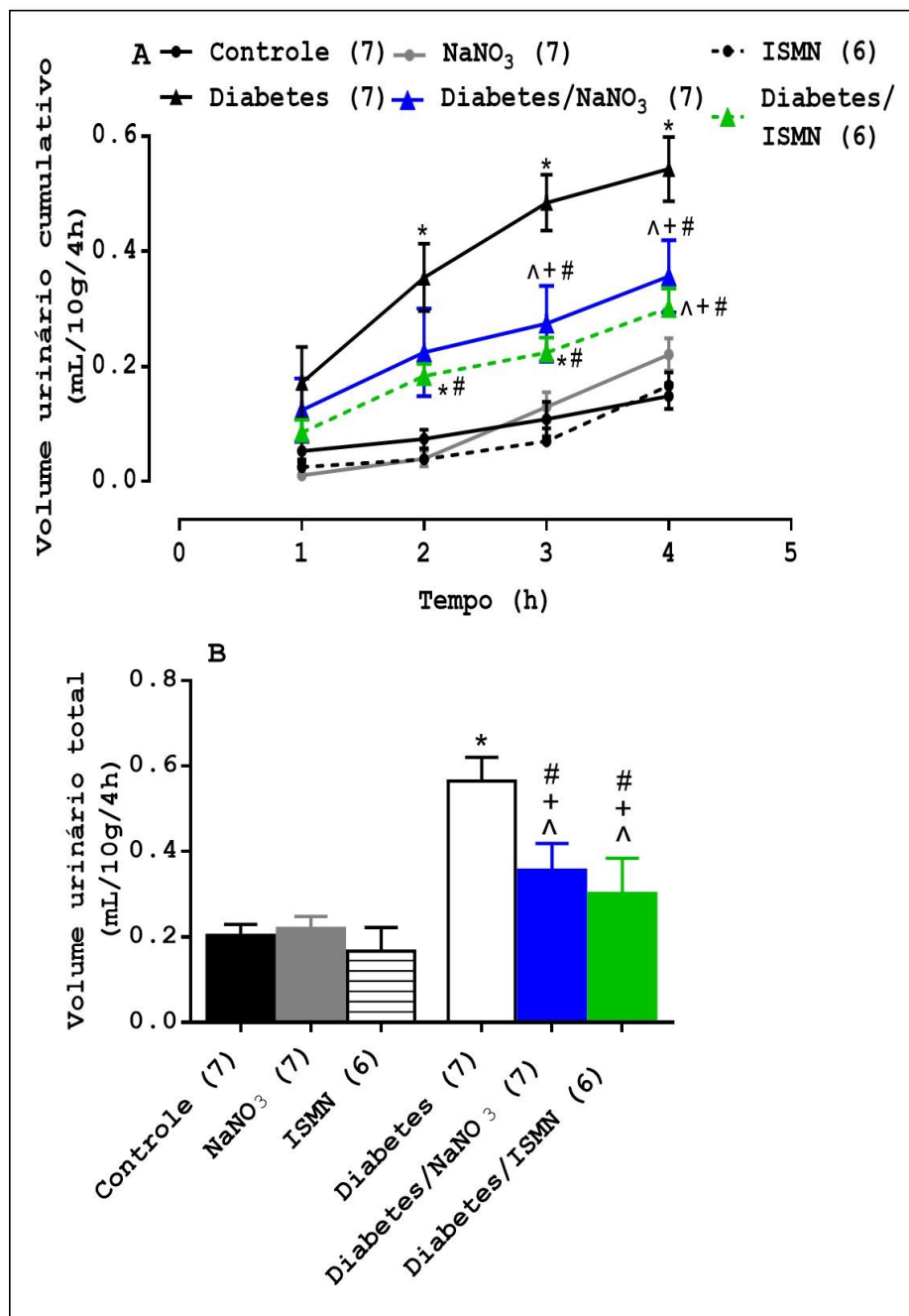


Tabela 5: Valores do volume urinário (mL/10g/4h) antes e após tratamento dos camundongos não diabéticos e diabéticos com NaNO₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO₃ e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes. Valores são apresentados como média ± EPM.

Grupos	Volume urinário (mL/10g/4h) (Média ± EPM)				n
	1h	2h	3h	4h	
Controle	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,02	7
NaNO ₃	0,01 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,22 ± 0,03	7
ISMN	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,17 ± 0,02	6
Diabetes	0,17 ± 0,06	0,35 ± 0,06*	0,48 ± 0,05*	0,54 ± 0,06*	7
Diabetes/NaNO ₃	0,12 ± 0,05	0,22 ± 0,08	0,27 ± 0,07 ^ + #	0,36 ± 0,06 ^ + #	7
Diabetes/ISMN	0,08 ± 0,02	0,18 ± 0,02*#	0,22 ± 0,03*#	0,30 ± 0,03 ^ + #	6

5.6 Tolerância à glicose

A figura 14 e a tabela 6 mostram a curva de glicemia após sobrecarga de glicose (ip.) e a respectiva área sob a curva (AUC). Foi observado que os animais não diabéticos tratados com NaNO₃ ou ISMN não apresentaram alteração na tolerância à glicose comparados ao controle. Os camundongos diabéticos apresentaram uma redução na tolerância à glicose comparados ao controle em todos os pontos da curva (15, 30, 60 e 90 min) e AUC. No entanto, o tratamento com ISMN aumentou a tolerância à glicose dos animais diabéticos, evidenciado por um menor nível de glicemia a partir dos 15 min e na AUC. Além disso, o tratamento dos animais diabéticos com NaNO₃ também aumentou a tolerância à glicose, porém essa resposta ocorreu mais tardiamente aos 90 min.

Figura 14: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) no decaimento da glicemia de camundongos durante teste de tolerância à glicose (GTT). A área sob a curva é mostrada inferiormente à direita. *vs controle, NaNO_3 e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/ NaNO_3 .

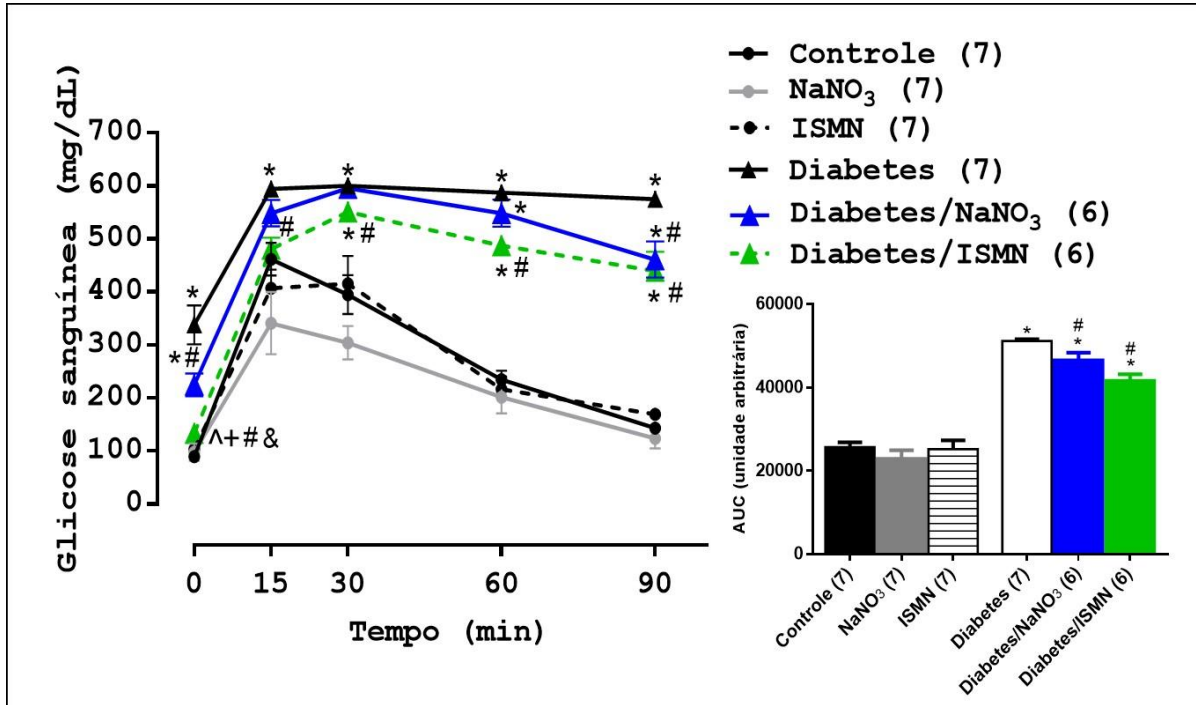


Tabela 6: Valores de glicemia (mg/dL) durante teste de tolerância à glicose (GTT) após tratamento de camundongos diabéticos com NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO_3 e ISMN, ^vs controle, +vs ISMN, #vs diabetes, &vs diabetes/ NaNO_3 . Valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

Grupos	Glicose sanguínea (mg/dL) (média $\pm$ EPM)					n
	0'	15'	30'	60'	90'	
Controle	89,14 $\pm$ 4,79	461,43 $\pm$ 30,67	394,71 $\pm$ 36,87	234,57 $\pm$ 16,29	143 $\pm$ 10,86	7
NaNO_3	97,43 $\pm$ 16,07	340,86 $\pm$ 58,46	303,86 $\pm$ 31,44	201,43 $\pm$ 30,66	123,43 $\pm$ 18,81	7
ISMN	103,28 $\pm$ 6,38	406,57 $\pm$ 35,38	415,14 $\pm$ 52,66	216,28 $\pm$ 23,63	168,57 $\pm$ 9,76	7
Diabetes	337,71 $\pm$ 36,9*	593,86 $\pm$ 4,21*	600 $\pm$ 0*	586,71 $\pm$ 9,67*	574,57 $\pm$ 13,30*	7
Diabetes/ NaNO_3	224,67 $\pm$ 21,31*#	548,17 $\pm$ 24,85	595,17 $\pm$ 4,83	548,33 $\pm$ 25,73*	460,67 $\pm$ 33,92*#	6
Diabetes/ISMN	133,50 $\pm$ 5,19 ^ + # &	480,33 $\pm$ 21,63#	550,67 $\pm$ 18,59*#	487 $\pm$ 18,43*#	439,17 $\pm$ 36,37*#	6

5.7 Tolerância à insulina

Os painéis da figura 15 mostram a curva de glicemia após sobrecarga de insulina (ip.) durante o teste de tolerância à insulina (ITT) (Figura 15, painel A), e a taxa da constante de decaimento de glicose durante ITT (kITT) (Figura 15 painel B, tabela 7) após o tratamento com NaNO_3 ou ISMN. Os dados da curva foram representados como redução percentual da glicose sanguínea basal (tempo 0) e a kITT foi avaliada a fim de garantir uma melhor análise da sensibilidade à insulina. Foi observado que os animais não diabéticos tratados com NaNO_3 ou ISMN não apresentaram diferença na sensibilidade à insulina comparados ao grupo controle. Os animais diabéticos apresentaram menor sensibilidade à insulina aos 5 min em comparação ao NaNO_3 e aos 10 min comparado ao controle, NaNO_3 e ISMN. Além disso, o tratamento com NaNO_3 (aos 5 min) ou ISMN (aos 5, 10 e 25 min) aumentou a sensibilidade à insulina dos animais diabéticos (Figura 15, painel A). Ao analisar a kITT foi constatado que os animais diabéticos não apresentaram resistência à insulina em comparação aos grupos controle, NaNO_3 e ISMN, mas o tratamento com NaNO_3 ou ISMN aumentou a sensibilidade à insulina dos animais diabéticos (Figura 15, painel B).

Figura 15: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a glicemia de camundongos durante teste de tolerância à insulina (ITT) (painel A) e constante de decaimento de glicose durante ITT (k_{ITT} , $\% \cdot \text{min}^{-1}$) (painel B). @vs NaNO_3 , ^vs controle, +vs ISMN, *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.

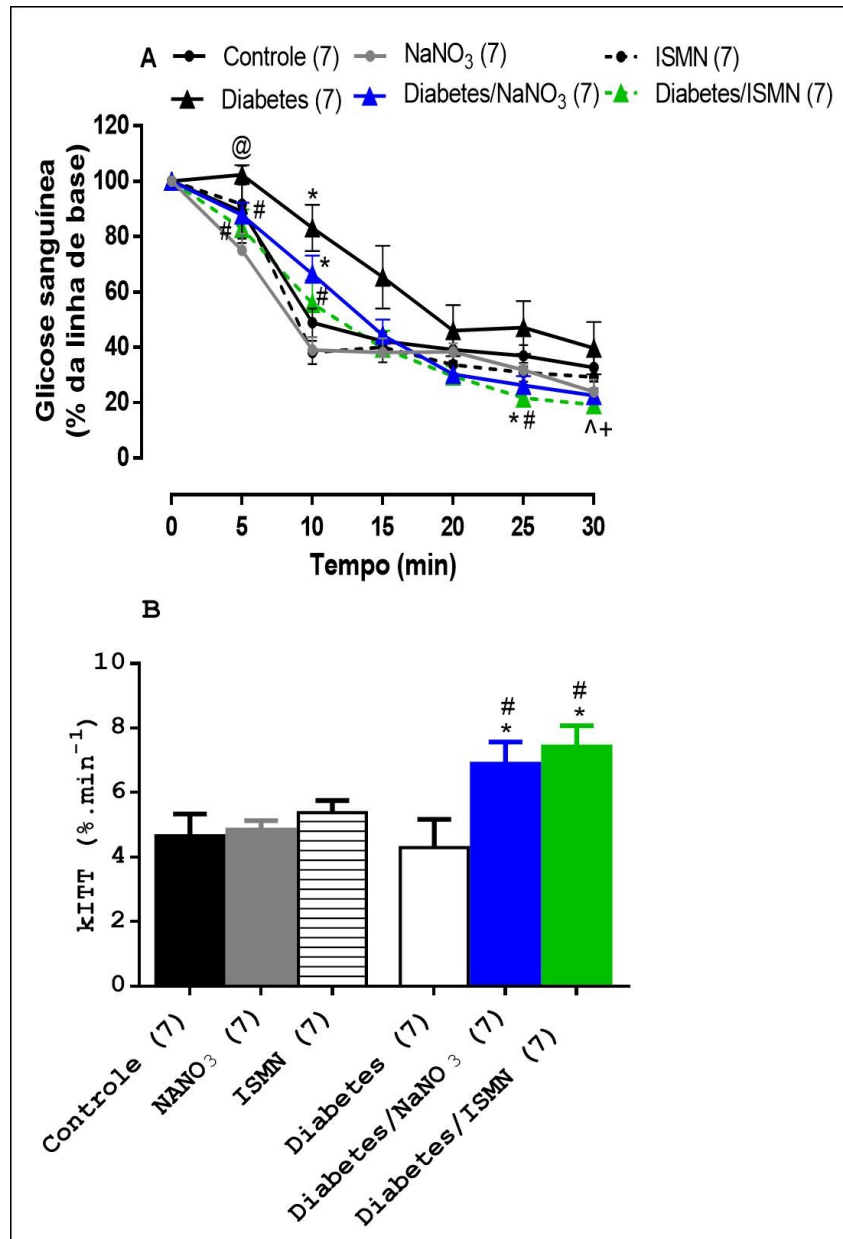


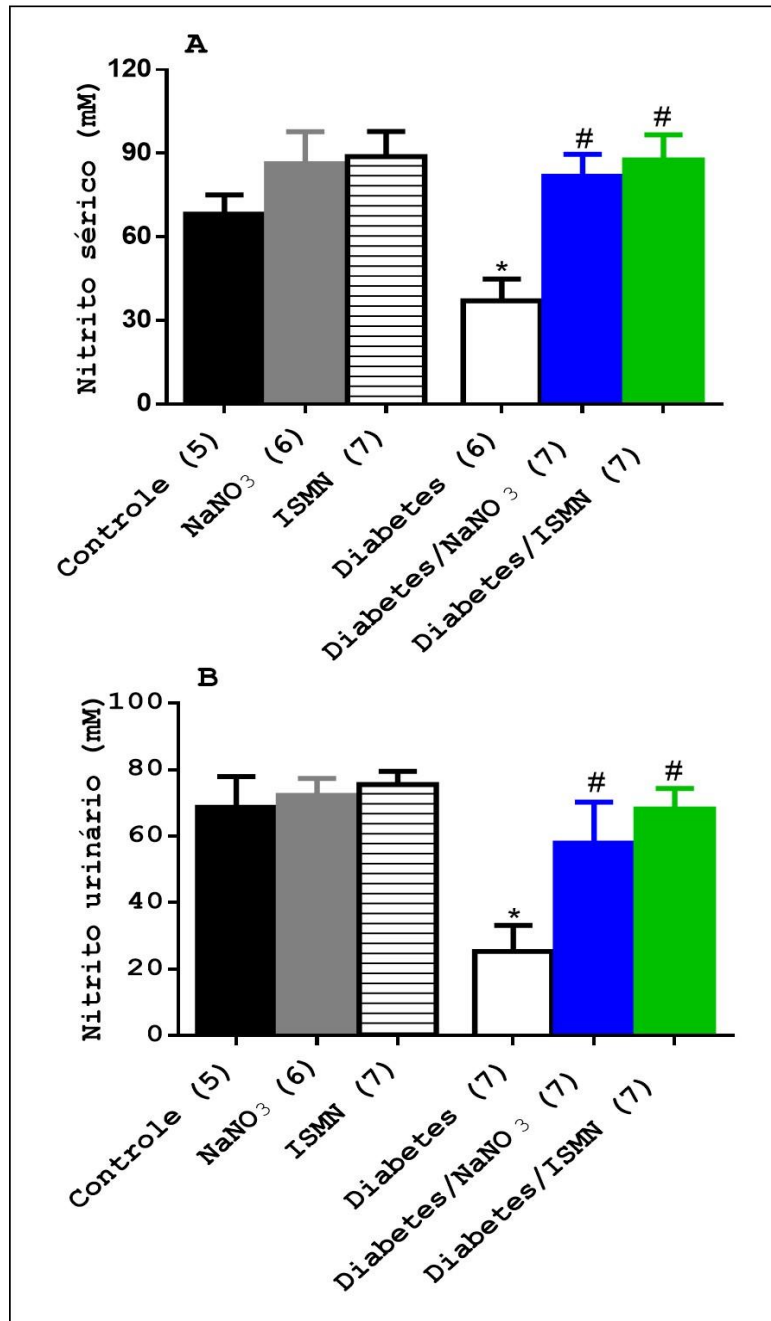
Tabela 7: Valores da constante de decaimento de glicose durante teste de tolerância à insulina (kITT) (%.min⁻¹) após tratamento de camundongos diabéticos com NaNO₃ (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg). *vs controle, NaNO₃ e ISMN, #vs diabetes. Valores são apresentados como média ± EPM.

kITT (%.min ⁻¹) (média + EPM)		
Grupos	kITT	n
Controle	4,66 ± 0,67	7
NaNO ₃	4,86 ± 0,27	7
ISMN	5,38 ± 0,38	7
Diabetes	4,29 ± 0,87	7
Diabetes/NaNO ₃	6,90 ± 0,66*#	7
Diabetes/ISMN	7,44 ± 0,63*#	7

5.8 Concentração de nitrito sérico e urinário

A figura 16 mostra a concentração de nitrito (mM) no soro (painel A) e na urina (painel B) após o tratamento com NaNO₃ ou ISMN. Foi observado que os animais não diabéticos tratados com NaNO₃ ou ISMN não apresentaram diferença na concentração de nitrito sérico ou urinário comparados ao grupo controle. Os animais diabéticos apresentaram redução no nitrito sérico comparado aos não diabéticos controle ($37,04 \pm 7,84$ vs $68,13 \pm 6,87$ mM, n=5), o que foi prevenido após tratamento com NaNO₃ ($81,79 \pm 7,84$ vs $37,04 \pm 7,84$ mM, n=7) ou ISMN ($87,64 \pm 8,98$ vs $37,04 \pm 7,84$ mM, n=7) (Figura 16, painel A). Além disso, os animais diabéticos também apresentaram redução no nitrito urinário comparado ao controle ($25,39 \pm 7,79$ vs $68,70 \pm 9,29$ mM, n=5). O tratamento com NaNO₃ ($57,98 \pm 12,30$ vs $25,39 \pm 7,79$ mM, n=7) ou ISMN ($68,21 \pm 6,18$ vs $25,39 \pm 7,79$ mM, n=7) promoveu aumento na concentração do nitrito na urina dos camundongos diabéticos (Figura 16, painel B).

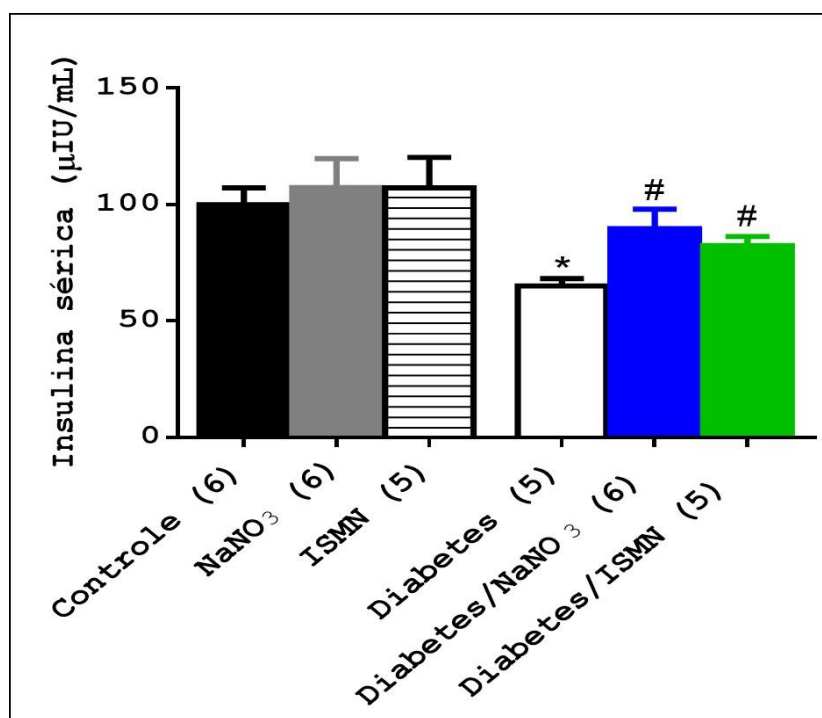
Figura 16: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a concentração de nitrito sérico (painel A) e urinário (painel B). *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.



5.9 Concentração sérica de insulina

A figura 17 mostra a concentração sérica de insulina ($\mu\text{IU/mL}$) após o tratamento com NaNO_3 ou ISMN. Foi observado que os animais não diabéticos tratados com NaNO_3 ou ISMN não apresentaram diferença na concentração de insulina comparados ao grupo controle. Os animais diabéticos apresentaram redução na insulina comparado ao controle ($65,04 \pm 3,14$ vs $99,90 \pm 7,34$ $\mu\text{IU/mL}$, $n=5$) e o tratamento com NaNO_3 ($89,63 \pm 8,46$ vs $65,04 \pm 3,14$ $\mu\text{IU/mL}$, $n=6$) ou ISMN ($82,47 \pm 3,80$ vs $65,04 \pm 3,14$ $\mu\text{IU/mL}$, $n=5$) aumentou a insulina no soro sanguíneo dos camundongos diabéticos.

Figura 17: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a concentração sérica de insulina. *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.



5.10 Reatividade vascular em aortas de camundongos diabéticos

5.10.1 Resposta vascular à fenilefrina (PHE)

A figura 18 mostra a curva concentração-resposta à PHE (Figura 18, painel A), o efeito contrátil máximo ($E_{\text{máx}}$) (Figura 18, painel B; tabela 8) e a potência (pEC_{50}) (Figura 18, painel

C; tabela 8) para PHE em anéis de artéria aorta sem endotélio funcional isolada dos camundongos. Foi observado que a PHE (100 pM – 20 μ M) produziu contrações dependentes da concentração e que os animais não diabéticos tratados com NaNO_3 ou ISMN não apresentaram diferença no $E_{\text{máx}}$ e pEC_{50} em resposta à PHE comparados ao grupo controle. Além disso, os animais diabéticos apresentaram aumento no $E_{\text{máx}}$ para PHE em comparação ao controle e aumento na pEC_{50} para PHE em comparação ao controle e NaNO_3 ; mas o tratamento dos animais diabéticos com NaNO_3 ou ISMN reduziram ambos, $E_{\text{máx}}$ e pEC_{50} .

Figura 18: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a vasoconstrição de aorta sem endotélio funcional isolada de camundongos em resposta à fenilefrina (PHE, 100 pM – 20 μ M). A: curva concentração-resposta à PHE. B: efeito contrátil máximo em resposta à PHE ($E_{\text{máx}}$). C: potência (pEC_{50}) para PHE. ^vs controle, @vs NaNO_3 , *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.

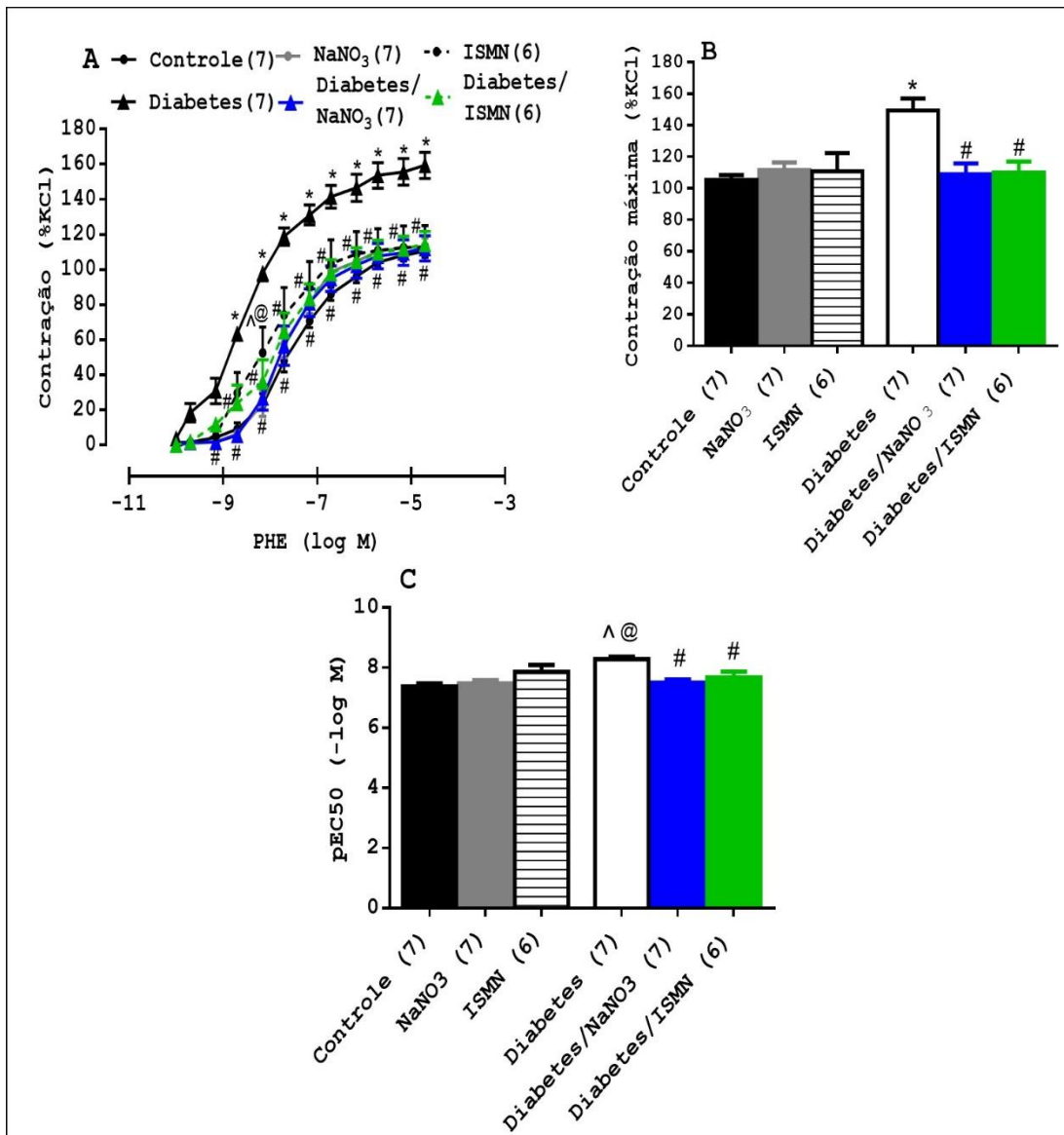


Tabela 8: Valores de eficácia ($E_{\text{máx}}$) e potência (pEC_{50}) para fenilefrina (PHE, 100 pM – 20 μ M) em anéis de artéria aorta sem endotélio isolada de camundongos. [^]vs controle, [@]vs $NaNO_3$, ^{*}vs controle, $NaNO_3$ e ISMN, [#]vs diabetes. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

	Fenilefrina (E-)		n
	pEC_{50} (-log M)	$E_{\text{máx}}$ (%)	
Controle	$7,38 \pm 0,10$	$105,3 \pm 3,07$	7
$NaNO_3$	$7,48 \pm 0,11$	$111,5 \pm 4,77$	7
ISMN	$7,86 \pm 0,23$	$110,7 \pm 11,55$	6
Diabetes	$8,29 \pm 0,08$ ^{^ @}	$149,4 \pm 7,63$ [*]	7
Diabetes/ $NaNO_3$	$7,50 \pm 0,11$ [#]	$108,9 \pm 6,85$ [#]	7
Diabetes/ISMN	$7,68 \pm 0,19$ [#]	$109,9 \pm 7,04$ [#]	6

E- = aorta sem endotélio funcional, pEC_{50} = potência, $E_{\text{máx}}$ = efeito máximo

5.10.2 Resposta vascular ao nitroprussiato de sódio (NPS)

A figura 19 mostra a curva concentração-resposta ao NPS (Figura 19, painel A), o efeito relaxante máximo ($E_{\text{máx}}$) (Figura 19, painel B; tabela 9) e a potência (pEC_{50}) (Figura 19, painel C; tabela 9) para NPS em anéis de artéria aorta sem endotélio funcional isolada de camundongos. Foi observado que o NPS (10 pM - 20 μ M) produziu relaxamentos dependentes da concentração em anéis de artéria aorta pré-contraída com PHE. Os animais não diabéticos tratados com $NaNO_3$ ou ISMN não apresentaram diferença no $E_{\text{máx}}$ em resposta ao NPS comparados ao grupo controle. Os animais diabéticos apresentaram redução no $E_{\text{máx}}$ para NPS em comparação ao controle, mas ambos os tratamentos aumentaram o vasorrelaxamento máximo que estava prejudicado nos animais diabéticos. Com relação à potência para NPS, os animais não diabéticos tratados com ISMN apresentaram aumento na pEC_{50} em comparação ao grupo controle. Além disso, os animais diabéticos apresentaram redução na pEC_{50} para NPS apenas em comparação ao grupo não diabético tratado com ISMN e ambos os nitratos não alteraram a pEC_{50} dos animais diabéticos. Ademais, os animais diabéticos tratados com ISMN apresentam aumento na pEC_{50} para NPS em comparação aos tratados com $NaNO_3$.

Figura 19: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre vasorrelaxamento de aorta sem endotélio funcional isolada de camundongos em resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS, 10 pM – 20 μM). A: curva concentração-resposta à NPS. B: efeito relaxante máximo em resposta ao NPS ($E_{\text{máx}}$). C: potência (pEC_{50}) para NPS. $^{\wedge}$ vs controle, $@$ vs NaNO_3 , $+vs$ ISMN, * vs controle, NaNO_3 e ISMN, $\#$ vs diabetes, $\&$ vs diabetes/ NaNO_3 .

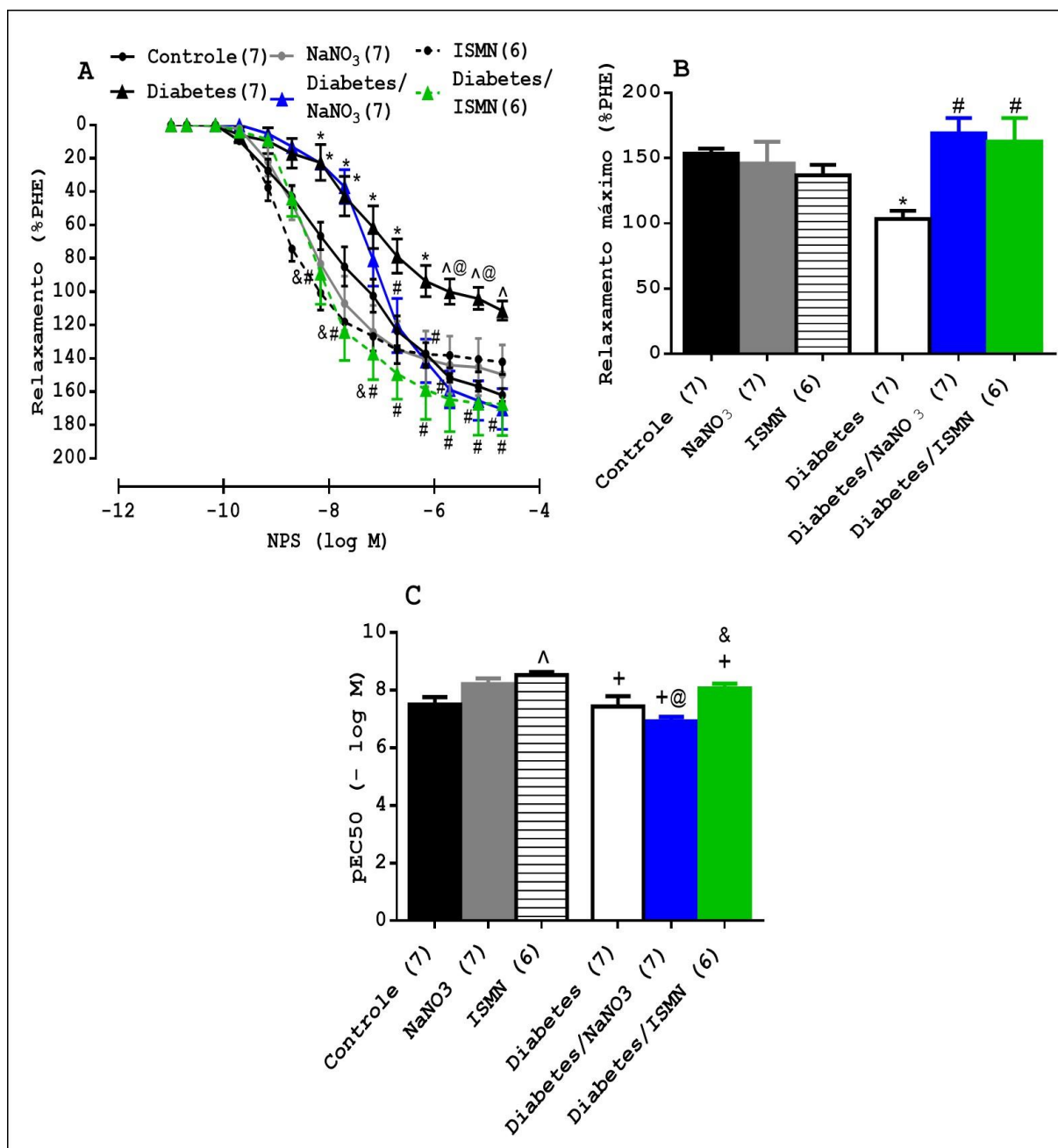


Tabela 9: Valores de eficácia ($E_{\text{máx}}$) e potência (pEC_{50}) ao nitroprussiato de sódio (NPS, 10 pM – 20 μ M) em anéis de artéria aorta sem endotélio funcional isolada de camundongos. [^]vs controle, ⁺vs ISMN, [@]vs $NaNO_3$, ^{*}vs controle, $NaNO_3$ e ISMN, [#]vs diabetes, [&]vs diabetes/ $NaNO_3$. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

	Nitroprussiato de sódio (E-)		
	pEC_{50} (-log M)	$E_{\text{máx}}$ (%)	n
Controle	7,50 $\pm$ 0,26	153,6 $\pm$ 3,83	7
$NaNO_3$	8,21 $\pm$ 0,20	145,8 $\pm$ 16,68	7
ISMN	8,53 $\pm$ 0,10 [^]	136,9 $\pm$ 8,05	6
Diabetes	7,43 $\pm$ 0,36 ⁺	103,3 $\pm$ 6,38 [*]	7
Diabetes/ $NaNO_3$	6,92 $\pm$ 0,16 + [@]	169,1 $\pm$ 11,69 [#]	7
Diabetes/ISMN	8,06 $\pm$ 0,17 ⁺ &	162,8 $\pm$ 18,02 [#]	6

E- = aorta sem endotélio funcional, pEC_{50} = potência, $E_{\text{máx}}$ = efeito máximo

5.10.3 Resposta vascular à acetilcolina (ACh)

A figura 20 mostra a curva concentração-resposta à ACh (Figura 20, painel A), o efeito relaxante máximo ($E_{\text{máx}}$) (Figura 20, painel B; tabela 10) e a potência (pEC_{50}) (Figura 20, painel C; tabela 10) para ACh em anéis de artéria aorta com endotélio funcional isolada de camundongos. Foi observado que a ACh (100 pM - 20 μ M) produziu relaxamentos dependentes da concentração em anéis de artéria aorta pré-contraída com PHE e que os animais não diabéticos tratados com $NaNO_3$ ou ISMN não apresentaram diferença no $E_{\text{máx}}$ e pEC_{50} em resposta à ACh comparados ao grupo controle. Além disso, os animais diabéticos apresentaram redução no $E_{\text{máx}}$ para ACh e redução na pEC_{50} para ACh em comparação ao controle. O tratamento dos animais diabéticos com $NaNO_3$ ou ISMN não alterou o $E_{\text{máx}}$ e a pEC_{50} para ACh.

Figura 20: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre vasorrelaxamento de aorta com endotélio funcional isolada de camundongos em resposta à acetilcolina (ACh, 100 pM – 20 μM). A: curva concentração-resposta à ACh. B: efeito relaxante máximo em resposta à ACh ($E_{\text{máx}}$). C: potência (pEC_{50}) para ACh. $\wedge$ vs controle, +vs ISMN, *vs controle, NaNO_3 e ISMN.

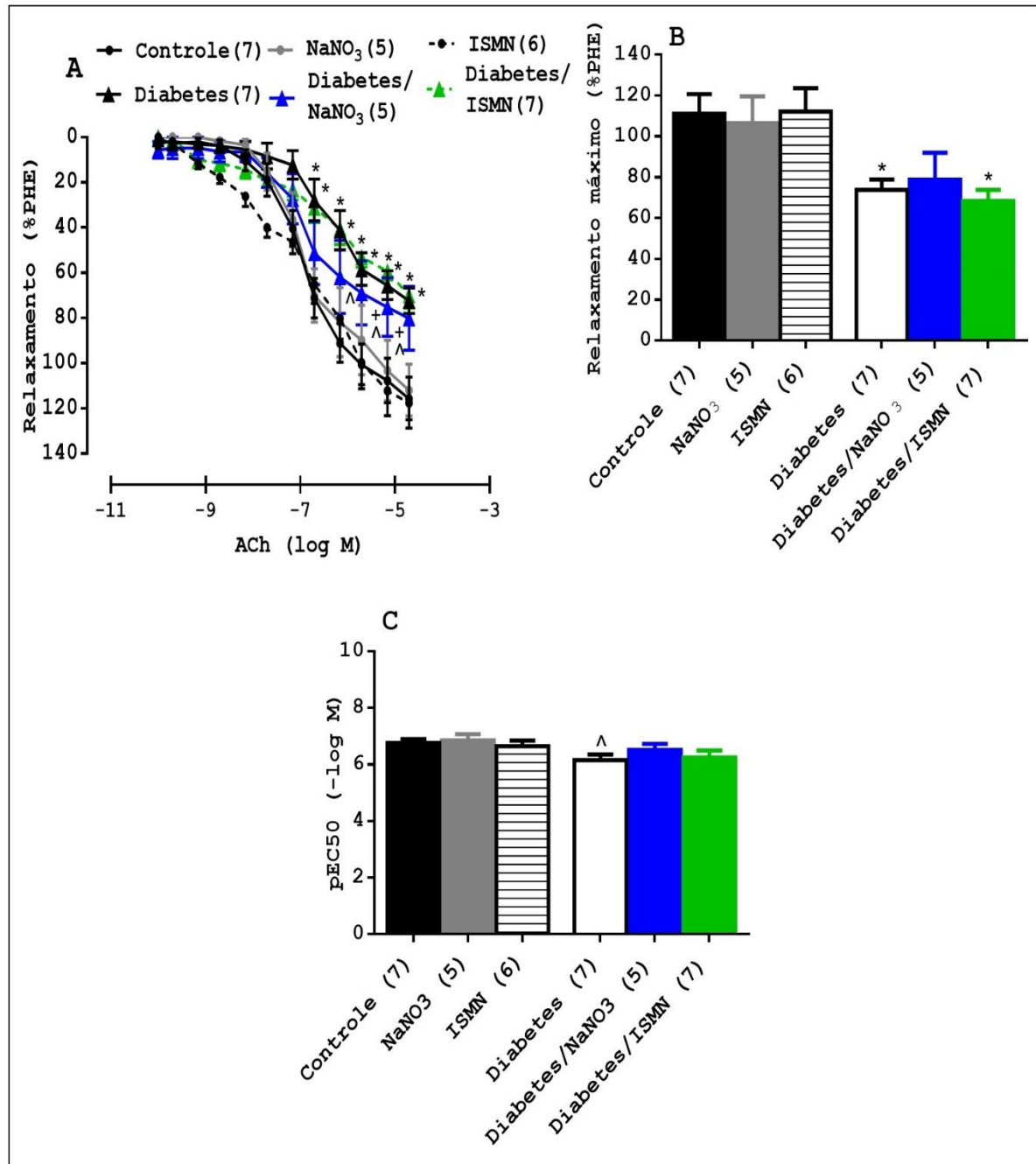


Tabela 10: Valores de eficácia ($E_{\text{máx}}$) e potência (pEC_{50}) para acetilcolina (ACh, 100 pM – 20 μ M) em anéis de artéria aorta com endotélio isolada de camundongos. ^vs controle, *vs controle, $NaNO_3$ e ISMN. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

	Acetilcolina (E+)		
	pEC_{50} (-log M)	$E_{\text{máx}}$ (%)	n
Controle	6,76 $\pm$ 0,13	111,2 $\pm$ 9,49	7
$NaNO_3$	6,73 $\pm$ 0,25	106,4 $\pm$ 13,26	5
ISMN	6,65 $\pm$ 0,20	112,1 $\pm$ 11,53	6
Diabetes	6,16 $\pm$ 0,20^	73,84 $\pm$ 5,12*	7
Diabetes/ $NaNO_3$	6,51 $\pm$ 0,22	78,86 $\pm$ 13,08	5
Diabetes/ISMN	6,24 $\pm$ 0,25	68,47 $\pm$ 5,29*	7

E+ = aorta com endotélio funcional, pEC_{50} = potência, $E_{\text{máx}}$ = efeito máximo

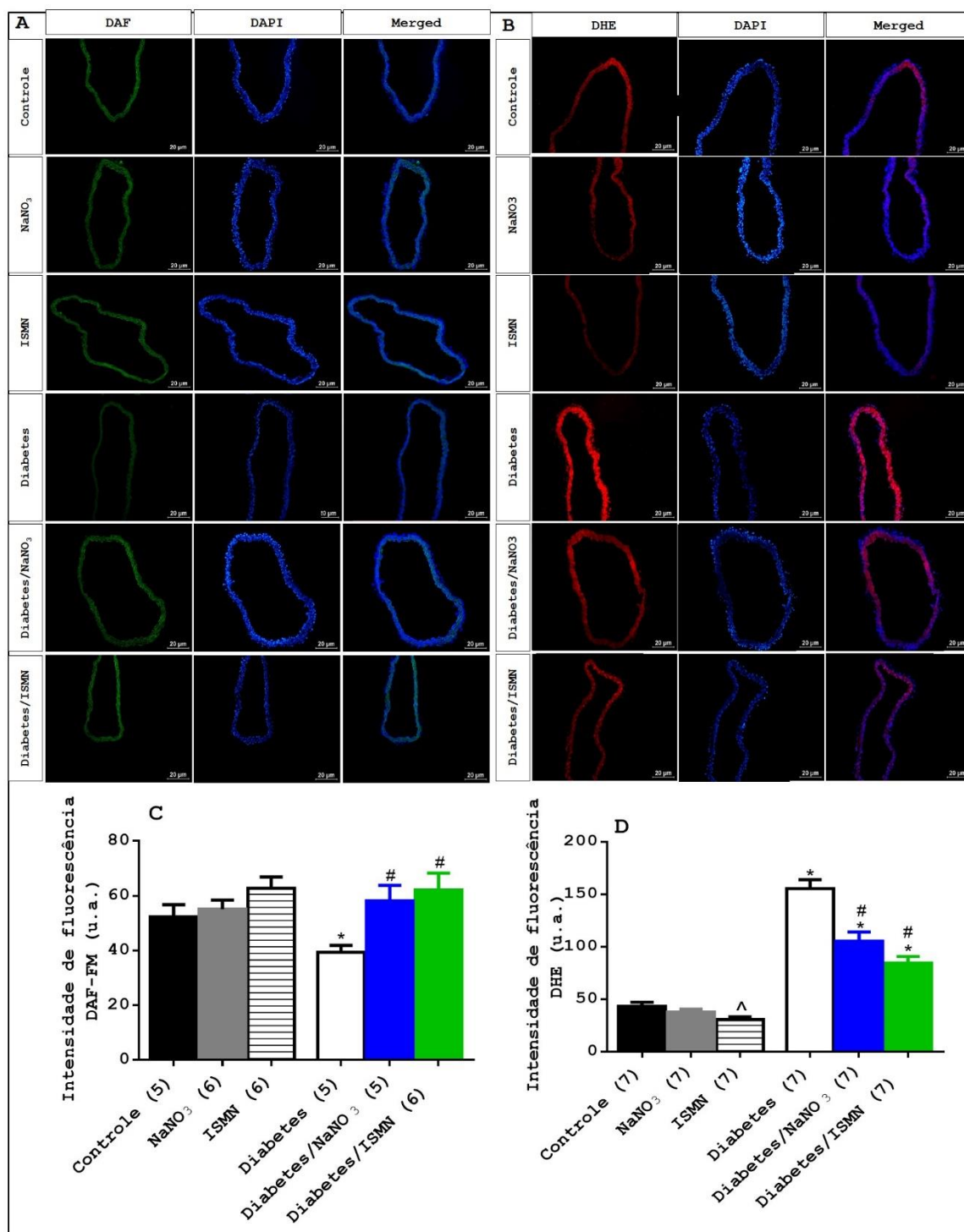
5.11 Biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico em aorta

A figura 21 apresenta micrografias representativas da intensidade de fluorescência do diacetato de 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína (DAF-FM diacetato, marcador para NO, fluorescência verde) (painel A), dihidroetídio (DHE, marcador para ROS, fluorescência vermelha) (painel B), 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, marcador para DNA/núcleo celular, fluorescência azul) (Figura 21, painéis A e B) de anéis de artéria aorta de camundongos, os valores quantitativos da média de intensidade de fluorescência do DAF-FM diacetato (Figura 21, painel C) e DHE (Figura 21, painel D). Foi observado que os animais não diabéticos tratados com $NaNO_3$ e ISMN não apresentaram diferença na intensidade de fluorescência de DAF-FM diacetato (biodisponibilidade de NO) em comparação ao controle. Além disso, os animais diabéticos apresentaram redução na biodisponibilidade de NO comparado aos grupos controle (39,39 $\pm$ 2,53 vs 52,30 $\pm$ 4,47 u.a., n=5). O tratamento com $NaNO_3$ (58,16 $\pm$ 5,67 vs 39,39 $\pm$ 2,53 u.a., n=7) ou ISMN (62,11 $\pm$ 6,22 vs 39,39 $\pm$ 2,53 u.a., n=7) promoveu um aumento no NO na aorta dos animais diabéticos (Figura 21, painéis A e C).

Com relação à biodisponibilidade de ROS na aorta, foi observado que os animais não diabéticos tratados com ISMN apresentaram redução (30,66 $\pm$ 2,58 vs 43,25 $\pm$ 3,91 u.a., n=7) na intensidade de fluorescência de DHE (ROS) em comparação ao grupo controle. Os animais diabéticos apresentaram aumento na biodisponibilidade de ROS comparado ao grupo não diabético controle (155,4 $\pm$ 8,40 vs 43,25 $\pm$ 3,91 u.a., n=7). O tratamento com $NaNO_3$ (105,5 $\pm$

8,71 vs $155,4 \pm 8,40$ u.a, n=7) ou ISMN ($84,37 \pm 6,45$ vs $155,4 \pm 8,40$ u.a., n=7) promoveu redução na biodisponibilidade de ROS nos animais diabéticos (Figura 21, painéis B e D).

Figura 21: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) sobre a intensidade de fluorescência de DAF-FM (biodisponibilidade de NO) e DHE (biodisponibilidade de ânion superóxido/ROS) em aorta de camundongos. A: imagens representativas de artéria aorta de camundongos marcadas com diacetato de 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína (DAF-FM diacetato) (10 μM , em verde), 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, em azul) e sobreposição das duas fluorescências (Merged). B: imagens representativas de artéria aorta de camundongos marcadas com dihidroetídio (DHE - 5 μM , em vermelho), DAPI (em azul) e sobreposição das duas fluorescências (Merged). C: média de intensidade de fluorescência do DAF-FM diacetato. D: média de intensidade de fluorescência do DHE. $^{\wedge}$ vs controle, * vs controle, NaNO_3 e ISMN, $^{\#}$ vs diabetes.



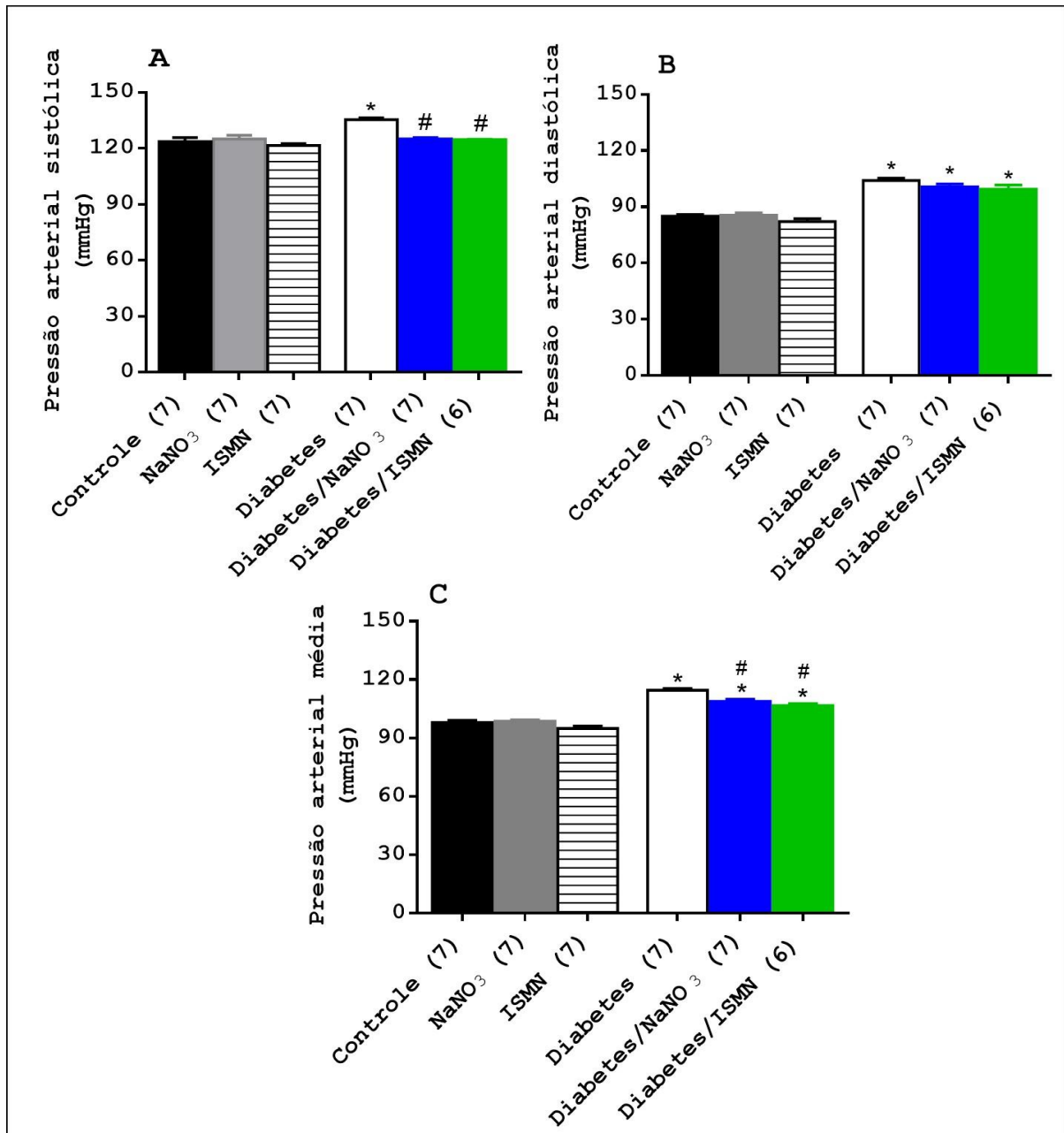
5.12 Pressão arterial sistêmica

A figura 22 mostra a pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) (Figura 22, painel A), diastólica (PAD, mmHg) (Figura 22, painel B) e média (PAM, mmHg) (Figura 22, painel C) dos animais dos diferentes grupos. Foi observado que os animais não diabéticos tratados com NaNO_3 ou ISMN não apresentaram alteração na PAS comparado ao grupo controle. Além disso, os camundongos diabéticos apresentaram aumento na PAS comparado ao controle ($135,5 \pm 0,90$ vs $123,7 \pm 2,02$ mmHg, $n=7$). O tratamento com NaNO_3 ($125,1 \pm 0,70$ vs $135,5 \pm 0,90$ mmHg, $n=7$) ou ISMN ($124,6 \pm 0,29$ vs $135,5 \pm 0,90$ mmHg, $n=6$) reduziram a PAS dos animais diabéticos.

Com relação à PAD, foi observado que os animais não diabéticos tratados com NaNO_3 ou ISMN não apresentaram alteração na PAD comparado ao grupo controle. Além disso, os camundongos diabéticos apresentaram aumento na PAD comparado ao controle ($104,0 \pm 1,27$ vs $85,01 \pm 0,87$ mmHg, $n=7$) e o tratamento com NaNO_3 ($100,6 \pm 1,49$ vs $104,0 \pm 1,27$ mmHg, $n=7$) ou ISMN ($99,49 \pm 2,24$ vs $104,0 \pm 1,27$ mmHg, $n=6$) não promoveu alterações significativa na PAD dos animais diabéticos.

A PAM dos animais não diabéticos tratados com NaNO_3 ou ISMN não apresentou alterações significativas comparadas ao grupo controle. Além disso, os camundongos diabéticos apresentaram aumento na PAM comparado ao controle ($114,5 \pm 0,90$ vs $97,91 \pm 1,09$ mmHg, $n=7$), mas o tratamento com NaNO_3 ($108,8 \pm 1,10$ vs $114,5 \pm 0,90$ mmHg, $n=7$) ou ISMN ($106,7 \pm 1,07$ vs $114,5 \pm 0,90$ mmHg, $n=6$) promoveu redução significativa da PAM dos animais diabéticos.

Figura 22: Efeito do NaNO_3 (85 mg/L) ou ISMN (10 mg/Kg) na pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), diastólica (PAD, mmHg) e média (PAM, mmHg) de camundongos. *vs controle, NaNO_3 e ISMN, #vs diabetes.



6. DISCUSSÃO

Foi observado que o ISMN e o NaNO_3 promoveram efeito anti-hiperglicêmico em camundongos diabéticos, no entanto, houve maior redução da glicemia após o tratamento com ISMN. Ambos os nitratos apresentaram efeitos metabólicos e vasculares semelhantes, tais como, redução do consumo de ração e água, redução do volume urinário, aumento da tolerância à glicose, aumento da sensibilidade à insulina, aumento da concentração sérica de insulina, aumento da concentração sérica e urinária de NO, aumento do vasorrelaxamento em resposta à NPS em anéis de aorta torácica, redução na intensidade de fluorescência de DHE (biodisponibilidade de ânion superóxido/ROS) e aumento na intensidade de fluorescência de DAF (biodisponibilidade de NO) em artéria aorta e redução na pressão arterial média de camundongos DM1/STZ.

É importante destacar que o tratamento com ISMN na dose de 75 mg/Kg induz efeitos prejudiciais em animais com DM1 e não diabéticos, tais como aumento do estresse oxidativo e disfunção vascular (OELZE et al., 2013; SCHUHMACHER et al., 2011; STEVEN et al., 2018). Nesse sentido, estudo anterior observou que o tratamento crônico de ratos DM1 com ISMN (75 mg/Kg, v.o.) durante 7 semanas não reduziu a hiperglicemia induzida por STZ (SCHUHMACHER et al., 2011). Esse desfecho pode estar relacionado ao efeito tóxico do NO em elevadas concentrações (BAHADORAN; MIRMIRAN; GHASEMI, 2020; GHEIBI et al., 2018; LUNDBERG; CARLSTRÖM; WEITZBERG, 2018). No presente estudo, foi utilizada uma dose de ISMN mais baixa (10 mg/Kg), que promoveu redução da glicemia dos camundongos diabéticos. Em relação ao tratamento com NaNO_3 , os achados do presente estudo estão de acordo com trabalhos anteriores, os quais mostraram que a suplementação dietética com nitrato inorgânico NaNO_3 reduziu a glicemia em modelos de DM1 (KEYHANMANESH et al., 2018; OGHBAEI et al., 2020) e DM2 (GHEIBI et al., 2018; TIAN et al., 2020).

O DM1 está geralmente associado à perda de peso corporal em camundongos diabéticos STZ (HOWARTH et al., 2005; KHALIFI et al., 2015; OGHBAEI et al., 2020; SCHUHMACHER et al., 2011). No presente estudo, foi observada redução no ganho de peso corporal induzida pela STZ, mas o tratamento com ambos os nitratos não promoveu alterações significativas nesse parâmetro. Similarmente, o tratamento com ISMN na dose de 75 mg/Kg não preveniu a perda de peso observada em ratos DM1/STZ (SCHUHMACHER et al., 2011). Em contrapartida, o tratamento de ratos DM1/STZ com NaNO_3 durante 60 dias promoveu aumento significativo no peso corporal a partir de 37 dias de suplementação; esse efeito pode estar relacionado ao maior nível de insulina sérica encontrado ao final do estudo (OGHBAEI

et al., 2020). Essas discrepâncias podem estar relacionadas ao tempo de duração do tratamento, uma vez que o maior tempo de tratamento com NaNO_3 no estudo de Oghbaei et al. (2020) pode ter influenciado na ingestão alimentar e/ou metabolismo energético.

Foi observado um aumento no volume urinário em camundongos DM1/STZ o qual foi reduzido pelos tratamentos com ISMN ou NaNO_3 . É conhecido que o DM também está associado à poliúria, polidipsia e polifagia (ADINORTEY, 2017; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2022). A hiperglicemia promove a saturação dos transportadores de glicose no túbulo renal proximal, resultando em glicosúria (ADINORTEY, 2017). O aumento da glicose nos túbulos renais aumenta a pressão osmótica, prejudicando a reabsorção de água pelos rins e resultando em poliúria (FORBES; COOPER, 2013; RIZZA, 2010). A redução da poliúria induzida por DM1/STZ após tratamentos com ambos os nitratos estão de acordo com estudo anterior, no qual o tratamento com nitrato orgânico NDBP (40 mg/Kg, i.p. por 14 dias) promoveu redução no volume de urina em camundongos DM1/STZ (FERNANDES-COSTA et al., 2023).

Também foi observado aumento na ingestão de água (polidipsia) e no débito urinário (poliúria) induzidos nos camundongos DM1/STZ, os quais foram significativamente reduzidos após o tratamento com ISMN ou NaNO_3 . Corroborando esses achados, nosso grupo de pesquisa observou anteriormente que o NDBP reduziu a poliúria e a polidipsia induzidas por STZ em camundongos com DM1 (FERNANDES-COSTA et al., 2023).

O tratamento com nitratos pode melhorar o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular através dos seus efeitos vasodilatadores, o que pode ajudar a reduzir a pressão osmótica nos túbulos renais. Além disso, foi observado que os tratamentos com os nitratos promoveram redução da glicemia no diabetes/STZ, corroborando para menor filtração e concentração de glicose nos túbulos renais, o que contribui para redução da pressão osmótica e aumento da reabsorção de água, reduzindo a poliúria e polidipsia.

Em animais com DM1, a deficiência na produção de insulina prejudica a absorção de glicose pelos tecidos, provocando a liberação de hormônios como a orexina que estimula o centro de ingestão alimentar no hipotálamo (ADINORTEY, 2017). De fato, foi observada polifagia em camundongos diabéticos/STZ, que foi reduzida após tratamento com ISMN e NaNO_3 . Corroborando esses achados, estudo anterior mostrou que o NDBP (40 mg/Kg, 14 dias i.p.) promoveu redução na ingestão de água e ração em camundongos com DM1/STZ (FERNANDES-COSTA et al., 2023).

Não há estudos anteriores que avaliaram a ingestão hídrica, o consumo de ração e o volume urinário em animais com DM1/STZ tratados com NaNO_3 ou ISMN. No entanto, em ratos adultos com DM2 foi observado que a suplementação dietética com NaNO_3 (100 mg/L, via oral por 2 meses) não preveniu a polidipsia e a polifagia induzida por STZ (GHEIBI et al., 2018; KHALIFI et al., 2015). Esses diferentes efeitos do nitrato podem estar relacionados ao modelo animal, pois no presente estudo foram utilizados camundongos ao invés de ratos, bem como ao método de indução do diabetes, uma vez que os autores supracitados utilizaram dieta hiperlipídica + STZ ou STZ + nicotinamida.

Foi observado que o modelo animal de diabetes/STZ não desenvolveu resistência à insulina, mas ambos os tratamentos foram eficazes no aumento da sensibilidade à insulina e consequentemente no aumento da tolerância à glicose em camundongos com DM1. Esses efeitos podem explicar a capacidade anti-hiperglicêmica tanto do ISMN quanto do NaNO_3 . Esses resultados corroboram estudo anterior que utilizou um nitrato orgânico, NDBP (40 mg/Kg, i.p. por 14 dias), e evidenciou aumento na tolerância à glicose em camundongos com DM1/STZ (FERNANDES-COSTA et al., 2023).

Sabe-se que o NO facilita o recrutamento capilar e aumenta o fluxo sanguíneo, melhorando a entrega de insulina aos tecidos periféricos (BARRETT et al., 2011). A maior tolerância à glicose após tratamento com doadores de NO também pode ser explicada pelo aumento da expressão de GLUT4 nos tecidos periféricos. Estudo de Gheibi et al. (2018) mostrou que o tratamento de ratos DM2 com NaNO_3 aumentou o nível de mRNA e proteína de GLUT4 no músculo sóleo e no tecido adiposo, contribuindo para melhor absorção periférica de glicose (GHEIBI et al., 2018). Outro estudo mostrou que o uso do doador de NO nitroprussiato de sódio aumentou os níveis de GLUT4 na superfície celular do músculo esquelético de ratos através da ativação da via cGS/cGMP, independente da ativação de PI3K (ETGEN; FRYBURG; GIBBS, 1997). Além disso, alguns autores sugerem que o NO pode induzir a S-nitrosilação do GLUT4, estimulando a translocação desta proteína para a membrana plasmática no músculo esquelético e no tecido adiposo (BAHADORAN et al., 2015; JIANG et al., 2014).

Sabe-se que o nitrito (NO_2^-) aumenta o fluxo sanguíneo nas ilhotas pancreáticas de ratos, o que pode contribuir para o aumento da secreção de insulina em animais diabéticos com reserva de células β pancreáticas (NYSTRÖM et al., 2012). É conhecido que o nitrato no estômago e/ou corrente sanguínea é convertido à nitrito (GHEIBI et al., 2018; LUNDBERG; CARLSTRÖM; WEITZBERG, 2018). De fato, foi observado um aumento na insulina sérica em camundongos diabéticos tratados com ISMN ou NaNO_3 . Corroborando esses achados, também foi observado aumento na concentração sérica de insulina em ratos com DM1/STZ

após tratamento crônico (60 dias) com NaNO_3 (KEYHANMANESH et al., 2018; OGHBAEI et al., 2020). Além disso, outros estudos utilizaram suplementação oral com NO_3^- ou NO_2^- e mostraram aumento na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina em animais com DM2 (GHEIBI et al., 2017, 2018; OHTAKE et al., 2015). A redução na concentração de insulina em ratos e camundongos diabéticos/STZ é compatível com a redução da área total das ilhotas pancreáticas e da porcentagem de células β pancreáticas por ilhota (ALI; MUSTAFA, 2023; HAN et al., 2017; KASONO et al., 2004; KIM et al., 2023; NING et al., 2011; NOVIKOVA et al., 2013).

Foi observado que os animais tratados com ISMN ou NaNO_3 apresentaram aumento na concentração de metabólitos de óxido nítrico no soro e na urina. Esse achado corrobora estudos anteriores que também mostraram que os efeitos do tratamento com NO_3^- em animais diabéticos poderiam ser devidos à conversão de NO_3^- em NO (GHEIBI et al., 2018; KEYHANMANESH et al., 2018; OGHBAEI et al., 2020).

Adicionalmente, foi observado uma melhora na função vascular na aorta de camundongos diabéticos tratados com ISMN ou NaNO_3 . Sabe-se que a hiperglicemia induz dano vascular e aumenta a contratilidade da musculatura lisa vascular (JACKSON et al., 2016; KIZUB; KLYMENKO; SOLOVIEV, 2014; PRADA et al., 2019). Foi demonstrado que o ISMN ou o NaNO_3 reduziram a vasoconstrição em resposta à PHE e aumentaram o relaxamento em resposta ao vasodilatador independente do endotélio (NPS), mas não ao dependente do endotélio (ACh), em aortas de camundongos diabéticos. Entretanto, um estudo anterior mostrou que o ISMN na dose de 75 mg/Kg (8 semanas, vo.) não alterou o vasorrelaxamento dependente e independente do endotélio na aorta de ratos diabéticos/STZ (SCHUHMACHER et al., 2011). Além disso, o ISMN na dose de 75 mg/Kg (7 dias, vo.) aumentou a resposta vasoconstritora à PHE e reduziu a resposta relaxante aos vasodilatadores dependentes do endotélio (ACh) e independentes do endotélio (NTG) na aorta de ratos não diabéticos, sem induzir tolerância (OELZE et al., 2013; STEVEN et al., 2018). Essas discordâncias podem estar relacionadas à dose utilizada. Não obstante, os estudos de Oelze et al. (2013) e Steven et al. (2018) observaram aumento do estresse oxidativo e da inflamação em animais não diabéticos após o tratamento com ISMN na dose de 75 mg/Kg.

Outro nitrato orgânico como o NDBP (40 mg/Kg, por 14 dias) também promoveu aumento do vasorrelaxamento em resposta ao NPS na aorta de camundongos diabéticos/STZ (FERNANDES-COSTA et al., 2023).

Esse estudo foi o primeiro a avaliar o efeito vasorrelaxante do NaNO_3 em animais com DM1. No entanto, foi observado anteriormente que a suplementação oral com NaNO_3 (3

mmol/L, 8 semanas) promoveu melhora no relaxamento vascular induzido por ACh em aortas de camundongos com DM2 (TIAN et al., 2020). Essa melhora da função endotelial promovida pelo NaNO_3 pode estar associada ao maior tempo de tratamento, já que no presente estudo a duração do tratamento foi de 2 semanas. Embora não se tenha observado melhora no vasorelaxamento em resposta ao vasodilatador dependente do endotélio (ACh), a melhora na vasomotricidade promovida pelo ISMN e pelo NaNO_3 pode estar relacionada à redução da glicemia, do estresse oxidativo, bem como ao aumento da biodisponibilidade do NO para a musculatura lisa vascular, promovendo menor tendência à vasoconstrição.

Os estudos que não reduziram ou causaram disfunção endotelial após tratamento com ISMN utilizaram a dose de 75 mg/Kg (OELZE et al., 2013; SCHUHMACHER et al., 2011; STEVEN et al., 2018). Foi observado um aumento na S-glutationilação da eNOS em ratos diabéticos STZ tratados com ISMN na dose de 75 mg/Kg, v.o. por 7 semanas, indicando desacoplamento ou disfunção da eNOS (SCHUHMACHER et al., 2011). Além disso, a disfunção endotelial em anéis aórticos e o aumento do estresse oxidativo no soro e na aorta, foram acompanhados por aumento da atividade da NADPH oxidase em ratos com DM1 (SCHUHMACHER et al., 2011) e ratos não diabéticos (OELZE et al., 2013; STEVEN et al., 2018) após tratamento com ISMN (75 mg/Kg). Entendemos que esse efeito patológico pode estar relacionado à dose utilizada, uma vez que os efeitos patológicos ou fisiológicos do NO são dependentes da sua concentração no organismo (BAHADORAN; MIRMIRAN; GHASEMI, 2020). As enzimas que medeiam os efeitos vasoativos do NO são sensíveis a diferentes concentrações desta molécula. Por exemplo, a guanilato ciclase, que está envolvida na via de vasorrelaxamento, é estimulada na faixa picomolar a nanomolar baixa de NO; enquanto o citocromo P450 e a citocromo oxidase mitocondrial são inibidos por dezenas a centenas nanomolar de NO (ANTUNES; BOVERIS; CADENAS, 2004; BELLAMY; GRIFFITHS; GARTHWAITE, 2002; BROWN, 2001).

A ativação de cNOS (eNOS e nNOS) produz concentrações nanomolares baixas de NO e está envolvida com as principais ações fisiológicas do NO através da ativação da via sGC-cGMP, enquanto a ativação de iNOS produz altas concentrações de NO (faixa micromolar) e está relacionada a processos patológicos especialmente através da S-nitrosilação e nitração de proteínas e da produção de peroxinitrito (ONOO^-) (BAHADORAN; MIRMIRAN; GHASEMI, 2020). O NO derivado de cNOS aumenta a secreção de insulina, melhora a sinalização e a sensibilidade à insulina, aumenta a captação periférica de glicose e diminui a produção hepática de glicose. Em contrapartida, o NO derivado da iNOS, produzido em resposta a estímulos inflamatórios, contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina (BAHADORAN;

MIRMIRAN; GHASEMI, 2020). Sabe-se que a redução da biodisponibilidade do NO, pela redução da atividade da eNOS, do desacoplamento da eNOS ou do sequestro de NO pelas ROS, bem como o aumento da atividade da iNOS ocorrem no diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 (GHEIBI et al., 2018; NAGAREDDY et al., 2005; SERIZAWA et al., 2011; SHAMSALDEEN; LIONE; BENHAM, 2020; SOKOLOVSKA et al., 2020; TESSARI et al., 2010).

Além disso, foi observado aumento na biodisponibilidade de NO em anéis de artéria aorta de camundongos diabéticos/STZ tratados com ISMN ou NaNO₃, o que pode estar relacionado com a conversão nitrato-nitrito-NO, associada à redução das espécies reativas de oxigênio (ROS). Em estudo anterior, não foi observado redução nas concentração de ROS na aorta de ratos com DM1 após tratamento com ISMN (75 mg/Kg), mas sim após tratamento com PETN (25 mg/Kg) (SCHUHMACHER et al., 2011). Conforme mencionado anteriormente, entendemos que a dose de ISMN utilizada nestes estudos podem ter promovido efeito tóxico causado pelo excesso de nitrato/NO. Da mesma forma, ISMN na dose de 75 mg/Kg promoveu a formação de ROS (coloração DHE) em anéis aórticos isolados de ratos Wistar não diabéticos (OELZE et al., 2013).

Outro estudo demonstrou que o nitrito de sódio (15 mg/Kg, durante 4 semanas) reduziu a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma e a formação de ROS em aortas de ratos hipertensos DOCA sal (AMARAL et al., 2015). Da mesma forma, nicorandil (nitrato de 2-nicotinamidoetila) (15 mg/Kg, por 5 semanas) e nitrato de 3,4-di-hidroxifenetila (HT-ONO2) (65 mg/Kg, por 10 dias) reduziram o MDA e aumentaram a atividade da superóxido dismutase (SOD) em animais com DM1/STZ (LIU et al., 2014; XIE et al., 2020). Além disso, foi demonstrado anteriormente que o NDBP (40 mg/Kg, i.p. por 14 dias) reduziu os níveis de MDA no pâncreas e no fígado de camundongos com DM1/STZ (FERNANDES-COSTA et al., 2023).

O efeito antioxidante dos doadores de NO também parece estar relacionado à diminuição da atividade da NADPH oxidase (AMARAL et al., 2015; GAO et al., 2014; PORPINO et al., 2016; YANG et al., 2015). Estudo anterior revelou que o nitrato orgânico NDBP reduziu a atividade da NADPH oxidase e os níveis de superóxido no coração e no córtex renal de camundongos com hipertensão induzida por ANG II (PORPINO et al., 2016). Além disso, também foi observado em outro estudo que o NaNO₃ diminuiu a atividade da NADPH oxidase e o estresse oxidativo em anéis aórticos isolados de camundongos com DM2 (TIAN et al., 2020). Corroborando os achados do presente estudo, estudos anteriores observaram aumento de ROS (intensidade de fluorescência de DHE) e redução simultânea nos níveis de NO (intensidade de fluorescência de DAF-2DA) induzidos por STZ em aorta de camundongos

(TOQUE et al., 2017; ZHANG et al., 2021). Esse estudo é o primeiro a avaliar *in vivo* o efeito de nitratos nos níveis de NO na vasculatura de animais com DM1. Entretanto, estudos *in vitro* observaram aumento nos níveis de NO após incubação da artéria aorta de camundongos com doador de NO 2-nitrato-1,3-dioctanoxipropano (NDOP) (BERNARDINO-PAULA et al., 2020) e artéria mesentérica de ratos com doador de NO 1,3-bis (hexiloxi) propan-2-il nitrato (NDHP) (PAULO et al., 2018).

Por fim, foi observada redução na PAS e PAM após tratamento com ISMN ou NaNO_3 em camundongos diabéticos. Por outro lado, um estudo anterior não observou alterações na PAS e na PAM de camundongos com DM1/STZ tratados com o nitrato NDBP (FERNANDES-COSTA et al., 2023). O presente estudo é o primeiro a avaliar o efeito do NaNO_3 na pressão arterial sistêmica em animais com DM1. No entanto, estudos anteriores relataram redução na PAS após 7-8 semanas de suplementação oral com NaNO_3 em animais com DM2 (KHALIFI et al., 2015; TIAN et al., 2020). Estudos clínicos de Bock et al. observaram redução da PAM e PAS, mas não da PAD, após 8 semanas de suplemento dietético contendo 250 mg de nitrato inorgânico e 20 mg de nitrito inorgânico em indivíduos adultos com DM2 (BOCK et al., 2022). Além disso, indivíduos com hipertensão sistólica de longa duração refratária aos esquemas terapêuticos convencionais foram tratados com ISMN de longa ação (60 a 120 mg/dia, por período médio de 48 meses) e apresentaram redução da PAS, sem alterações da PAD (STOKES et al., 2005).

Esse estudo também foi o primeiro a avaliar o efeito do ISMN na pressão arterial sistêmica em um modelo experimental de animal diabético. Curiosamente, o tratamento com ISMN na dose de 15 mg/Kg por 12 semanas reduziu a fibrose miocárdica e melhorou a disfunção cardíaca em ratos com cardiomiopatia diabética induzida por STZ (ZHAO et al., 2022). O presente estudo pré-clínico apoia o desenvolvimento de estudos clínicos utilizando ISMN ou NaNO_3 como terapia adjuvante antidiabetogênica, com o objetivo de reduzir a dose diária de insulina em indivíduos com DM1, principalmente nos pacientes com tendência ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

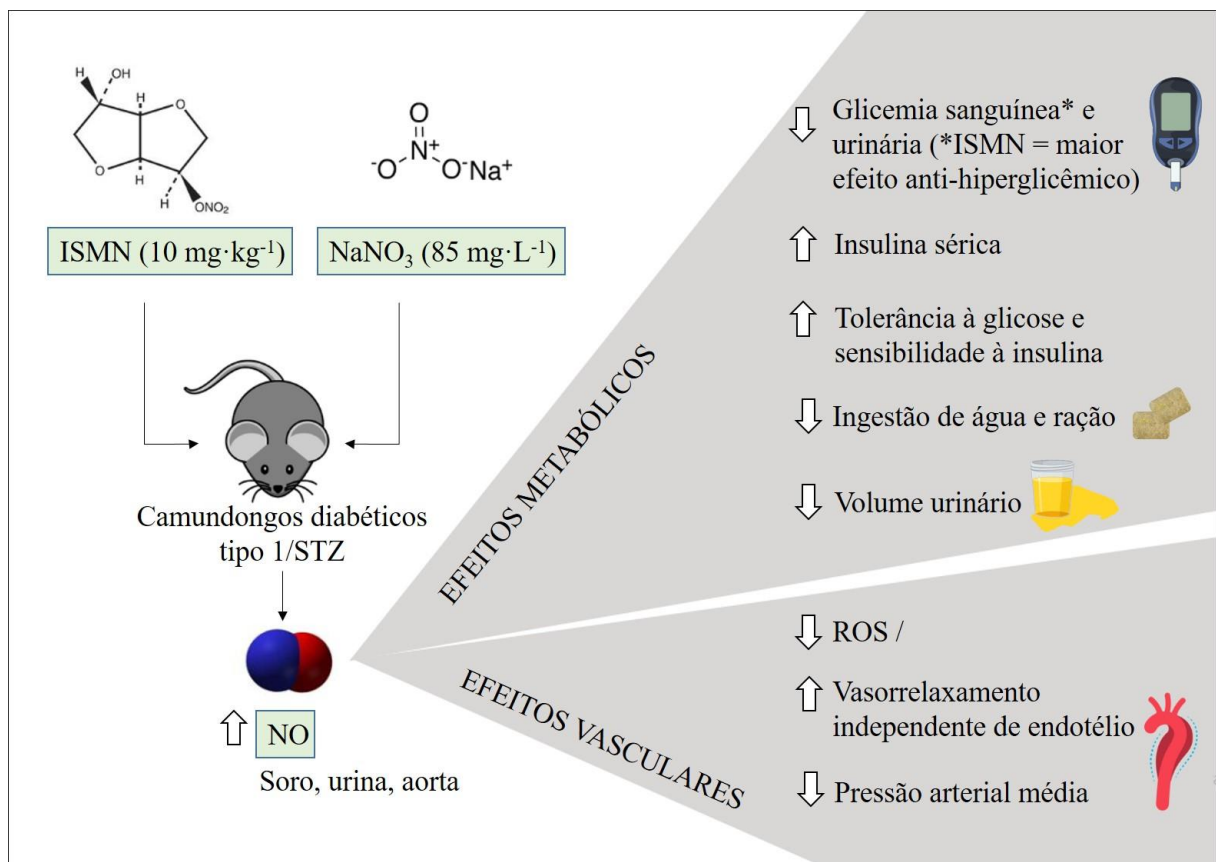
Esse estudo apresenta algumas limitações metodológicas, sendo elas: a ausência de um grupo diabético tratado com insulina e a não avaliação da pressão arterial invasiva.

7. CONCLUSÃO

O tratamento com ISMN ou NaNO_3 apresentam efeitos metabólicos e vasculares benéficos em camundongos DM1. No entanto, o ISMN mostrou um efeito anti-hiperglicêmico mais pronunciado, o qual foi associado ao aumento nos níveis séricos de insulina, bem como melhora na sensibilidade à insulina. Além disso, ambos os tratamentos com nitratos induziram diminuição da pressão arterial média e aumentaram o vasorrelaxamento em aorta de camundongos com DM1. Esses efeitos benéficos podem ser atribuídos à redução do estresse oxidativo nos vasos sanguíneos, ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico e à redução da hiperglicemia em camundongos com diabetes induzido por STZ (Figura 23).

Esses resultados fornecem informações importantes para o desenvolvimento de estudos clínicos destinados a avaliar a eficácia do ISMN ou NaNO_3 como potenciais terapias adjuvantes antidiabetogênicas e anti-hipertensivas em pacientes diabéticos. Além disso, a inclusão de alimentos ricos em nitrato na dieta, tais como vegetais de folhas verdes e beterraba, pode ser benéfica para esse público-alvo, no entanto, para isso, estudos em humanos precisam ser realizados.

Figura 23: Efeitos metabólicos e vasculares induzidos por ISMN e NaNO_3 em camundongos diabéticos tipo 1 (DM1). O tratamento com nitratos inorgânico (NaNO_3 , $85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 14 dias) e orgânico (ISMN, $10 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, 14 dias) aumentou a concentração de óxido nítrico (NO) no soro, urina e aorta de camundongos DM1/STZ, promovendo efeitos metabólicos e vasculares benéficos. Camundongos DM1 tratados com NaNO_3 ou ISMN mostraram redução na glicose sanguínea em jejum e glicose urinária acompanhada por aumento na concentração de insulina sérica, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina; além de redução na ingestão de água e ração, no volume urinário, no estresse oxidativo em aorta, melhora da função vascular independente de endotélio em aorta torácica e redução na pressão arterial média quando comparado aos animais diabéticos não tratados. O efeito anti-hiperglicêmico após o tratamento com ISMN foi mais pronunciado do que com NaNO_3 , enquanto os resultados foram similares nos outros parâmetros avaliados.



8. REFERÊNCIAS

- ABSHAGEN, U. W. P. Pharmacokinetics of isosorbide mononitrate. **The American Journal of Cardiology**, v. 70, n. 17, p. G61–G66, nov. 1992.
- ADINORTEY, M. B. Biochemicophysiological Mechanisms Underlying Signs and Symptoms Associated with Diabetes mellitus. **Advances in Biological Research**, v. 11, n. 5, p. 233–241, 2017.
- AHMAD, K. Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34, n. 2, p. 234–237, 2014.
- AKINLADE, O. M.; OWOYELE, B. V.; SOLADOYE, A. O. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents : a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy. **Afri Health Sci.**, v. 21, n. 2, p. 719–727, 2021.
- AL-AWAR, A. et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.
- ALHUSSEINY, S. M. et al. A comparative study on the anti-schistosomal and hepatoprotective effects of vinpocetine and isosorbide-5-mononitrate on *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Acta Tropica**, v. 176, p. 114–125, 2017.
- ALI, M. A.; MUSTAFA, N. G. A comparative histopathological study of pancreas, intestine, and liver of experimentally induced diabetes in rats. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 37, n. 4, p. 971–978, 2023.
- AMARAL, J. H. et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox Biology**, v. 5, p. 340–346, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes : Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. **Diabetes Care**, v. 45, n. Suppl, p. 17–38, 2022a.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes—2022 Abridged for Primary Care Providers. **Clinical Diabetes**, v. 40, n. 1, p. 10–38, 1 jan. 2022b.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. **Diabetes Care**, v. 47, n. Supplement_1, p. S20–S42, 1 jan. 2024.
- AN, Y. et al. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. **Cardiovascular Diabetology**, v. 22, n. 1, p. 1–17, 2023.
- ANDERSON, G. Type I Diabetes Pathoetiology and Pathophysiology: Roles of the Gut Microbiome, Pancreatic Cellular Interactions, and the ‘Bystander’ Activation of Memory CD8⁺ T Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, 2023.
- ANNABESTANI, Z. et al. Insulin buccal spray (Oral-Lyn) efficacy in type 1 diabetes. **Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders**, v. 9, n. 21, p. 1–4, 2010.
- ANTUNES, F.; BOVERIS, A.; CADENAS, E. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 101, n. 48, p. 16774–16779, 2004.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 2, p. 349–360, fev. 1993.

ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1–18, 2012.

AYALA, J. E. et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n. 9–10, p. 525–534, 2010.

BAHADORAN, Z. et al. Beneficial effects of inorganic nitrate/nitrite in type 2 diabetes and its complications. **Nutrition and Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2015.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; GHASEMI, A. Role of Nitric Oxide in Insulin Secretion and Glucose Metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 118–130, 2020.

BALARINI, C. M. et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

BALOGH, D. B. et al. Cardioprotective and Antifibrotic Effects of Low-Dose Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors in Type 1 Diabetic Rat Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 1–15, 2023.

BARNETT, R. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 195, 2018.

BARRETT, E. J. et al. Insulin regulates its own delivery to skeletal muscle by feed-forward actions on the vasculature. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 2, 2011.

BELLAMY, T. C.; GRIFFITHS, C.; GARTHWAITE, J. Differential sensitivity of guanylyl cyclase and mitochondrial respiration to nitric oxide measured using clamped concentrations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p. 31801–31807, 2002.

BERNARDINO-PAULA, R. et al. The new organic nitrate 2-nitrate-1,3-diocthanoxypropan (NDOP) induces nitric oxide production and vasorelaxation via activation of inward-rectifier potassium channels (KIR). **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 104–105, n. August, p. 61–69, 2020.

BILLIAR, T. R. et al. Nitric oxide synthases in GtoPdb v.2023.1. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2023, n. 1, 26 abr. 2023.

BJORNSTAD, P. Insulin sensitivity and complications in type 1 diabetes: New insights. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 1, p. 8, 2015.

BLANTZ, R. C.; PELAYO, J. C. A functional role for the tubuloglomerular feedback mechanism. **Kidney International**, v. 25, n. 5, p. 739–746, 1984.

BOCK, J. M. et al. Dietary Inorganic Nitrate/Nitrite Supplementation Reduces Central and Peripheral Blood Pressure in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **American Journal of Hypertension**, v. 35, n. 9, p. 803–809, 2022.

BOLLETTINO CHIMICO FARMACEUTICO. BCFAAI. **Societa Editoriale Farmaceutica**,

v. 128, p. 74, 1989.

BOLLI, G. B. et al. Lower fasting blood glucose, glucose variability and nocturnal hypoglycaemia with glargine vs NPH basal insulin in subjects with Type 1 diabetes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 19, n. 8, p. 571–579, 2009.

BOURAHILA, S.; MOUSTEFAI, S. K. Structural, electronic and optical properties of sodium nitrate NaNO_3 : An ab initio study. **Global Journal on Advances in Pure & Applied Sciences Issue**, v. 6, n. 6, p. 13–15, 2015.

BOUWENS, L.; ROOMAN, I. Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. **Physiol Rev**, v. 85, p. 1255–1270, 2005.

BOWE, J. E. et al. Assessing glucose homeostasis in rodent models. **Journal of Endocrinology**, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota técnica nº 339/2013**, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria GM/MS Nº 2.898, de 03 de novembro de 2021.**, 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E I. E. EM S. **Protocolo clínica e diretrizes terapêuticas do diabetes melito tipo 1**. 1. ed. Brasília: [s.n.].

BROSIUS, F. Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse) Summary : Reagents and Materials : Reagent Preparation : **Animal models of diabetic complications consortium**, 2009.

BROSTOFF, J. M.; KEEN, H.; BROSTOFF, J. A diabetic life before and after the insulin era [3]. **Diabetologia**, v. 50, n. 6, p. 1351–1353, 2007.

BROWN, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1504, n. 1, p. 46–57, 2001.

BROWNLEE, M. Biology of Diabetic Complications. **Nature**, v. 414, n. December, p. 813–820, 2001.

BURNS, K. D. et al. The relationship between urinary renin-angiotensin system markers, renal function, and blood pressure in adolescents with type 1 diabetes. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 312, n. 2, p. F335–F342, 1 fev. 2017.

BUSE, M. G. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 1, p. E1–E8, jan. 2006.

CARLSTRÖM, M. et al. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 41, p. 17716–17720, 2010.

CHEN, C.-A. et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. **Nature**, v. 468, n. 7327, p. 1115–1118, 22 dez. 2010.

CHEN, C.; JUAN, S.; CHOU, H. Hyperglycemia activates the renin-angiotensin system and

induces epithelial-mesenchymal transition in streptozotocin-induced diabetic kidneys.

Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, v. 19, n. 3, p. 147032031880300, 28 jul. 2018.

ÇIÇEKLI, İ.; DURUSOY, R. Breastfeeding, nutrition and type 1 diabetes: a case-control study in Izmir, Turkey. **International Breastfeeding Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2022.

CLARK, M.; KROGER, C. J.; TISCH, R. M. Type 1 diabetes: A chronic anti-self-inflammatory response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, 2017.

CORBETT, J. A. et al. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1731–1735, mar. 1993.

CREE-GREEN, M. et al. Metformin Improves Peripheral Insulin Sensitivity in Youth with Type 1 Diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 104, n. 8, p. 3265–3278, 2019.

CROTEAU, L. et al. Endothelial deletion of PKC δ prevents VEGF inhibition and restores blood flow reperfusion in diabetic ischemic limb. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 18, n. 2, p. 1–11, 2021.

DAIBER, A.; MÜNDEL, T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced endothelial dysfunction: Emphasis on redox biology and oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 11, p. 899–942, 2015.

DEEDS, M. C. et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 3, p. 131–140, 2011.

DEEPA MAHESHVARE, M. et al. A pathway model of glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic β -cell. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, n. August, 2023.

DEJGAARD, T. F. et al. Liraglutide reduces hyperglycaemia and body weight in overweight, dysregulated insulin-pump-treated patients with type 1 diabetes: The Lira Pump trial—a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 492–500, 2020.

DING, Y. et al. Effects of stimulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 279, n. 1 42-1, p. 11–17, 2000.

DIVAKARAN, S.; LOSCALZO, J. The Role of Nitroglycerin and Other Nitrogen Oxides in Cardiovascular Therapeutics. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 19, p. 2393–2410, nov. 2017.

DUSEJA, A. et al. Insulin tolerance test is comparable to homeostasis model assessment for insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 4, p. 170–173, 2007.

DUSSE, L. M. S. A. et al. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clinica Chimica Acta**, v. 362, n. 1–2, p. 195–197, 2005.

DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. Endogenous Nitric Oxide in Cardiovascular Disease and Transplantation. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 3, p. 395–406, 8 jan. 1995.

DWYER, J. R. et al. Nfkbid Overexpression in Nonobese Diabetic Mice Elicits Complete Type 1 Diabetes Resistance in Part Associated with Enhanced Thymic Deletion of Pathogenic CD8 T Cells and Increased Numbers and Activity of Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 209, n. 2, p. 227–237, 2022.

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus - a chronic autoimmune disease. **The New England journal of medicine**, v. 314, n. 21, p. 1360–68, 1986.

ELDOR, R. et al. Glucose-Reducing Effect of the ORMD-0801 Oral Insulin Preparation in Patients with Uncontrolled Type 1 Diabetes: A Pilot Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e59524, 9 abr. 2013.

ELDOR, R. et al. Efficacy and safety of 28-day treatment with oral insulin (ORMD-0801) in patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 2021.

ELEAZU, C. O. et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals , its practical use and potential risk to humans. **J Diabetes Metab Disord.**, v. 12, n. 60, p. 1–7, 2013.

ELSAYED, N. A. et al. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes—2023. **Diabetes Care**, v. 46, n. supp, p. S140–S157, 2023.

ETGEN, G. J.; FRYBURG, D. A.; GIBBS, E. M. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1915–1919, 1997.

FERNANDES-COSTA, F. et al. The organic nitrate NDBP promotes cardiometabolic protection in type 1 diabetic mice. **Journal of Functional Foods**, v. 104, n. October 2022, p. 105526, maio 2023.

FONOVICH DE SCHROEDER, T. M. et al. Constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in langerhans islets from streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 625–632, 1998.

FONSECA-CORREA, J. I.; CORREA-ROTTER, R. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Mechanisms of Action: A Review. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. December, p. 1–7, 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Monoket® tablets (isosorbide mononitrate, USP)**. [s.l: s.n.].

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137–188, jan. 2013.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FRANÇA-SILVA, M. S. et al. The 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, n. 1–3, p. 170–175, 2012.

FRIEDERICH, M.; HANSELL, P.; PALM, F. Diabetes, Oxidative Stress, Nitric Oxide and Mitochondria Function. **Current Diabetes Reviews**, v. 5, n. 2, p. 120–144, 2009.

FULCHER, G. R.; GILBERT, R. E.; YUE, D. K. Glargine is superior to neutral protamine Hagedorn for improving glycated haemoglobin and fasting blood glucose levels during intensive insulin therapy. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. 9, p. 536–542, 2005.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current Protocols**, v. 1, n. 4, 27 abr. 2021.

GAO, X. et al. NADPH oxidase in the renal microvasculature is a primary target for blood pressure-lowering effects by inorganic nitrate and nitrite. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 161–170, 2014.

GARG, S. K. et al. Effects of Sotagliflozin Added to Insulin in Patients with Type 1 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 24, p. 2337–2348, 2017.

GAZOLA, V. A. F. G. et al. Acute effects of isolated and combined L-alanine and L-glutamine on hepatic gluconeogenesis, ureagenesis and glycaemic recovery in experimental short-term insulin induced hypoglycaemia. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, n. 2, p. 211–216, 2007.

GERALDES, P.; KING, G. L. Emission security- Tempest Attacks. **Circulation Research**, v. 106, n. 8, p. 1319–1331, 2010.

GERO, D. Hyperglycemia-Induced Endothelial Dysfunction. In: **Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges**. [s.l.] InTech, 2018.

GHEIBI, S. et al. Nitrite increases glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content in obese type 2 diabetic male rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, 2017.

GHEIBI, S. et al. Effects of long-term nitrate supplementation on carbohydrate metabolism, lipid profiles, oxidative stress, and inflammation in male obese type 2 diabetic rats. **Nitric Oxide**, v. 75, n. 6471, p. 27–41, maio 2018.

GIWA, A. M. et al. Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment. **World Journal of Diabetes**, v. 11, n. 1, p. 13–25, 2020.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GREGORY, G. A. et al. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 10, n. 10, p. 741–760, 2022.

GUARNOTTA, V. et al. Higher cardiometabolic risk in idiopathic versus autoimmune type 1 diabetes: A retrospective analysis. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 10, n. 1, p. 4–11, 2018.

GUO, X. et al. High glucose inhibits expression of inducible and constitutive nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 21, n. 4, p. 17–20, 2000.

GURLEY, S. B. et al. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 1, p. F214–F222, jan. 2006.

HAN, X. et al. Metformin ameliorates insulinitis in STZ-induced diabetic mice. **PeerJ**, v. 5, n. 4, p. e3155, 13 abr. 2017.

HEINEMANN, L. The Failure of Exubera: Are We Beating a Dead Horse? **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 518–529, maio 2008.

HEISE, T. et al. Ultra rapid lispro lowers postprandial glucose and more closely matches normal physiological glucose response compared to other rapid insulin analogues: A phase 1 randomized, crossover study. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 1789–1798, 2020.

HELOU, C. et al. Microorganisms and Maillard reaction products: A review of the literature and recent findings. **Amino Acids**, v. 46, n. 2, p. 267–277, 2014.

HERMANSEN, K. et al. Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with Type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. 4, p. 622–629, 2004.

HOLMBERG, H. et al. Short duration of breast-feeding as a risk-factor for β -cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 111–116, 2007.

HOLT, R. I. G. et al. The Management of Type 1 Diabetes in Adults. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetes Care**, v. 44, n. 11, p. 2589–2625, 1 nov. 2021.

HOUEISS, P.; LUCE, S.; BOITARD, C. Environmental Triggering of Type 1 Diabetes Autoimmunity. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, n. July, p. 1–14, 22 jul. 2022.

HOWARTH, F. C. et al. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 6, p. 827–835, 2005.

HSIEH, T. J. et al. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 8, p. 2975–2985, 2002.

HYÖTY, H.; LEON, F.; KNIP, M. Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 12, p. 1071–1083, 2018.

ILONEN, J.; LEMPAINEN, J.; VEIJOLA, R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 11, p. 635–650, 18 nov. 2019.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Type 1 diabetes**. Disponível em: <<https://www.idfdiabeteschool.org/type-1-diabetes>>.

IYER, G. et al. An overview of oral insulin delivery strategies (OIDS). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, n. January, p. 565–585, 2022.

JACKSON, R. et al. Distinct and complementary roles for α and β isoenzymes of PKC in mediating vasoconstrictor responses to acutely elevated glucose. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 5, p. 870–887, 2016.

JANEŽ, A. et al. Insulin Therapy in Adults with Type 1 Diabetes Mellitus: a Narrative Review. **Diabetes Therapy**, v. 11, n. 2, p. 387–409, 2020.

JIANG, H. et al. Dietary nitrite improves insulin signaling through GLUT4 translocation.

Free Radical Biology and Medicine, v. 67, p. 51–57, 2014.

JIMENEZ-FELTSTROM, J.; LUNDQUIST, I.; SALEHI, A. Glucose stimulates the expression and activities of nitric oxide synthases in incubated rat islets: An effect counteracted by GLP-1 through the cyclic AMP/PKA pathway. **Cell and Tissue Research**, v. 319, n. 2, p. 221–230, 2005.

JOHANSEN, V. B. I.; JOSEFSEN, K.; ANTVORSKOV, J. C. The Impact of Dietary Factors during Pregnancy on the Development of Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes: A Systematic Literature Review. **Nutrients**, v. 15, n. 20, 2023.

JOHANSSON, E. B.; TJÄLVE, H. Studies on the tissue disposition and fate of [14C]Streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. **Acta endocrinologica**, v. 89, p. 339–51, 1978.

JÖRNS, A. et al. Immune cell infiltration, cytokine expression, and β -cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2041–2052, 2005.

JUNOD, A. et al. Studies of the Diabetogenic Action of Streptozotocin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 126, n. 1, p. 201–205, 1967.

KAPIL, V. et al. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. **Free Radical Biology and Medicine**, 2013.

KASONO, K. et al. Nicorandil improves diabetes and rat islet β -cell damage induced by streptozotocin in vivo and in vitro. **European Journal of Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 277–285, 2004.

KEYHANMANESH, R. et al. Protective effects of sodium nitrate against testicular apoptosis and spermatogenesis impairments in streptozotocin-induced diabetic male rats. **Life Sciences**, v. 211, p. 63–73, 2018.

KHALIFI, S. et al. Dietary nitrate improves glucose tolerance and lipid profile in an animal model of hyperglycemia. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, 2015.

KIM, J. Y. et al. Chronic Ethanol Consumption-induced Pancreatic β -Cell Dysfunction and Apoptosis through Glucokinase Nitration and Its Down-regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37251–37262, nov. 2010.

KIM, Y. et al. Protective Effects of Hemp (*Cannabis sativa*) Root Extracts against Insulin-Deficient Diabetes Mellitus In Mice. **Molecules**, v. 28, n. 9, 2023.

KIZUB, I. V.; KLYMENKO, K. I.; SOLOVIEV, A. I. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. **International Journal of Cardiology**, v. 174, n. 2, p. 230–242, 2014.

KOIVISTO, V. A. The human insulin analogue insulin lispro. **Annals of Medicine**, v. 30, n. 3, p. 260–266, 1998.

KOJIMA, H. et al. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 13, p. 2446–2453, 1998.

KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced

diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v. 3, n. 3, p. 751–778, 1987.

KROGVOLD, L. et al. Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 5, p. 1682–1687, 2015.

KURZHALS, P. et al. Multi-hexamer formation is the underlying basis for the ultra-long glucoselowering effect of insulin degludec. **Diabetologia**, v. 54, n. S426, 2011.

KWON, L.; ROSENDORFF, C. **The Medical Treatment of Stable Angina**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

LAFFRANCHI, R. et al. Nitric Oxide (Nitrogen Monoxide, No) Stimulates Insulin Secretion by Inducing Calcium Release from Mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 217, n. 2, p. 584–591, dez. 1995.

LAMOIA, T. E.; SHULMAN, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 1, p. 77–96, 2021.

LAMPASONA, V.; LIBERATI, D. Islet Autoantibodies. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 6, 2016.

LEE, J. H.; LEE, J. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Its Role in Pancreatic β -Cell Dysfunction and Senescence in Type 2 Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, 2022.

LEE, S. H.; YOON, K. H. A century of progress in diabetes care with insulin: A history of innovations and foundation for the future. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 45, n. 5, p. 629–640, 2021.

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

LI, H.; WANG, S. Organic nitrates favor regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients on chronic peritoneal dialysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1069–1079, 2013.

LIU, L. et al. Nicorandil attenuates endothelial VCAM-1 expression via thioredoxin production in diabetic rats induced by streptozotocin. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 6, p. 2227–2232, 2014.

LIU, Z. et al. PKC β increases ROS levels leading to vascular endothelial injury in diabetic foot ulcers. **American journal of translational research**, v. 12, n. 10, p. 6409–6421, 2020.

LIVERTOX: CLINICAL AND RESEARCH INFORMATION ON DRUG INDUCED LIVER INJURY. Organic nitrates. **National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases**, v. 12, n. 1, p. 58–63, 2018.

LLOYD, R. E.; TAMHANKAR, M.; LERNMARK, Å. Enteroviruses and Type 1 Diabetes: Multiple Mechanisms and Factors? **Annual review of medicine**, v. 73, n. 2, p. 483–499, 27 jan. 2022.

LUNDBERG, J. O.; CARLSTRÖM, M.; WEITZBERG, E. Metabolic Effects of Dietary

Nitrate in Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 9–22, 2018.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 623–641, 2015.

MADIRAJU, A. K. et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 542–546, 21 jun. 2014.

MADIRAJU, A. K. et al. Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo. **Nature Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1384–1394, 23 set. 2018.

MALKOFF, J. Non-Invasive Blood Pressure for Mice and Rats. **Animal Lab News**, p. 1–8, 2005.

MANIGRASSO, M. B. et al. Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 15–22, jan. 2014.

MARREN, S. M. et al. Research : Care Delivery Persistent C-peptide is associated with reduced hypoglycaemia but not HbA 1c in adults with longstanding Type 1 diabetes : evidence for lack of intensive treatment in UK clinical practice ? **Diabetic Medicine**, v. 36, n. 9, p. 1092–1099, 2019.

MASHA, A. et al. Role of the Decreased Nitric Oxide Bioavailability in the Vascular Complications of Diabetes Mellitus. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 9, p. 1354–1363, 2011.

MAYO, K. E. et al. International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 167–194, 1 mar. 2003.

MEIJER, M. K. et al. Urinary corticosterone levels in mice in response to intraperitoneal injections with saline. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, 2005.

MELO, K. F. S. DE et al. Tratamento do Diabetes Mellitus Tipo 1 no SUS. In: **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l.] Conectando Pessoas, 2023. p. 1–29.

MELO, K. F. S. et al. Short-acting insulin analogues versus regular human insulin on postprandial glucose and hypoglycemia in type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2019.

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Abnormal T-cell development in the thymus of non-obese diabetic mice: Possible relationship with the pathogenesis of type 1 autoimmune diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. JUL, p. 1–9, 2018.

MENDES-JÚNIOR, L. DAS G. et al. The new nitric oxide donor cyclohexane nitrate induces vasorelaxation, hypotension, and antihypertensive effects via NO/cGMP/PKG pathway. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. Aug, 2015.

MIYAUCHI, E. et al. The impact of the gut microbiome on extra-intestinal autoimmune diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 1, p. 9–23, 9 jan. 2023.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–12, 30 dez. 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology,

and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–42, 1991.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from l-arginine. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1709–1715, 1989.

MORAHAN, G. Insights into type 1 diabetes provided by genetic analyses. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 19, n. 4, p. 263–270, 2012.

NAGAREDDY, P. R. et al. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5 58-5, 2005.

NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. Organic nitrates. In: **LiverTox**. [s.l: s.n.]. v. 12p. 58.

NIEVES-CINTRÓN, M. et al. Cellular and molecular effects of hyperglycemia on ion channels in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 1, p. 31–61, 27 jan. 2021.

NING, Y. et al. Ranolazine increases β -cell survival and improves glucose homeostasis in low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 50–58, 2011.

NORRIS, J. M. et al. Timing of Initial Cereal Exposure in Infancy and Risk of Islet Autoimmunity. **Jama**, v. 290, n. 13, p. 1713–1720, 2003.

NOVIKOVA, L. et al. Variations in Rodent Models of Type 1 Diabetes: Islet Morphology. **Journal of Diabetes Research**, p. 1–13, 2013.

NUKATSUKA, M. et al. Allopurinol protects pancreatic .BETA. cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: In vitro study. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, v. 13, n. 4, p. 259–262, 1990.

NYSTRÖM, T. et al. Inorganic nitrite stimulates pancreatic islet blood flow and insulin secretion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 5, p. 1017–1023, 2012.

OCHOA M, M. F.; GARCIA B, H. Terapia complementaria a la Insulina en el tratamiento de niños y adolescentes con Diabetes Mellitus tipo 1- (DM1). **Rev Chil Endo Diab**, v. 12, n. 2, p. 124–132, 2019.

OELZE, M. et al. Chronic therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction, oxidative stress, and a marked increase in vascular endothelin-1 expression. **European Heart Journal**, v. 34, n. 41, p. 3206–3216, 2013.

OGHBAEI, H. et al. Sodium nitrate preconditioning prevents progression of the neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetes Wistar rats. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 19, n. 1, p. 105–113, 2020.

OHTAKE, K. et al. Dietary nitrite supplementation improves insulin resistance in type 2 diabetic KKAy mice. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 44, p. 31–38, 2015.

PAIK, S. G. et al. Induction of Insulin-dependent Diabetes by Streptozotocin Inhibition by Estrogens and Potentiation by Androgens. **Diabetes**, v. 31, n. 8, p. 724–9, 1982.

PALIK, E. D. **Handbook of optical constants of solids (vol. 3)**. Copyright ed. [s.l.: s.n.].

PAPACHRISTOFOROU, E. et al. Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Journal of Diabetes Research**, v. 2020, p. 1–17, 12 out. 2020.

PAPICH, M. G. Isosorbide Dinitrate, Isosorbide Mononitrate. In: **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 414–415.

PAPPAS, G.; WILKINSON, M. L.; GOW, A. J. Nitric oxide regulation of cellular metabolism: Adaptive tuning of cellular energy. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 131, n. 848, p. 8–17, 2023.

PAULO, L. L. et al. The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats. **Redox Biology**, v. 15, n. December, p. 182–191, 2018.

PEKTAS, M. B. et al. High glucose causes vascular dysfunction through Akt/eNOS pathway: reciprocal modulation by juglone and resveratrol. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 96, n. 8, p. 757–764, ago. 2018.

PIEBER, T. R.; EUGÈNE-JOLCHINE, I.; DEROBERT, E. Efficacy and safety of HOE 901 versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes. The European Study Group of HOE 901 in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, n. 2, p. 157–162, 1 fev. 2000.

POMPLUN, D. et al. Elevation of Blood Glucose Following Anaesthetic Treatment in C57BI/6 Mice. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 1, p. 67–69, 2004.

PORCELLATI, F. et al. Better long-term glycaemic control with the basal insulin glargine as compared with NPH in patients with Type 1 diabetes mellitus given meal-time lispro insulin. **Diabetic Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1213–1220, 2004.

PORPINO, S. K. P. et al. Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension. **British Journal of Pharmacology**, p. 2290–2302, 2016.

PRADA, M. P. et al. A Gs-coupled purinergic receptor boosts Ca^{2+} influx and vascular contractility during diabetic hyperglycemia. **eLife**, v. 8, p. 1–37, 2019.

RAHMAN, M. S. et al. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6403, 15 jun. 2021.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. R. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer chemotherapy reports. Part 1**, v. 29, p. 91–98, 1963.

RAO, L. et al. Sodium–glucose cotransporter 2 inhibitors as an add-on therapy to insulin for type 1 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized controlled trials. **Acta Diabetologica**, v. 58, n. 7, p. 869–880, 2021.

REDONDO, M. J.; EISENBARTH, G. S. Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. **Diabetologia**, v. 45, n. 5, p. 605–622, 2002.

REDONDO, M. J.; STECK, A. K.; PUGLIESE, A. Genetics of type 1 diabetes. **Pediatric**

Diabetes, v. 19, n. 3, p. 346–353, 2 maio 2018.

REN, X. et al. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells.

Cardiovascular Diabetology, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.

REWERS, M.; DAVIS, B.; LUDVIGSSON, J. Environmental risk factors for type 1 diabetes Marian HHS Public Access. **Lancet.**, v. 387, n. 10035, p. 2340–2348, 2016.

RIZZA, R. A. Pathogenesis of Fasting and Postprandial Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: Implications for Therapy. **Diabetes**, v. 59, n. 11, p. 2697–2707, 1 nov. 2010.

RIZZO, M. A.; PISTON, D. W. Regulation of β cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. **Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 2, p. 243–248, 2003.

RODACKI, M. et al. Classificação do diabetes. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**, p. 1–28, 2022.

RODACKI, M. et al. Classificação do diabetes. In: **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l.] Conectando Pessoas, 2023. p. 1–30.

ROSENSTOCK, J. et al. Empagliflozin as adjunctive to insulin therapy in type 1 diabetes: The EASE trials. **Diabetes Care**, v. 41, n. 12, p. 2560–2569, 2018.

RUSSELL, N. D. F.; COOPER, M. E. 50 Years Forward: Mechanisms of Hyperglycaemia-Driven Diabetic Complications. **Diabetologia**, v. 58, n. 8, p. 1708–1714, 2015.

SAARE, L.; PEET, A.; TILLMANN, V. Growth in Children with HLA-Conferred Susceptibility to Type 1 Diabetes. **Endocrinology and Metabolism**, v. 37, n. 1, p. 175–179, 2022.

SAVAGE, D. B. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 817–824, 1 mar. 2006.

SCHEIN, P. S. et al. Clinical Antitumor Activity and. **Cancer**, v. 34, p. 993–1000, 1974.

SCHUHMACHER, S. et al. Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerythrityl tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2608–2616, 2011.

SERIZAWA, K. ICHI et al. Nicorandil prevents endothelial dysfunction due to antioxidative effects via normalisation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase in streptozotocin diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, n. 1, p. 105, 2011.

SEUFERT, J. et al. Real-world data of 12-month adjunct sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor treatment in type 1 diabetes from the German/Austrian DPV registry: Improved HbA1c without diabetic ketoacidosis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 24, n. 4, p. 742–746, 2022.

SHAMSALDEEN, Y. A. et al. Diabetic dyslipidaemia is associated with alterations in eNOS, caveolin-1, and endothelial dysfunction in streptozotocin treated rats. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 34, n. 5, 2018.

SHAMSALDEEN, Y. A.; LIONE, L. A.; BENHAM, C. D. Dysregulation of TRPV4, eNOS and caveolin-1 contribute to endothelial dysfunction in the streptozotocin rat model of diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 888, n. May, p. 173441, 2020.

SHAW, R. J. et al. The Kinase LKB1 Mediates Glucose Homeostasis in Liver and Therapeutic Effects of Metformin. **Science**, v. 310, n. 5754, p. 1642–1646, 9 dez. 2005.

SHEIKH, A. Direct cardiovascular effects of glucagon like peptide-1. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 5, n. 1, p. 1, 2013.

SHIMADA, K. et al. Efficacy and safety of controlled-release isosorbide-5-mononitrate in Japanese patients with stable effort angina pectoris: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **International Heart Journal**, v. 47, n. 5, p. 695–705, 2006.

SHINOZAKI, S. et al. Liver-specific Inducible Nitric-oxide Synthase Expression Is Sufficient to Cause Hepatic Insulin Resistance and Mild Hyperglycemia in Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 34959–34975, out. 2011.

SIMS, E. K. et al. 100 years of insulin: celebrating the past, present and future of diabetes therapy. **Nature medicine**, v. 27, n. 7, p. 1154–1164, jul. 2021.

SINGH, S. N. et al. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 269–277, 2001.

SINGH, V. P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2014.

SO, M. et al. Advances in Type 1 Diabetes Prediction Using Islet Autoantibodies: Beyond a Simple Count. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 5, p. 584–604, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. [s.l.: s.n.].

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Índice DM1-Brasil Situação Global do Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) em 2022**. Disponível em: <<https://diabetes.org.br/wp-content/uploads/2022/09/2.-Indice-DM1-Global.pdf>>.

SOKOLOVSKA, J. et al. Nitric oxide metabolism is impaired by type 1 diabetes and diabetic nephropathy. **Biomedical Reports**, v. 12, n. 5, p. 251–258, 2020.

SOLER, M. J.; WYSOCKI, J.; BATLLE, D. ACE2 alterations in kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 11, p. 2687–2697, 2013.

SOUZA-SILVA, L. et al. Glycosylation with O-linked β -N-acetylglucosamine induces vascular dysfunction via production of superoxide anion/reactive oxygen species. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 232–240, mar. 2018.

SRINIVASAN, S. et al. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. **Diabetologia**, v. 47, n. 10, p. 1727–1734, 2004.

STECK, A. K.; REWERS, M. J. Genetics of Type 1 Diabetes. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 176–185, 1 fev. 2011.

STENE;, L. C. et al. **Cloaking malware with the trusted platform module** **Diabetes in America [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK)**, 2023.

STEVEN, S. et al. The endothelin receptor antagonist macitentan improves isosorbide-5-mononitrate (ISMN) and isosorbide dinitrate (ISDN) induced endothelial dysfunction, oxidative stress, and vascular inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 4–6, 2018.

STOKES, G. S. et al. Long-term effectiveness of extended-release nitrate for the treatment of systolic hypertension. **Hypertension**, v. 45, n. 3, p. 380–384, 2005.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537–546, 2001.

SZWERGOLD, B. S.; KAPPLER, F.; BROWN, T. R. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. **Science**, v. 247, n. 4941, p. 451–454, 1990.

TANDON, S. et al. The impact of pharmacological and lifestyle interventions on body weight in people with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 350–362, 2021.

TATOVIC, D. et al. Diagnosing Type 1 diabetes in adults: Guidance from the UK T1D Immunotherapy consortium. **Diabetic Medicine**, v. 39, n. 7, p. 10–12, 6 jul. 2022.

TATOVIC, D.; NARENDHAN, P.; DAYAN, C. M. A perspective on treating type 1 diabetes mellitus before insulin is needed. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 19, n. 6, p. 361–370, 13 jun. 2023.

TAYLOR, G. S. et al. Capturing the real- - world benefit of residual β - - cell function during clinically important time- - periods in established Type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 39, n. 5, p. e14814, 2022.

TESAURO, M.; MAZZOTTA, F. A. Pathophysiology of diabetes. In: **Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 37–47.

TESCH, G. H.; ALLEN, T. J. Methods in Renal Research Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Nephrology**, v. 12, p. 261–266, 2007.

TESSARI, P. et al. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. **Diabetes**, v. 59, n. 9, p. 2152–2159, 2010.

TIAN, R. et al. Supplementation of dietary nitrate attenuated oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic vasculature through inhibition of NADPH oxidase. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 96, n. September 2019, p. 54–63, 2020.

TOQUE, H. A. et al. Netrin-1 is a novel regulator of vascular endothelial function in diabetes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–21, 2017.

UCHIGATA, Y. et al. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 11, p. 6084–6088, 1982.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Levemir insulin detemir[rDNA origin] injection drug approval package**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/021-536_LevemirTOC.cfm>.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Exubera (insulin human [rDNA origin] inhalation powder) and Exubera Inhaler - approved labeling**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021868_exubera_toc.cfm>.

VAFIADIS, P. et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. **Nature Genetics**, v. 15, p. 289–92, 1997.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 79–118, 2011.

VARANI, K. et al. Repeated dosing with NCX1404, a nitric oxide-donating pregabalin, re-establishes normal nociceptive responses in mice with streptozotocin-induced painful diabetic neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 357, n. 2, p. 240–247, 2016.

VERSPOHL, E. J. Novel therapeutics for type 2 diabetes: Incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 124, n. 1, p. 113–138, 2009.

VON HERRATH, M. et al. Anti-interleukin-21 antibody and liraglutide for the preservation of β -cell function in adults with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 9, n. 4, p. 212–224, 2021.

WANG, H. et al. Nitric oxide directly promotes vascular endothelial insulin transport. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4030–4042, 2013.

WANG, L. et al. GLP-1 analog liraglutide enhances proinsulin processing in pancreatic β -cells via a PKA-dependent pathway. **Endocrinology (United States)**, v. 155, n. 10, p. 3817–3828, 2014.

WILLIAMS, C. L.; LONG, A. E. What has zinc transporter 8 autoimmunity taught us about type 1 diabetes? **Diabetologia**, v. 62, n. 11, p. 1969–1976, 2019.

WILLMOTT, N. J.; GALIONE, A.; SMITH, P. A. Nitric oxide induces intracellular Ca^{2+} mobilization and increases secretion of incorporated 5-hydroxytryptamine in rat pancreatic β -cells. **FEBS Letters**, v. 371, n. 2, p. 99–104, 1995.

WOJTALA, A. et al. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. In: **Methods in Enzymology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 542p. 243–262.

WOODS, L. L.; MIZELLE, H. L.; HALL, J. E. Control of renal hemodynamics in hyperglycemia: Possible role of tubuloglomerular feedback. **American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology**, v. 252, n. 1 (21/1), 1987.

XIE, Y. D. et al. 3,4-Dihydroxyphenethyl nitrate with nitric oxide releasing, antioxidant, hypoglycemic and hypolipidemic effects. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 15, p. 1–5, 2020.

YAKURI, O. OYYAA2. **Pharmacometrics**, v. 29, p. 327, 1985a.

YAKURI, O. OYYAA2. **Pharmacometrics**, v. 30, p. 1079, 1985b.

YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. **Nature**, v. 294, n. 5838, p. 284–286, nov. 1981.

YANG, T. et al. Inorganic nitrite attenuates NADPH oxidase-derived superoxide generation in activated macrophages via a nitric oxide-dependent mechanism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 159–166, 2015.

YEO, W. S. et al. The FDA-approved anti-cancer drugs, streptozotocin and floxuridine, reduce the virulence of *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

ZHANG, Y. et al. Astragaloside IV prevents endothelial dysfunction by improving oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mouse aortas. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1–10, 2021.

ZHAO, K. et al. Isosorbide mononitrate inhibits myocardial fibrosis in diabetic rats by up-regulating exosomal MiR-378. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 6, p. 1227–1235, 10 ago. 2022.

ZHAO, N. et al. Nitrates for the prevention of cardiac morbidity and mortality in patients undergoing non-cardiac surgery. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2016, n. 8, 4 ago. 2016.

ZHOU, Y. et al. Determination of Isosorbide-5-Mononitrate in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Its Application to a Bioequivalence Study. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2020, n. 3, p. 1–10, 17 jul. 2020.

ZIEGLER, A. G. et al. Early Infant Feeding and Risk of Developing Type 1 Diabetes-Associated Autoantibodies. **Jama**, v. 290, n. 13, p. 1721–1728, 2003.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação pelo CEUA/UFPB dos experimentos envolvendo o tratamento com mononitrato de isossorbida (ISMN)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O efeito do mononitrato de isossorbida na modulação das alterações metabólicas e cardiovasculares observadas em camundongos com diabetes mellitus tipo I", protocolada sob o CEUA nº 7236120121 (ID 001265), sob a responsabilidade de **Josiane de Campos Cruz e equipe; Francineide Fernandes Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 12/02/2021.

We certify that the proposal "The effect of isosorbide mononitrate on the modulation of metabolic and cardiovascular changes observed in mice with type I diabetes mellitus", utilizing 32 Isogenics mice (32 males), protocol number CEUA 7236120121 (ID 001265), under the responsibility of **Josiane de Campos Cruz and team; Francineide Fernandes Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 02/12/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2020** a **01/2024** Área: **Biociências**

Origem: **Biotério do LACONCHA - CBIOTEC**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 7 semanas**

N: **32**

Linhagem: **C57BL6**

Peso: **16 a 25 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados nas dependências do laboratório LACONCHA

João Pessoa, 04 de novembro de 2021

Prof. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO B – Certificado de aprovação pelo CEUA/UFPB dos experimentos envolvendo o tratamento com nitrato de sódio (NaNO_3)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO DOADOR ORGÂNICO DE ÓXIDO NÍTRICO- 2-NITRATE-1,3-DIBUTHOXYPROPAN (NDBP) NA MODULAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS OBSERVADAS EM CAMUNDONGOS COM DIABETES MELLITUS TIPO I", protocolada sob o CEUA nº 9387160419 (ID 000688), sob a responsabilidade de **Josiane de Campos Cruz e equipe; Francineide Fernandes Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 07/06/2019.

We certify that the proposal "EFFECT OF ORGANIC DONOR NITRIC OXIDE 2-NITRATE-1,3-DIBUTHOXYPROPAN (NDBP) IN THE MODULATION OF THE CARDIOMETABOLIC CHANGES OBSERVED IN MICE WITH DIABETES MELLITUS TYPE I", utilizing 64 Isogenics mice (64 males), protocol number CEUA 9387160419 (ID 000688), under the responsibility of **Josiane de Campos Cruz and team; Francineide Fernandes Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 06/07/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **02/2020**

Área: **Biotecnologia**

Origem: **Biotério do LACONCHA - CBIOTEC**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 7 semanas**

N: **64**

Linhagem: **C57BL6**

Peso: **16 a 25 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados nas dependências do laboratório LACONCHA.

João Pessoa, 26 de junho de 2019

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba